

**Aus dem Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Prof. Dr. med. Ulf R. Rapp**

**Suppression der Apoptose durch C-Raf erfordert MEK1 und Phosphatidylinositol 3-  
Kinase abhängige Signale**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Alexander Freiherr von Gise  
aus Berlin**

**Würzburg, Juli 2007**

**Referent:** Prof. Dr. med. Ulf R. Rapp  
**Koreferent bzw. Koreferentin:** Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Martini  
**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 6. November 2007**

**Der Promovend ist Arzt**

**In Erinnerung an  
meine geliebte Schwester Constanze,**

**in Dankbarkeit an  
meine Eltern Viola und Hardo**

## Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AIF	apoptosis inducing factor
AIP	adenine nucleotid translocator
AKT	Proteinkinase B
AP-1	activating transcription factor-2
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1
ATF-2	activating transcription factor-2
ATP	Adenosintriphosphat
<i>Bcl-2</i>	B-cell lymphoma 2
BH	Bcl-2 Homolog
BIR	baculoviral IAP repeat
CAK	Cyclin-aktivierende Kinasen
CARD	caspase recruitment domain
CD	cluster of differentiation
Cdc	cell-division cycle
Cdk	cyclin-dependent kinase
cDNA	copyDNA
<i>ced-3</i>	cell death abnormal-3
<i>ced-4</i>	cell death abnormal-4
<i>ced-9</i>	cell death abnormal-9
CIP	Cdk inhibitory protein
CKI	Cdk inhibitorische Proteine
CR	conserved region
CREB	cAMP-responsive element binding protein
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DD	death domain
DED	death effector domain
DIABLO	direct IAP-binding protein with low pI
DISC	death-inducing signaling complex
DNA	Desoxyribonucleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EGF	epidermal growth factor
<i>egl-1</i>	egg laying defective
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ets	erythroblastosis
FAK	focal adhesion kinase
FKHR	forkhead related
GLUT	Glucose Transporter
Grb2	growth-factor-receptor bound protein 2
GSK-3	glycogen synthase kinase3
HIF	hypoxia-inducible transcription factor
IAP	inhibitor of apoptosis protein
ICE	Interleukin 1 $\beta$ convertierendes Enzym
IGF	insulinlike growth factor
IGFBP	IGF binding protein
I $\kappa$ B	Inhibitor von NF- $\kappa$ B
IKK	inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase
IL	Interleukin
ILK	integrin-linked kinase
JAK	Janus Kinase/just another kinase
LDH	Lactatdehydrogenase
MAGE	melanoma associated antigen
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	MAP kinase/ERK kinase
mTOR	target of rapamycin
Myc	myelocytoma/carcinoma
NAD <sup>+</sup>	nicotinamid adenine dinucleotid
NBD	Nukleotidbindungsdomäne
NF- $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
NGF	neuronal growth factor
PAK	p21 <sup>rac/cdc42</sup> -activated serine/threonine kinase
PDGF	platelet-derived growth factor
PDK	phosphoinositide-dependent kinase
PI3K	phosphoinositide 3-kinase

PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PtdIns(3,4)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphat
PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat
PtdIns3P	Phosphatidylinositol 3-phosphat
PTEN	phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten
PTP	permeability transition pore
Rac	related to A and C kinase
Ras	rat sarcoma
RBD	Ras Bindungsdomäne
RIP	receptor interacting protein
Rsk	ribosomal S6 kinase
SAP	serum amyloid protein
SAPK	stress acitvated protein kinase
SCF	stem cell factor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH	SRC Homolog
SHIP	SH2-domain-containing inositol phosphatase
Smac	second mitochondria-derived activator of caspases
SOS	son of sevenless
STAT	signal transducers and activators of transcription
TCF	ternary complex factors
TGF	transforming growth factor
TIM	translocase components of the inner mitochondrial membrane
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	TNF-Rezeptor
TOM	translocase components of the outer mitochondrial membrane
TRADD	TNF receptor associated death domain
TRAF2	TNF receptor associated factor2
VDAC	voltage dependent anion channel

VEGF	vascular endothelial growth factor
VSM	vascular smooth muscle cell
XIAP	X-linked IAP

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>1</b>
1.1	APOPTOSE - STERBEN UM ZU LEBEN.....	1
1.2	CASPASEN - FEINDE IM INNERN .....	3
1.3	IAP – INHIBITOREN DER APOPTOSE.....	8
1.4	BCL-2 HOMOLOGE – „GUT“ ODER „BÖSE“ .....	9
1.5	PROTEINKINASEN – REGULATOREN DER APOPTOSE .....	14
1.5.1	RAF UND RAF- ABHÄNGIGE SIGNALTRANSDUKTION .....	14
1.5.2	AKT UND AKT- ABHÄNGIGE SIGNALTRANSDUKTION .....	24
1.6	ZIEL DER ARBEIT.....	29
<b>2</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>31</b>
2.1	MATERIAL.....	31
2.1.1	CHEMIKALIEN UND RADIOAKTIVE VERBINDUNGEN .....	31
2.1.2	INHIBITOREN UND APOPTOSEAUSLÖSER.....	32
2.1.3	ENZYME .....	33
2.1.4	PLASMIDE.....	33
2.1.5	ZELLKULTURMATERIAL .....	35
2.1.6	ZELLINIEN UND BAKTERIENSTÄMME.....	35
2.1.7	ANTIKÖRPER .....	36
2.1.8	REKOMBINANTE PROTEINE .....	36
2.2	METHODEN .....	36
2.2.1	TRANSFORMATION UND ANZUCHT VON BAKTERIEN.....	36
2.2.1.1	Transformation von Bakterien .....	36
2.2.1.2	Anzucht von Bakterien.....	37
2.2.1.2.1	Vorkultur .....	37
2.2.1.2.2	Hauptkultur .....	37
2.2.1.3	Glycerolstock .....	37
2.2.1.4	Medien zur bakteriellen Kultur .....	37
2.2.1.4.1	Agarplatten.....	38
2.2.1.4.2	Antibiotika .....	38
2.2.2	PLASMID DNA PRÄPARATION .....	38
2.2.3	PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER NUCLEINSÄURE KONZENTRATION .....	39
2.2.4	AGAROSEGELELEKTROPHORESE.....	40
2.2.5	ISOLIERUNG VON DNA FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN .....	41
2.2.6	AUFREINIGUNG UND KONZENTRIERUNG VON DNA .....	42
2.2.7	SUBCLONING VON DNA.....	42
2.2.7.1	Restriktionsverdau .....	42
2.2.7.2	„Blunt-ended“ und „sticky-ended“ Fragmente .....	43
2.2.7.3	Dephosphorylierung von DNA 5'Enden.....	44
2.2.7.4	Ligation .....	44
2.2.8	ZELLKULTUR.....	45
2.2.9	TRANSIENTE TRANSFEKTION .....	46
2.2.9.1	Calcium-Präzipitation .....	46
2.2.9.2	Lipofektion.....	46
2.2.10	HERSTELLUNG STABILER ZELLINIEN .....	47
2.2.10.1	Herstellung stabiler Zelllinien mit einem retroviralen Transduktionssystem .....	47
2.2.11	SURVIVAL-ASSAY .....	48



2.2.11.1	32D und BaF3 Zellen.....	48
2.2.11.2	NIH 3T3 Zellen.....	49
2.2.12	TRYPANBLAUFÄRBUNG.....	49
2.2.13	SDS – POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS – PAGE) .....	49
2.2.14	IMMUNOBLOT.....	51
2.2.15	IMMUNOPRÄZIPITATION.....	52
2.2.16	“IN VITRO” KINASE-ASSAY .....	53
2.2.16.1	MEK Kinase-Assay.....	53
2.2.16.2	PI3K Kinase-Assay.....	53

### **3 ERGEBNISSE** **55**

<b>3.1</b>	<b>IL-3 INDUZIERTES ZELLWACHSTUM UND -ÜBERLEBEN IST VON MEK UND PI3K SIGNALWEGEN ABHÄNGIG .....</b>	<b>55</b>
<b>3.2</b>	<b>EXPRESSION VON AKTIVIERTEM MEK FÜHRT ZUR SUPPRESSION DER APOPTOSE.....</b>	<b>60</b>
<b>3.3</b>	<b>DIE SUPPRESSION DER APOPTOSE DURCH MEK1 GEHT MIT PROLONGIERTER AKTIVITÄT VON ERK1 UND -2 EINHER UND ERFORDERT DIE KINASEAKTIVITÄT VON MEK1.....</b>	<b>65</b>
<b>3.4</b>	<b>EXPRESSION VON AKTIVIERTEM ERK FÜHRT ZUR SUPPRESSION DER APOPTOSE.....</b>	<b>68</b>
<b>3.5</b>	<b>INHIBITOREN DER PI3K AKTIVIERUNG BEEINFLUSSEN DIE ANTI-APOPTOTISCHE WIRKUNG VON MEK1 NEGATIV .....</b>	<b>69</b>
<b>3.6</b>	<b>EXPRESSION VON AKTIVIERTEM MEK FÜHRT ZUR AKTIVIERUNG VON PI3K UND AKT.....</b>	<b>73</b>
<b>3.7</b>	<b>C-RAF BESITZT ANTI-APOPTOTISCHE POTENZ, DIE MEK UND AKT ABHÄNGIG VERMITTELT IST</b>	<b>77</b>

### **4 DISKUSSION** **82**

### **5 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY** **99**

<b>5.1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>99</b>
<b>5.2</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>100</b>

### **6 LITERATUR** **101**

# 1 Einleitung

## 1.1 Apoptose - sterben um zu leben

Sterben um zu leben – dies klingt paradox, dennoch ist das Absterben bestimmter Zellen für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der körperlichen Integrität eines vielzelligen Organismus unerlässlich. In Vertebraten ist der systematische Tod bestimmter Zellen schon früh, in nahezu allen Geweben beobachtet (Glücksmann 1950), und vor allem in der Entwicklung des Nervensystems (Hamburger and Oppenheim 1982) und des Immunsystems (Duvall and Wyllie 1986) im Detail beschrieben worden. Die Eliminierung erfolgt bei im Überschuss produzierten Zellen, Zellen die ihre Funktion erfüllt haben oder funktionslos sind, sowie bei solchen, die sich fehlerhaft entwickelt haben oder von denen potentiell eine Schädigung ausgeht. Als Beispiele seien das Endometrium genannt, das in der proliferativen Phase des Menstruationszyklus abgestoßen wird, der Untergang der Müllerschen Gänge in der männlichen Geschlechtsentwicklung, die Eliminierung von Neuronen der Retina, die keine synaptischen Verbindungen eingehen oder die Elimination von autoreaktiven T-Zellen im Thymus (Ellis, Yuan et al. 1991). Die Bedeutung des kalkulierten Todes einiger Zellen für die Integrität des Organismus zeigt sich in den vielfältigen schweren Erkrankungen, wie Autoimmun- und degenerativen Erkrankungen sowie malignen Neoplasien, zu deren Entstehung die Störung dieses physiologischen Mechanismus signifikant beiträgt oder Voraussetzung ist (Cory 1995; Yang and Korsmeyer 1996; Strasser, Huang et al. 1997; Kitada, Pedersen et al. 2002).

Erstmalig subsumierten Kerr et al 1972 (Kerr, Wyllie et al. 1972) die typischen morphologischen Erscheinungen des Zelluntergangs unter dem Begriff Apoptose. Apoptose leitet sich von den griechischen Wörtern „apo“ – weg und „ptosis“ – Fall ab, es beschreibt den Fall welcher Blätter. Apoptotische Zellen zeigen auf ihrem Weg in den Tod charakteristische Veränderungen. Das Chromatin kondensiert, die Zellmembran trennt sich vom Zytoplasma, die Zellen schrumpfen, runden sich ab und verlieren den Anschluss an die Peripherie, die Zellen fragmentieren und im intakten Organismus werden die Zellreste nachfolgend phagozytiert, ohne die Zeichen einer Entzündung (Kerr, Wyllie et al. 1972). Zugrunde liegen diesen Prozessen biochemische Veränderungen. Stimuli, die zur Auslösung von Apoptose führen, aktivieren proteolytische Enzyme, die sogenannten Caspasen, die wiederum durch Spaltung andere zelluläre Proteine aktivieren oder inaktivieren. In letzter Folge kommt es zur Aktivierung von Endonukleasen und der internukleosomalen Spaltung der genomischen DNA, die nach Ethidiumbromidfärbung in Form einer „Leiter“ im Agarosegel sichtbar

gemacht werden kann. Durch diesen Schritt wird der Prozess des Zelltods irreversibel gemacht.

Apoptose wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet, was dem stereotypen Ablauf des Zelltodes Rechnung trägt, aber auch der Erkenntnis, dass die Apoptose genetisch kodiert und determiniert ist. *Bcl-2* wurde als erstes bedeutendes, Apoptose-regulierendes Gen des Säugers entdeckt (Vaux, Cory et al. 1988). Es ist das Onkogen, das aus einer t(14;18) Translokation resultiert und zur Entstehung des folliculären (zentroblastischen) Non-Hodgkin-Lymphom führt (Tsujimoto, Finger et al. 1984; Bakhshi, Jensen et al. 1985; Cleary, Smith et al. 1986). Im Gegensatz zu anderen bekannte Onkogenen schützte die Expression der *Bcl-2* cDNA in einer IL-3 abhängigen prä-B-Zelllinie diese nach Entzug des Wachstumsfaktors vor Apoptose, ohne jedoch eine Proliferation zu initiieren (Vaux, Cory et al. 1988).

Wegbereitend für das Verständnis der Apoptose waren Untersuchungen am Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Die Transparenz des Wurms gestattet es, lichtmikroskopisch das Schicksal jeder einzelnen Zelle nachzuvollziehen. Von den 1090 Zellen, die während der Entwicklung des Hermaphroditen entstehen, sind 131 zum Sterben bestimmt. Genetische Analysen von *C. elegans* identifizierten Regulatoren der Apoptose, ordneten diese hierarchisch und bahnten den Weg zur Entdeckung funktioneller Homologe in anderen Organismen, einschließlich der Säuger. Vier Gene, *egl-1*, *ced-4*, *ced-3* und *ced-9*, konnten als die Hauptakteure des programmierten Zelltodes in *C. elegans* ausgemacht werden. Eine „gain-of-function“ Mutante von *egl-1* zeigt einen Phänotyp, der nicht zur Eiablage fähig ist, und damit für das Gen namensgebend wurde; egl: egg laying defective. „Loss-of-function“ Mutanten von *ced-4* und *ced-3*, aber auch von *egl-1* führen zum Überleben totgeweihter Zellen, die dadurch funktionsfähig bleiben und sogar differenzieren können. Ced steht in diesem Fall für cell death abnormal. Die Funktion von *Egl-1*, *Ced-4* und *Ced-3* ist für die Viabilität des Gesamtorganismus ohne Bedeutung. Ganz im Gegensatz zu *Ced-9*. Mutanten mit funktionslosem *Ced-9* sind steril und haben eine hohe Letalität, die sich auf ektoper Zelluntergänge gründet. Weitere genetische Versuche mit Doppelmutanten deckten die hierarchische Anordnung der Gene und Genprodukte in der Regulation der Apoptose auf. Demnach sind *Ced-4* und *Ced-3* für den Vollzug der Apoptose notwendig, wobei *Ced-4* oberhalb von *Ced-3* agiert. *Ced-9* entfaltet seinen anti-apoptotischen Effekt über Inhibition von *Ced-4*, wird aber seinerseits durch *Egl-1* gehemmt, welches somit pro-apoptotisch wirkt (Metzstein, Stanfield et al. 1998).

Inzwischen sind die Homologe dieser Gene in Säugern und anderer Organismen identifiziert worden. Das humane Homolog von *ced-9* ist das oben beschriebene *bcl-2* (Hengartner and Horvitz 1994). EGL-1 zeigt strukturelle und funktionelle Homologien zu den pro-apoptotischen „BH3-only“ Bcl-2 Familienmitgliedern (Conradt and Horvitz 1998), welche weiter unten besprochen werden. Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE) konnte als das Homolog von Ced-3 identifiziert werden (Yuan, Shaham et al. 1993). ICE gehört zu den Caspasen, eine Familie von Cystein Proteasen. In komplexen Organismen, wie den Säugern, gibt es zwei Signalwege, die in Reaktion auf unterschiedliche Signale zum programmierten Tod von Zellen führen. Der extrinsische Weg wird nach Ligandenbindung an Todesrezeptoren (z.B. der TNF Rezeptor Familie) beschritten und führt zur direkten Rekrutierung der Caspasen, den Exekutoren der Apoptose, an den Rezeptorkomplex, wo auch ihre Aktivierung stattfindet. Den anderen Weg beschreitet die Zelle auf eine Vielzahl von intrinsischen Todessignalen hin. Dieser Weg führt über das Mitochondrium und wird vorwiegend von der Familie der Bcl-2 Homologen reguliert, bevor er auch in die Aktivierung der Caspasen mündet. In Reaktion auf eine Schädigung der DNA vermag der Tumorsuppressor p53 die Apoptose einzuleiten, wahrscheinlich über die Expression der pro-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder Bax (Miyashita and Reed 1995), Noxa und Puma (Oda, Ohki et al. 2000; Nakano and Vousden 2001; Yu, Zhang et al. 2001) und anderen pro-apoptotischen Proteinen. Apoptose, ausgelöst durch Entzug von Wachstumsfaktoren geht mit der Aktivierung von BAD und Bim einher (Huang and Strasser 2000; Cory and Adams 2002).

Die stets uniformen morphologischen Veränderungen der sterbenden Zelle, gleich welches der vielfältigen Signale sie in den Tod schickt, beruhen auf der Rekrutierung eines universellen apoptotischen Apparates, der zur Aktivierung von Caspasen führt, und der unter Kontrolle von Todes- und Überlebenssignalwegen steht, die im folgenden besprochen werden sollen.

## **1.2 Caspasen - Feinde im Innern**

Apoptose wird durch eine Vielzahl verschiedener Ereignisse und Signale ausgelöst. Erstaunlicherweise ist dennoch das morphologische Erscheinungsbild der sterbenden Zelle im wesentlichen immer das gleiche, was auf die Existenz eines konservierten Mechanismus für die Auslösung und Vollstreckung des apoptotischen Zelltods schließen lässt (Jacobson, Burne et al. 1994). In *C. elegans* erfüllt CED-3 wichtige Teile dieser Funktion. Es ist für alle während der Wurmentwicklung stattfindenden Zellsterbevorgänge erforderlich (s.o.). Die Identifizierung von Interleukin 1 $\beta$  converting enzyme (ICE) als ein CED-3 verwandtes Protein in den Säugern (Yuan, Shaham et al. 1993) bahnte den Weg für die Charakterisierung

einer Familie von Proteasen mit tragender Bedeutung für die Apoptose aber auch für die Inflammation. Diese Gruppe von Cystein Proteasen wird aufgrund ihrer Substratspezifität für proteolytische Spaltung nach Asparaginsäure als „Caspasen“ bezeichnet (Alnemri, Livingston et al. 1996). Phylogenetisch lassen sich die Caspasen in zwei Subfamilien unterteilen. Die eine Gruppe ist eng verwandt mit ICE und erfüllt ihre Funktion maßgeblich in der Inflammation, vorwiegend in der posttranslationellen Modifikation und „Reifung“ von Cytokinen. Die andere umfasst Proteasen mit apoptotischer und damit CED-3 ähnlicher Funktion (Zimmermann, Bonzon et al. 2001). Caspasen zeigen Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz, Struktur und Substratspezifität. Sie werden als Proenzyme gebildet, die sich aus vier Domänen zusammensetzen: einer aminoterminalen Prodomäne, einer großen und einer kleinen Untereinheit, die durch eine Aspartat beherbergende Verbindungsregion getrennt sind (Nicholson and Thornberry 1997). Die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung zwischen den Domänen. Die Prodomäne wird entfernt, die kleine und große Untereinheit getrennt, welche sich daraufhin zu einem aktiven Enzymkomplex zusammenlagern. Die Kristallstruktur von aktiver Caspase-1 (ICE), zeigt zwei Monomere, bestehend aus einer großen und kleinen Untereinheit, die sich zu einem Homodimer zusammenlagern. Die aktiven Abschnitte opponieren in ihrer Anordnung und werden anteilig sowohl von der kleinen, als auch der großen Untereinheit gebildet. Die Homodimerisation wird durch hydrophobe Interaktion zwischen zwei komplexen  $\beta$ -Faltblattstrukturen vermittelt (Walker, Talanian et al. 1994; Wilson, Black et al. 1994). Inzwischen ist auch die Struktur von Caspase-3 (Rotonda, Nicholson et al. 1996; Mittl, Di Marco et al. 1997), Caspase-7 (Wei, Fox et al. 2000), Caspase-8 (Blanchard, Kodandapani et al. 1999; Watt, Koeplinger et al. 1999) und Caspase-9 (Renatus, Stennicke et al. 2001) aufgeklärt. Es zeigte sich, dass der aktive Abschnitt und die Substratbindungsgrube eine zwischen den Caspasen konservierte Konformation besitzt. Sie wird von vier hervorstehenden Schleifen an den jeweils kontralateralen Enden der  $\beta$ -Faltblattstruktur gebildet (Shi 2002).

Der aktive Abschnitt aller Caspasen trägt die konservierte Pentapeptid-Sequenz Gln-Ala-Cys-X-Gly, wobei X Arginin, Glutamin oder Glycin ist. Caspasen sind hochspezifische Proteasen, die vornehmlich nach Aspartat spalten. Vier aminoterminalen Aminosäuren dienen als Erkennungssequenz für die Caspasen und bestimmen somit die Substratspezifität (Thornberry, Rano et al. 1997). Für einige Caspasen ist auch die Spaltung nach Glutamat beschrieben worden (Hawkins, Yoo et al. 2000; Srinivasula, Hegde et al. 2001).

Caspasen werden durch proteolytische Spaltung aktiviert. Die Spaltstellen entsprechen in der Sequenz Caspase-Spaltmotiven. Die Apoptose auslösenden Caspasen lassen sich in

Initiatorcaspasen, wie Caspase-2, -8, -9 und -10, und die Effektorcaspasen, Caspase-3, -6 und -7 gliedern. Die Effektorcaspasen werden mittels proteolytischer Spaltung durch die Initiatorcaspasen aktiviert, während diese durch Autokatalyse und allosterische Mechanismen in ihren aktiven Zustand überführt werden (Nicholson and Thornberry 1997; Thornberry, Rano et al. 1997). Bei der Aktivierung der Initiatorcaspasen ist die variable Prodomäne von besonderer Bedeutung. Sie ist bei den Initiatorcaspasen länger und trägt Sequenzen, die eine Interaktion mit Aktivator- bzw. Adaptermolekülen und damit eine Regulation erlauben (s.u.) (Nicholson and Thornberry 1997; Thornberry, Rano et al. 1997; Ashkenazi and Dixit 1998).

Sowohl extrinsische als auch intrinsische apoptotische Signale führen über Rekrutierung der Caspasen zur Exekution der Zelle. Als extrinsisches Signal ist die Bindung eines Liganden an einen Todesrezeptor zu verstehen. Zu den Todesrezeptoren gehört z.B. die TNF (tumor necrosis factor) Rezeptor Superfamilie, deren Angehörige ähnliche Cystein reiche extrazelluläre Domänen besitzen (Smith, Farrah et al. 1994; Gruss and Dower 1995). Zusätzlich tragen die Todesrezeptoren an ihrem zytoplasmatischen carboxyterminalen Ende eine sogenannte „death domain“ (DD), die die Rekrutierung des apoptotischen Apparates ermöglicht (Tartaglia, Ayres et al. 1993). Exemplarisch für die stetig wachsende Zahl der Todesrezeptoren soll die Vermittlung eines apoptotischen Signals anhand der am besten charakterisierten Rezeptoren CD95/Fas und TNFR1 erläutert werden. Wie die Rezeptoren, so gehören auch die Liganden zu einer Supergenfamilie, der TNF Superfamilie (Smith, Farrah et al. 1994; Gruss and Dower 1995). Der trivalente Ligand bindet an drei CD95 Moleküle, die miteinander assoziieren, was zu einer Annäherung der „death domains“ führt. Unter diesen Bedingungen lagert sich seinerseits über eine „death domain“ ein Adaptermolekül FADD (Fas associated death domain) an den Komplex an (Boldin, Mett et al. 1995; Chinnaiyan, O'Rourke et al. 1995). Das Adaptermolekül FADD trägt eine weitere Interaktionsdomäne, die DED (death effector domain), die sich auch in der Prodomäne der Initiatorcaspasen-8 und -10 findet (Boldin, Goncharov et al. 1996; Chinnaiyan, Tepper et al. 1996; Muzio, Stockwell et al. 1998; Acehan, Jiang et al. 2002). Vermittelt durch die DED kommt es zu einer Oligomerisierung von Caspase-8 oder -10 am Rezeptorkomplex und unter Autokatalyse zur Aktivierung der Protease (Kischkel, Hellbardt et al. 1995; Muzio, Stockwell et al. 1998; Bodmer, Holler et al. 2000; Kischkel, Lawrence et al. 2000; Sprick, Weigand et al. 2000; Kischkel, Lawrence et al. 2001; Wang 2001). Die aktiven Caspasen sind nun in der Lage Effektorcaspasen, sowie weitere Substrate proteolytisch zu spalten und den apoptotischen Zelltod weiter voranzutreiben. Der Komplex aus Rezeptor, Adaptermolekülen und Caspasen,

sowie anderen Proteinen wird als DISC (death-inducing signaling complex) bezeichnet (Medema, Scaffidi et al. 1997).

Auch nach Ligandenbindung am TNF Rezeptor 1 (TNFR1) kommt es zur DISC Bildung. Wiederum assoziieren drei Rezeptoren, die jedoch nicht direkt FADD über ihre „death domain“, sondern indirekt über ein weiteres Adapterprotein TRADD (TNF receptor associated death domain) binden (Hsu, Xiong et al. 1995). TRADD integriert die verschiedenen Signalwege, die vom TNFR1 ausgehen und vermittelt diese über DD abhängige Rekrutierung sekundärer Adaptoren. Die Bindung von FADD führt in beschriebener Weise zur Aktivierung der Caspasen, während es über die sekundären Adaptoren RIP (receptor interacting protein) und TRAF2 (TNF receptor associated factor2) zur Stimulation der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 kommt (Hsu, Huang et al. 1996; Hsu, Shu et al. 1996). Unter dem transkriptionellen Einfluss dieser beiden ist paradoxerweise eine Hemmung der Apoptose möglich (Ashkenazi and Dixit 1998).

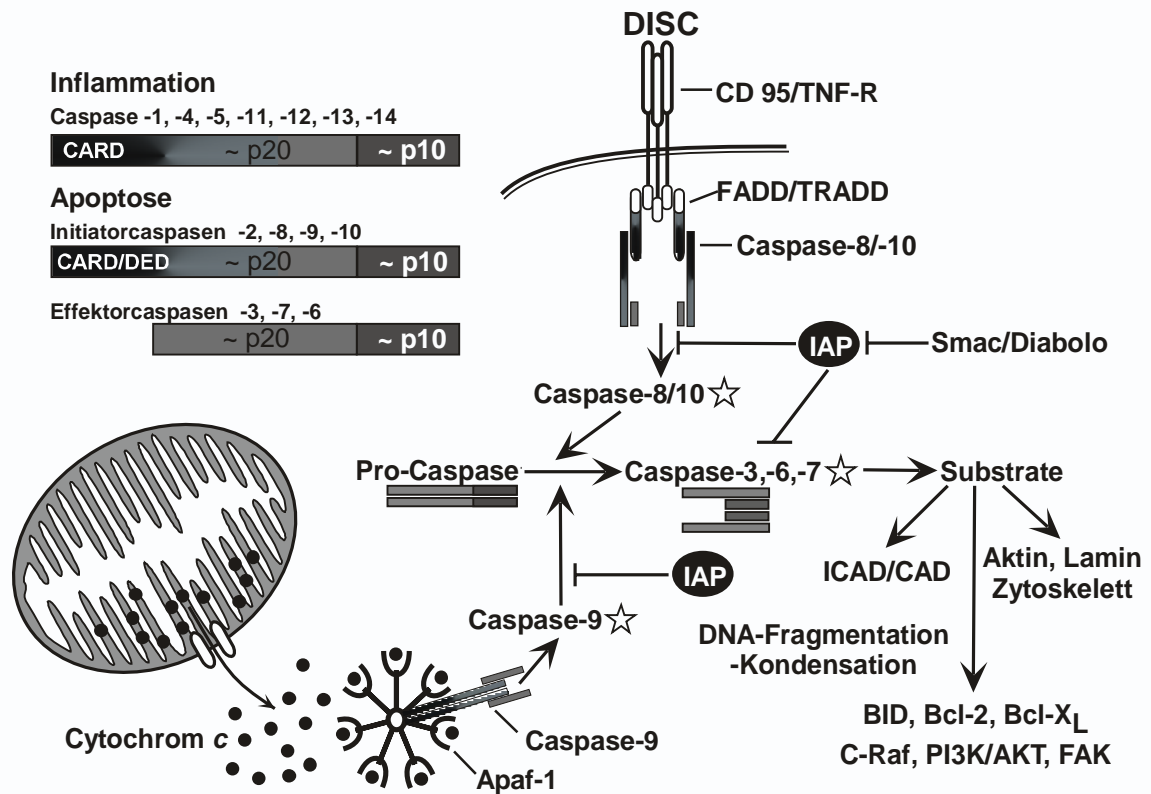
Intrinsische apoptotische Signale führen vorwiegend über pro-apoptische Homologe von Bcl-2, auf mitochondrieller Ebene zur Rekrutierung und Aktivierung der Caspasen. Entscheidend für die Aktivierung der Proteasen auf diesem Niveau ist die Freisetzung unterschiedlicher Moleküle aus dem intermembranösen Spalt des Mitochondrium und die Akkumulation weiterer Adapterproteine zu einem sogenannten Apoptosome (Adams and Cory 2002). Apaf-1 ist ein tragendes Element des Komplexes. Freigesetztes Cytochrom *c* bindet an die carboxyterminalen WD40 Repeats (Abfolge von Tryptophan und Aspartat), woraufhin dATP oder ATP mit der zentralen Nucleotid Bindungsdomäne (NBD, auch NOD nucleotide-binding oligomerization domain) assoziiert. Über die aminoterminalen CARD (caspase recruitment domain) wird Caspase-9, die in der Prodomäne ebenfalls diese invariable Sequenz trägt, aquiriert (Saleh, Srinivasula et al. 1999; Zou, Li et al. 1999; Cain, Bratton et al. 2000; Jiang and Wang 2000). Die dreidimensionale Darstellung des Apoptosome zeigt eine radspeichenförmige heptamere Anordnung von Apaf-1. Die CARD Domäne zeigt nach innen, die WD40 Repeats nach außen (Acehan, Jiang et al. 2002). Aktivierte Caspase-9 liegt als Homodimer vor. Anders als die anderen Caspasen hat der Dimer jedoch nur einen aktiven Abschnitt (Renatus, Stennicke et al. 2001). Die inaktiven im Zentrum des Apoptosome gebundenen Caspase-9 Monomere rekrutieren zusätzliche Procaspasen und formen das Holenzym (Acehan, Jiang et al. 2002). Hierin kommt es durch antiparallele Anlagerung der Monomere zur Aktivierung in asymmetrischen Dimeren (Adams and Cory 2002). So aktivierte Caspase-9 vermag dann Effektorcaspasen zu prozessieren.

Extrinsischer und intrinsischer Signalweg konvergieren mit Aktivierung der Caspase-3, -6 oder -7 in einer gemeinsamen Endstrecke. Einen weiteren Konvergenzpunkt, der beiden an sich nebeneinander stehenden Caspase-Wege bildet Bid. Bid, ein „BH3only“ Mitglied der Bcl-2 Familie wird, in Reaktion auf Todesrezeptoren vermittelte Aktivierung von Caspase-8, gespalten (Li, Zhu et al. 1998; Luo, Budihardjo et al. 1998; Gross, Yin et al. 1999; Yin, Wang et al. 1999). Das trunkierte Bid (tBid) interagiert mit den pro-apoptotischen Bcl-2 Homologen BAX und BAK und bewirkt die Freisetzung von Cytochrom *c* aus dem Mitochondrium (Lazebnik, Takahashi et al. 1995; Orth, Chinnaiyan et al. 1996; Rao, Perez et al. 1996; Eskes, Desagher et al. 2000; Wei, Lindsten et al. 2000). Mit der Assoziation des Apoptosome kommt es zur Aktivierung des intrinsischen Caspase-Weges, ausgelöst durch Bindung eines Liganden an den Todesrezeptor.

Das Erscheinungsbild einer sterbenden Zelle ist zu einem großen Teil Abbild der Wirkung von Effektorcaspasen. Die Substrate der aktivierten Apoptose spezifischen Caspasen sind Proteine, die die Struktur und Funktion der Zelle aufrechterhalten. Lamine, die Hauptkomponenten des nukleären Skeletts, werden von Caspase-6 gespalten (Lazebnik, Takahashi et al. 1995; Orth, Chinnaiyan et al. 1996; Rao, Perez et al. 1996), ebenso wie Aktin, Bestandteil des Zytoskeletts und Aktin-regulierende Proteine, wie  $\alpha$ -Fodrin,  $\alpha$ II-,  $\beta$ II-Spektrin und Gelsolin (Cryns, Bergeron et al. 1996; Mashima, Naito et al. 1997; Brockstedt, Rickers et al. 1998; Wang, Miura et al. 1998). Eine Reihe von Proteinen der DNA-Synthese und -Reparatur werden unter apoptotischen Bedingungen von Caspasen gespalten (Rheaume, Cohen et al. 1997; Ubeda and Habener 1997; Flygare, Armstrong et al. 1998; Schwab, Leist et al. 1998). Internukleosomale DNA-Fragmentation und nukleäre Kondensation wird durch Aktivierung der Caspase-activated DNase (CAD/DFF40) nach Proteolyse und Dissoziation des Inhibitors ICAD (DFF45) durch Caspase-3 erreicht (Liu, Zou et al. 1997; Sakahira, Enari et al. 1998).

Aber auch Proteine, die an der Regulation der Apoptose und der Zellproliferation beteiligt sind werden beeinflusst. Bid, ein pro-apoptotisches Bcl-2 Homolog, wird von Caspase-8 gespalten und dadurch aktiviert (Li, Zhu et al. 1998; Luo, Budihardjo et al. 1998), während die anti-apoptotischen Familienmitglieder Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> inaktiviert werden (Cheng, Kirsch et al. 1997; Xue and Horvitz 1997; Clem, Cheng et al. 1998; Grandgirard, Studer et al. 1998). Die mitogenen Proteine PI3K, AKT, C-Raf und Focal Adhesion Kinase (FAK) werden unter dem Einfluss von Caspasen inaktiviert und damit die Proliferation der Zellen gehemmt (Wen, Fahrni et al. 1997; Gervais, Thornberry et al. 1998; Levkau, Herren et al. 1998; Widmann, Gibson et al. 1998).





**Abbildung 1: Familie der Caspasen und die Inhibitoren apoptotischer Proteine (IAP)**

Caspasen zeigen Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz, Struktur und Substratspezifität. Phylogenetisch lassen sie sich in zwei Subfamilien unterteilen, welche Funktionen in der Inflammation oder Apoptose erfüllen. Apoptose auslösenden Caspasen gliedern sich weiter in Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen. Die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung zwischen den Domänen einer Pro-Caspase. Sowohl extrinsische apoptotische Signale über einen Todesrezeptor als auch intrinsische Signale am Mitochondrium führen über Rekrutierung der Caspasen zur Exekution der Zelle. Auf mitochondrieller Ebene bildet sich das radspeichenförmige sogenannte Apoptosom aus Apaf-1 und weiteren Adapterproteinen. Extrinsischer und intrinsischer Signalweg konvergieren mit Aktivierung der Caspase-3, -6 oder -7. Deren Substrate sind Proteine, die die Struktur und Funktion der Zelle aufrechterhalten. Kontrolle der aktivierten Caspasen unterliegt der Familie der IAP, welche auf verschiedenen Ebenen eine weitere Aktivierung der Caspase Kaskade unterbinden.

### 1.3 IAP – Inhibitoren der Apoptose

Die proteolytische Spaltung eines Proteins ist endgültig. Das gesplattene Protein kann nur durch erneute Transkription und Translation wiederhergestellt werden. Dementsprechend wichtig ist es, dass die Caspasen einer strengen Kontrolle unterliegen. Dazu gehören transkriptionelle Regulation und posttranslationelle Modifikation (Earnshaw, Martins et al. 1999), aber auch die Kontrolle ihrer Aktivierung durch bestimmte Signale und die Notwendigkeit der Bildung großer Proteinkomplexe (z.B. Apoptosom). Doch selbst nachdem die Caspasen aktiviert worden sind, ist der „point of no return“ noch nicht überschritten. Die Kontrolle der aktivierten Caspasen unterliegt der Familie der IAPs (inhibitors of apoptosis proteins). IAPs wurden ursprünglich im baculoviralen Genom entdeckt bei der Suche nach Regulatoren der Wirtszellviabilität (Crook, Clem et al. 1993; Birnbaum, Clem et al. 1994).

Mehrere Säuger-IAPs sind beschrieben worden. Sie interagieren mit der Initiatorcaspase-9 und den Effektorcaspasen –3 und –7 (Deveraux and Reed 1999). Die funktionelle Untereinheit der IAPs, die für die Apoptosesuppression benötigt wird, ist die BIR- (baculoviral IAP repeat) Domäne, von denen die am besten beschriebenen Säuger-IAPs, XIAP, c-IAP1 und c-IAP2 je drei (BIR1-3) besitzen. BIR3 dieser IAPs inhibiert aktivierte Caspase-9, während BIR1 und BIR2 selektiv Caspase-3 und –7 inaktivieren (Fesik and Shi 2001; Shi 2002). Die Inaktivierung der Caspasen beruht vermutlich auf der Bindung von IAP an das aktive Zentrum, was eine Substratbindung unmöglich macht (Chai, Shiozaki et al. 2001; Huang, Park et al. 2001; Riedl, Renatus et al. 2001; Srinivasula, Hegde et al. 2001).

IAPs werden ihrerseits von anderen Proteinen in ihrer Fähigkeit Caspasen zu binden beeinflusst. Smac (second mitochondria-derived activator of caspases), auch DIABLO (direct IAP-binding protein with low pI) genannt, gehört zu dieser Gruppe (Du, Fang et al. 2000; Verhagen, Ekert et al. 2000). Auf ein apoptotisches Signal hin wird Smac/DIABLO zusammen mit Cytochrom *c* aus dem intermembranösen Spalt des Mitochondrium entlassen und vermag die IAP vermittelte Inhibition von Initiator- und Effektorcaspasen zu unterbinden (Chai, Du et al. 2000; Srinivasula, Datta et al. 2000).

#### **1.4 Bcl-2 Homologe – „gut“ oder „böse“**

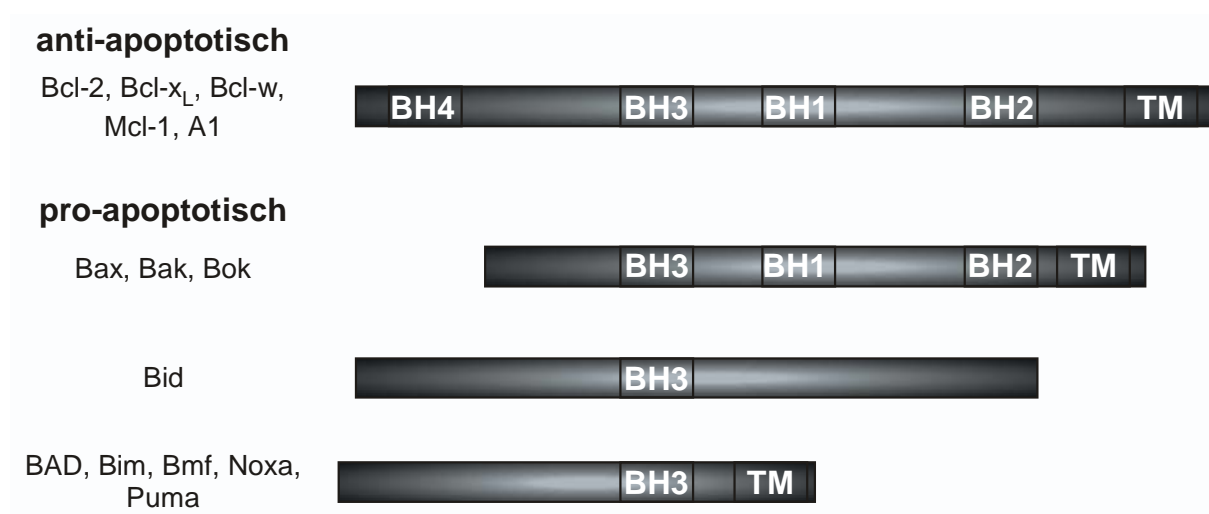
Die Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) Proteinfamilie umfasst in Säugern mindestens 20 Mitglieder. Die Familienzugehörigkeit gründet sich auf Homologie in den BH Domänen (Bcl-2 homology domain). Die Bcl-2 Familienmitglieder besitzen bis zu vier homologe Domänen BH 1-4 (Adams and Cory 1998; Kelekar and Thompson 1998; Reed 1998). Strukturell und funktionell lässt sich die Familie in drei Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe bilden die anti-apoptotischen Familienmitglieder. Die Gruppe umfasst unter anderen Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-w, sowie A1 und Mcl-1. Neben den Domänen BH 1-4 besitzen sie eine carboxyterminale hydrophobe Domäne, durch die eine Insertion in die Membran des Mitochondriums, des endoplasmatischen Retikulums und des Zellkerns möglich ist (Hockenbery, Nunez et al. 1990; Krajewski, Tanaka et al. 1993; de Jong, Prins et al. 1994; Zhu, Cowie et al. 1996). Bcl-2 ist auch in vitalen Zellen ein integrales Membranprotein (Janiak, Leber et al. 1994), während Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-w erst nach einem zytotoxischen Signal dort zu finden sind (Cory and Adams 2002). Die dreidimensionale Struktur der Bcl-2 Proteine offenbart eine hydrophobe Tasche, gebildet von BH1, BH2 und BH3, in die die BH3  $\alpha$  Helix eines interagierenden „BH3-only“ Familienmitgliedes inserieren kann, was zur Hemmung der pro-apoptotischen Funktion führt (Sattler, Liang et al. 1997).

Wie im Wurm *C. elegans* durch CED-9, so scheint auch in Säugern die Präsenz zumindest eines Bcl-2 Homolog zum Schutz vor dem programmierten Tod einer Zelle notwendig zu sein. (McDonnell, Deane et al. 1989; Sentman, Shutter et al. 1991; Strasser, Harris et al. 1991; Strasser, Whittingham et al. 1991; Ogilvy, Metcalf et al. 1999). Durch „Knock-out“ Studien erhielt man Hinweise darauf, welches Bcl-2 Homolog für welche Zelle, oder welches Organ von Bedeutung ist, denn die Inaktivierung von Bcl-2 homologen Genen führt zur Apoptose der Zellen, in denen der Verlust nicht durch ein anderes Homolog kompensiert werden kann. Bcl-2 defiziente Mäuse zeigen polycystische Nieren, hypopigmentiertes Haar und einen fulminanten Niedergang lymphoider Zellen (Veis, Sorenson et al. 1993), während Bcl-x<sub>L</sub> „Knock-out“ Mäuse an inadäquater Apoptose erythrozytärer und neuronaler Zellen leiden (Motoyama, Wang et al. 1995). Wie diese Bcl-2 Subfamilie ihren anti-apoptotischen Effekt vermittelt ist noch immer Gegenstand der Diskussion und soll zusammen mit der Bax Gruppe weiter unten besprochen werden.

Eine Gruppe der pro-apoptotischen Familienmitglieder repräsentieren die sogenannten „BH3-only“ Proteine. Sie besitzen lediglich in der BH3 Domäne Homologie zu den anderen Familienmitgliedern, was zur Namensgebung führte. Egl-1 ist das „BH3-only“ Homolog des Nematoden *C. elegans*. Es induziert Apoptose durch direkte Interaktion mit CED-9, dem Bcl-2 Homolog (Conradt and Horvitz 1998). Egl-1 stehen in den Säugern mehrere „BH3-only“ Proteine gegenüber, was eine differenziertere Regulation des Zelltodes erlaubt (Cory and Adams 2002). Die „BH3-only“ Proteine gelten als „Wächter“ über die Zelle, die auf Schädigung und bestimmte zytotoxische Signale reagieren (Adams and Cory 2001). Noxa und Puma werden durch p53 in Reaktion auf eine DNA Schädigung induziert (Oda, Ohki et al. 2000; Nakano and Vousden 2001; Yu, Zhang et al. 2001), während der Verlust von Bim Lymphozyten resistent gegen Zytokinentzug, Calciumeinstrom und Taxol, aber nicht gegen  $\gamma$ -Bestrahlung macht (Bouillet, Metcalf et al. 1999). Bmf scheint für den Tod nach Lösung von der exogenen Matrix (Anoikis) notwendig zu sein (Puthalakath, Villunger et al. 2001). An der Transduktion zytotoxischer Signale von TNF Rezeptoren ist Bid beteiligt (Li, Zhu et al. 1998; Luo, Budihardjo et al. 1998; Gross, Yin et al. 1999; Han, Bhalla et al. 1999).

Diese potenten pro-apoptotischen Proteine sind in ihrer Aktivität streng kontrolliert. Noxa und Puma stehen, wie bereits erwähnt, unter transkriptioneller Kontrolle, während andere posttranslational reguliert werden. Bim und Bmf sind mit Strukturen des Zytoskeletts assoziiert (Puthalakath, Huang et al. 1999; Puthalakath, Villunger et al. 2001). BAD wird nach Phosphorylierung an 14-3-3 Proteine gebunden. Proteolytische Spaltung am

aminoterminalen Ende ist notwendig für die Aktivierung von Bid (Li, Zhu et al. 1998; Luo, Budihardjo et al. 1998).



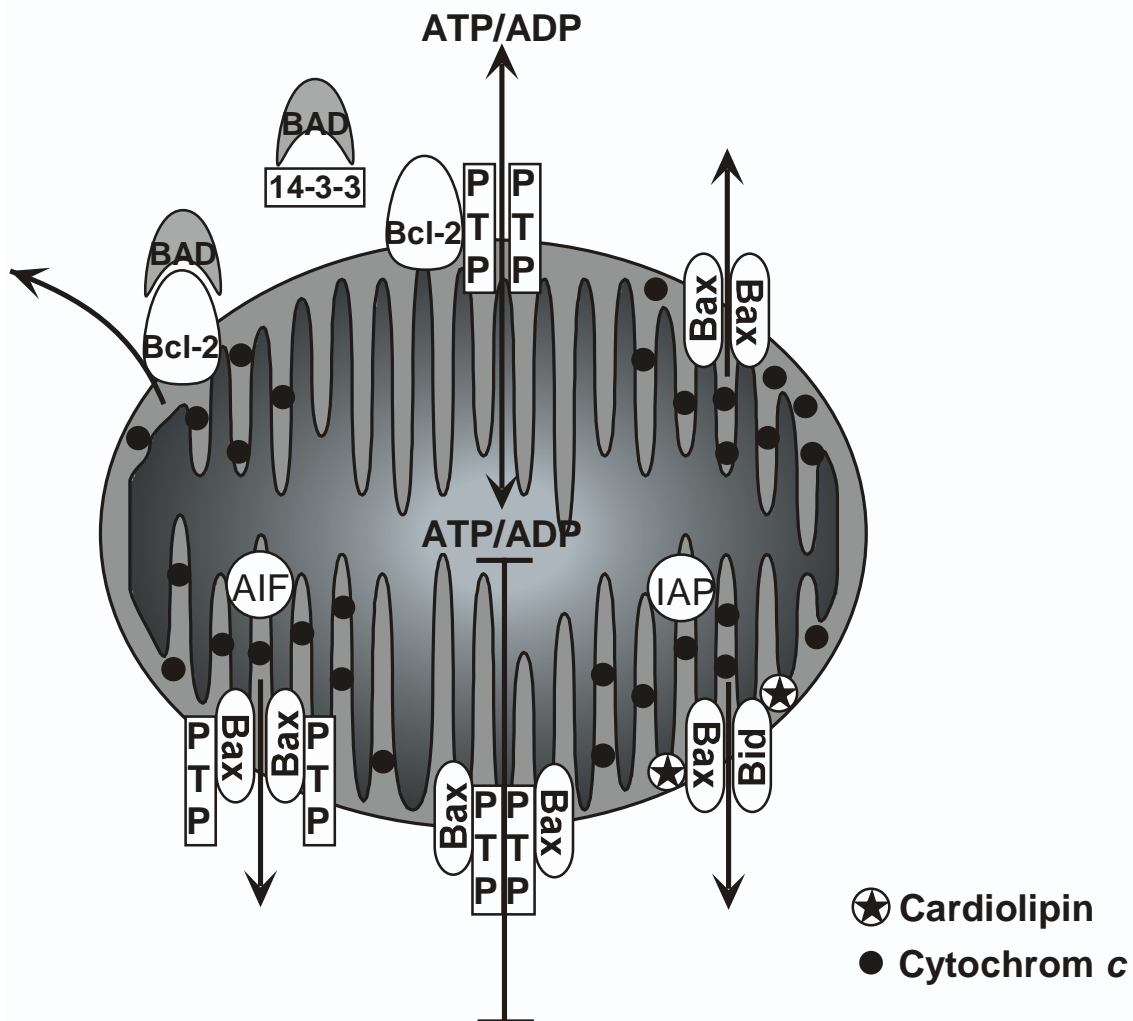
**Abbildung 2: Familie der Bcl-2 Homologe**

Die Bcl-2 Familienmitglieder besitzen bis zu vier homologe Domänen BH 1-4. Strukturell und funktionell lässt sich die Familie in drei Gruppen unterteilen, in anti-apoptotische und pro-apoptotische Familienmitglieder mit der Untergruppe der „BH3-only“ Proteine. Manche Familienmitglieder besitzen eine carboxyterminale hydrophobe Domäne (TM), die eine Insertion in Zellorganellmembranen erlaubt.

Man geht davon aus, dass die „BH3-only“ Gruppe ihren pro-apoptotischen Effekt über direkte Bindung an und Antagonisierung von anti-apoptotischen Bcl-2 Homologen vermittelt. Mutationen in der BH3 Domäne von BAD, einem „BH3-only“ Bcl-2 Familienmitglied, unterbinden die Assoziation mit Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> und damit die Induktion der Apoptose (Ottillie, Diaz et al. 1997; Zha, Harada et al. 1997). Vice versa vermag Wildtyp BAD keine Apoptose in Zellen zu induzieren, die Mutanten von Bcl-x<sub>L</sub> exprimieren, deren BH3 Bindungsstellen verändert sind (Kelekar, Chang et al. 1997).

Zur Entfaltung der pro-apoptotischen Wirkung, zumindest einiger „BH3 only“ Proteine, ist das zusätzliche Vorhandensein von Bax und Bak, die zur zweiten pro-apoptotischen Gruppe gehören, notwendig (Wang, Yin et al. 1996; Cheng, Wei et al. 2001; Zong, Lindsten et al. 2001). Im Gegensatz zu dem „BH3-only“ Stamm zeigen sie mit den zusätzlichen vorhandenen BH1 und BH2 Domänen eine größere strukturelle Übereinstimmung mit Bcl-2. Darüber hinaus besitzen auch sie eine Transmembrandomäne, über die eine Insertion in die mitochondrielle und endoplasmatische Membran potentiell möglich ist. Bax und Bak werden in vielen Zellen exprimiert und die Expression eines dieser Proteine scheint ausreichend zu sein das andere funktionell zu kompensieren. Die simultane

Inaktivierung von Bak und Bok allerdings führt zu einer beeinträchtigten Apoptose in einer Vielzahl von Geweben (Lindsten, Ross et al. 2000; Wei, Zong et al. 2001).



**Abbildung 3: Bcl-2 Homologe regulieren die Apoptose durch Beeinflussung der Integrität des Mitochondrium**

Integrität des Mitochondrium ist von entscheidender Bedeutung für das zelluläre Überleben. Das Mitochondrium birgt eine Reihe Apoptose aktiver Proteine (Cytochrom *c*, AIF, IAP) und sichert die Homöostase von ATP/ADP. Anti-apoptische Bcl-2 Homologe sichern die Integrität vermutlich durch Interaktion mit dem „permeability transition pore“ (PTP). Bindung eines „BH3-only“ Homolgen (BAD) mag zur Sequestration von Bcl-2 und damit Verschluss des PTP und Apoptose führen. Andere pro-apoptische Bcl-2 Homologe (Bid, Bax) vermögen zu oligomerisieren und transmembranöse Kanäle zu bilden, die eine Entweichen pro-apoptischer Substanzen (Cytochrom *c*, AIF). Gleichermaßen wäre dies durch Interaktion mit dem PTP möglich.

Der Schlüssel zum Verständnis der Wirkungsweise der Bcl-2 Familienmitglieder mit BH1-3 Domänen liegt in ihrer Struktur und ihrer Lokalisation an der Membran bestimmter Organellen, insbesondere der des Mitochondriums. Ein gängiges Modell orientiert sich an Befunden in *C. elegans*, wo CED-9, das Bcl-2 Homolog, CED-4 am Mitochondrium bindet und es dadurch inaktiv hält. Nach Bindung von Egl-1, einem „BH3-only“ Protein, an CED-9

wird CED-4 freigesetzt und vermag CED-3, das Wurmhomolog der Säugercaspasen zu aktivieren (Conradt and Horvitz 1998). Die Beobachtung, dass Bcl-2 CED-9 in CED-9 defizienten Würmern ersetzen kann, lässt auf eine ähnliche Wirkungsweise von Bcl-2 in Säugern schließen (Vaux, Weissman et al. 1992; Hengartner and Horvitz 1994). Apaf-1, welches als Säugerhomolog von CED-4 identifiziert werden konnte (Zou, Henzel et al. 1997), ist jedoch kein mitochondriell gebundenes, sondern ein monomeres zytosolisches Protein (Budihardjo, Oliver et al. 1999; Hausmann, O'Reilly et al. 2000). Eine Interaktion mit anti-apoptotischen Bcl-2 Homologen, wie zunächst für Bcl-x<sub>L</sub> beschrieben (Chinnaiyan, O'Rourke et al. 1997; Chaudhary, O'Rourke et al. 1998), ließ sich in weiteren Experimenten nicht mehr bestätigen (Moriishi, Huang et al. 1999). Apaf-1 wird reguliert durch eine lange carboxyterminale Sequenz (WD 40 repeat domain) und aktiviert nach Freisetzung von Cytochrom *c* aus dem Mitochondrium (Hu, Ding et al. 1998; Suzuki, Youle et al. 2000). Die Beobachtung, dass Bcl-2 die Cytochrom *c* Freisetzung unterbinden kann (Kluck, Bossy-Wetzl et al. 1997; Yang, Liu et al. 1997), führte zu der Vorstellung, dass Bcl-2 die Integrität des Mitochondriums erhält (Green and Reed 1998; Gross, McDonnell et al. 1999; Wang 2001). Das Mitochondrium birgt eine Reihe von Proteinen, deren Freisetzung fatale Folgen für eine Zelle hat. Unter anderen finden sich Antagonisten der IAPs, wie Diabolo/Smac oder Omi, sowie das Flavoprotein AIF (apoptosis inducing factor) und Endonuclease G, welche beide an der DNA-Degradation beteiligt sind (Zamzami and Kroemer 2001; Shi 2002).

Hinweise wie die Bcl-2/Bax Untergruppe die Integrität des Mitochondriums zu beeinflussen vermag, lieferte die Aufklärung der 3D-Struktur von Bcl-x<sub>L</sub>. Sie zeigt deutliche Ähnlichkeit zu Poren bildenden bakteriellen Toxinen und lässt mutmaßen, dass die eine BH1 und BH2 Domäne tragenden Bcl-2 Proteine in gleicher Weise Poren in Organellenmembranen bilden (Muchmore, Sattler et al. 1996). *In vitro* konnte die Fähigkeit Poren in Liposomen zu bilden für Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Bax gezeigt werden (Vander Heiden and Thompson 1999). Es bleibt jedoch unklar, ob dies auch *in vivo* möglich ist (Adams and Cory 2001). Ebenso denkbar wäre eine Interaktion mit bestehenden Kanälen, wie der „permeability transition pore“ (PTP), über den Adeninnucleotide und kleine Moleküle verkehren (Crompton 1999). Die Pore setzt sich aus dem spannungsabhängigen Anionenkanal VDAC (voltage dependent anion channel) in der äußeren mitochondriellen Membran und dem Adeninnucleotid Translokator ANT (adenine nucleotide translocator) an der inneren Membran zusammen. Interaktion von Bax mit ANT (Marzo, Brenner et al. 1998) sowie von Bcl-x<sub>L</sub> und Bax mit VDAC, konnte an Liposomen gezeigt werden (Shimizu, Narita et al. 1999). In gesunden Zellen könnten anti-apoptotische Familienmitglieder die für Adenosinphosphate offene

Struktur des VDAC stabilisieren. In Reaktion auf ein apoptotisches Signal kommt es zur Bindung eines „BH3-only“ Verwandten, was die Interaktion unterbindet und den Kanal schließt. Das veränderte Ionen- und pH-Milieu veranlasst die Translokation und Oligomerisierung von Bax, welches eventuell über eine Interaktion mit VDAC Kanäle bildet, groß genug, um pro-apoptische Substanzen aus dem Mitochondrium freizusetzen (Adams and Cory 2001). Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass Bax in der Lage ist oligomere Poren in der äußeren mitochondrialen Membran, auch in Abwesenheit dort dominierender Proteine wie dem VDAC, zu bilden. Die Bildung einer Pore durch Bax ist von der Interaktion mit einem „BH3-only“, wie Bid und der Lipidzusammensetzung der Membran abhängig. Als entscheidendes, zur Porenbildung und -funktion notwendiges Lipid, wurde Cardiolipin identifiziert (Kuwana, Mackey et al. 2002). Dieses wurde bereits zuvor beschrieben die Bindung von Bid an das Mitochondrium zu vermitteln (Lutter, Fang et al. 2000). Unabhängig davon, über welchen Mechanismus nun letztlich die Bcl-2 Familie ihren pro- und anti-apoptischen Effekt entfaltet, ist unbestritten, dass sie eine Schlüsselrolle in der Regulation der Apoptose einnimmt.

## **1.5 Proteinkinasen – Regulatoren der Apoptose**

Wie bereits erwähnt induziert das Onkogen *bcl-2* Tumoren des haematopoetischen Systems, genauer, follikuläre (zentroblastische) Non-Hodgkin-Lymphome. Im Gegensatz zu anderen bekannten Onkogenen initiiert Bcl-2 keine Proliferation, sondern ermöglicht durch die Unterdrückung der Apoptose eine inadäquate Ausbreitung der neoplastischen Zellen. Andere Onkogene, wie *ras* und *raf* hingegen, führen zu Proliferation und Transformation. Wie die Apoptose, so ist auch die Proliferation komplex reguliert. Raf ist eine Proteinkinase, die über eine Kaskade weiterer Kinasen mitogene Signale durch Phosphorylierung vermittelt. Es liegt nahe, dass die zwei, letztlich opponierenden zellulären Prozesse des Zelltodes und der Proliferation, nicht voneinander isoliert ablaufen, sondern miteinander in Beziehung stehen. Die Apoptose ist ein von vielen unterschiedlichen Akteuren streng regulierter Vorgang. Einige der Schlüsselfiguren werden durch Phosphorylierung reguliert und stellen somit ein Ziel der Proteinkinasen dar. Auf zwei Kinase Systeme mit besonderer Bedeutung für die Regulation der Apoptose, der Raf/MEK/ERK und PI3K/AKT Kaskade, soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

### **1.5.1 Raf und Raf- abhängige Signaltransduktion**

Die Transduktion mitogener, d.h. proliferativer Signale, als auch Signale, die eine Differenzierung und Transformation der Zelle einleiten, erfolgt zu einem großen Teil über die

sogenannten MAPK Signalwege (Mitogen Activated Protein-Kinase Pathway). Diese Kaskaden von Kinasen, in der jeweils eine vorgeschaltete „upstream“ Kinase die nächste „downstream“ aktiviert, leiten extrazelluläre Signale nach initialer (Wachstums-) Rezeptorbindung, schrittweise zum Zellkern weiter, wo sie die Genexpression beeinflussen. Die Kaskadenstruktur ermöglicht eine Amplifikation, aber auch eine Divergenz und Streuung des Signals.

Der wohl am besten charakterisierte und bedeutendste MAPK Signalweg ist die Ras/Raf/MEK/ERK Kaskade. Die Bedeutung von Ras zeigt sich in der großen Frequenz, mit der das *ras* Gen in Tumoren mutiert ist, was zu einer Aktivierung des Genproduktes und konsekutiver Tumorgenese führt (Bos 1989). Die herausragende Stellung der Raf Kinase unter den Effektoren von Ras konnte in einer Vielzahl von Experimenten bestätigt werden (Mulcahy, Smith et al. 1985; Kolch, Heidecker et al. 1991; Bruder, Heidecker et al. 1992; Troppmair, Bruder et al. 1992; Daum, Eisenmann-Tappe et al. 1994).

Das C-Raf Protein (auch als C-Raf-1 und Raf-1 bezeichnet) wurde als das onkogene Produkt des Maus Sarkom Virus 3611 identifiziert (Rapp, Goldsborough et al. 1983). Raf ist ein in der Evolution konserviertes Gen. Homologe finden sich sowohl in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, als auch bei *Caenorhabditis elegans*. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besitzt kein Homolog, obwohl auch sie konserviertes Ras und konservierte MAPK Signalwege besitzt. Das Raf-Homolog von *C. elegans* ist für die Viabilität der Larve unabdingbar. Die wenigen, nach Deletion überlebenden Tiere, zeigen Defekte in der Vulva Differenzierung (Han, Golden et al. 1993). Das *raf* Gen der Fruchtfliege ist bedeutend für die Zellproliferation und -differenzierung in der Entwicklung von Photorezeptoren, „Rücken“ und Kopf des Insektes (Nishida, Inoue et al. 1996). Anders als in Wirbellosen, die nur eine Raf Isoform exprimieren, finden sich in Säugern drei Isoformen der Serin/Threonin Kinase. A-Raf (Beck, Huleihel et al. 1987), B-Raf (Sithanandam, Kolch et al. 1990) und C-Raf (Bonner, Oppermann et al. 1986). C-Raf, ein 74 kDa großes Protein, wird ubiquitär exprimiert. A-Raf kodiert für ein 68 kDa und B-Raf für ein 95 kDa Protein, mit verschiedenen Splicevarianten. Anders als bei C-Raf, ist das Expressionsprofil von A- und B- Raf auf bestimmte Gewebe beschränkt. Die Diversität der Phänotypen der einzelnen Raf „Knock-out“ Mäuse verdeutlicht die Eigenständigkeit der Isoformen. Sie nehmen spezifische Aufgaben wahr, die nach Verlust des Allels nicht durch eine andere Raf Kinase kompensiert werden können (Hagemann and Rapp 1999). A-Raf, überwiegend im urogenitalen Gewebe exprimiert, zeigt bei Elimination des Genes Mäuse mit einem Megacolon und neurologischen Auffälligkeiten, im Sinne einer gestörten räumlichen Wahrnehmung und eines auffälligen Bewegungsmusters. Auf

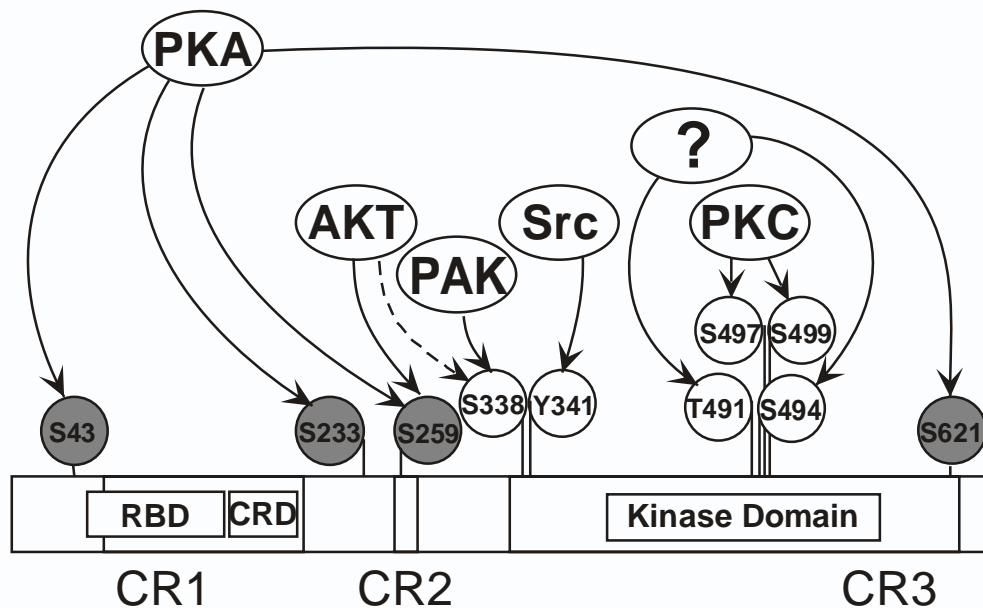


histologischer Ebene lassen sich jedoch keine neuronalen Defekte nachweisen (Storm, Cleveland et al. 1990; Pritchard, Bolin et al. 1996). B-Raf, mit präferenzialer Expression in Testes und Nervengewebe, führt zu knock-out Phänotypen mit Defekten im Neuroepithel und einer Malformation der Gefäße. Die Gefäße sind vergrößert und aufgrund einer pathologischen Endothelauskleidung fragil, was zu Haemorrhagie und Tod der Embryonen um E10.5 – 12.5 führt. Darüber hinaus ist die Apoptose (s.u.) der embryonalen Gewebe gesteigert (Barnier, Papin et al. 1995; Wojnowski, Zimmer et al. 1997). Erste Versuche das C-Raf Gen auszuschalten führten zu einer Form des Proteins, dem die für die Aktivierung durch Ras benötigte Domäne fehlt (siehe unten). Homozygote Tiere retardieren im Wachstum nach E10.5 und sterben, abhängig vom genetischen Hintergrund, zwischen dem Tag 10.5 und 12.5 der Embryonalentwicklung oder bei Geburt, aufgrund einer unzureichenden Lungenreife. Neben Augenlidern, Dermis und Epidermis sind die meisten Organe scheinbar normal entwickelt (Wojnowski, Stancato et al. 1998). Die Plazenta zeigt jedoch deutliche Defekte, wie auch in Mäusen, in denen das *c-raf* Gen vollständig deletiert wurde. Diese Mäuse zeigen darüber hinaus Störungen der Vaskularisation und eine gesteigerte Apoptose (Huser, Luckett et al. 2001; Mikula, Schreiber et al. 2001).

Die Raf Proteine lassen sich funktionell in eine aminoterminal regulatorische Einheit und eine carboxyterminale Kinasedomäne gliedern. Es finden sich drei hoch konservierte Regionen (conserved regions CR) CR1, CR2 und CR3. Diese konservierten werden durch variable Regionen getrennt, die zwar zwischen den drei Isoformen stark variieren, aber innerhalb einer Isoform zwischen verschiedenen Spezies ihrerseits hoch konserviert sind (Naumann, Hoffmeyer et al. 1996). CR3 ist die Kinasedomäne. CR1, eine Cystein-reiche Region und CR2, reich an Serin-/Threoninreste sind in die regulatorische Domäne eingebettet (Daum, Eisenmann-Tappe et al. 1994).

Ras bindet an zwei aminoterminal Abschnitte, die sogenannte Ras-Bindungsdomäne (RBD) (Zhang, Settleman et al. 1993; Wittinghofer and Nassar 1996) und die Cystein-reiche Zinkfinger-Region (Rapp, Heidecker et al. 1988; Zhang, Settleman et al. 1993; Ghosh, Xie et al. 1994; Hu, Kariya et al. 1995). Vor der Bindung ist jedoch die Aktivierung von Ras notwendig. Alle Raf Kinasen werden durch das Zusammenspiel von Ras Bindung, regulatorischer Phosphorylierung und Scaffolding Proteinen aktiviert. Phosphorylierung ist ein entscheidender Mechanismus zur Regulation der Raf Aktivität. Sie ist ein konservierter Prozess, der jedoch spezifische Unterschiede in den individuellen Phosphorylierungsstellen der Isoformen zeigt (Morrison and Cutler 1997; Slupsky, Weber et al. 1998; Hagemann and Rapp 1999; Dhillon and Kolch 2002; Chong, Vikis et al. 2003). Im folgenden soll

exemplarisch die am besten studierte Aktivierung von C-Raf dargestellt werden, welches auch in der Studie untersucht wird.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Struktur und Regulation von C-Raf**

Raf Proteine lassen sich funktionell und strukturell in eine aminoterminal regulatorische Einheit und eine carboxyterminale Kinasedomäne, sowie drei hoch konservierte Regionen (conserved regions CR) CR1, CR2 und CR3 gliedern. Ras bindet an zwei aminoterminalen Abschnitten, die Ras-Bindungsdomäne (RBD) und eine Cystein-reiche Zinkfinger-Region (CRD). Die Regulation von C-Raf ist komplex. Phosphorylierung spezifischer Aminosäurereste führt sowohl zur Aktivierung (weiß) als auch Deaktivierung (schwarz).

Im „klassischen“ Modell der Übermittlung von mitogenen Signalen führt die Bindung eines Wachstumsfaktors an einen Rezeptor zur Aktivierung von Ras. Ras, eine kleine GTPase mit einem Molekulargewicht von 21 kDa, ist in seiner GTP gebundenen Form aktiv. Der Ras in diese Form überführende Guaninnucleotide Releasing Factor SOS (Son Of Sevenless) wird durch Grb2 (growth-factor-receptor bound protein 2) an die Membran angenähert. Grb2 bindet über seine SH2- Domäne (SRC-homology 2- domain) an spezifische Phosphotyrosinreste des aktivierten (Tyrosinkinase-) Rezeptor oder der Rezeptor Substrate. SOS wird über zwei SH3- Domänen von Grb 2 gebunden (McCormick 1993; Schlessinger 1993; Avruch, Zhang et al. 1994).

Die Bindung von Raf durch Ras ist ausschließlich in der GTP gebundenen Form der GTPase möglich (Wittinghofer and Nassar 1996) und nähert Raf an die Membran an. Die Translokation an die Membran scheint ein für die Aktivierung von Raf entscheidender Schritt zu sein, wie durch eine artifiziell an die Membran gebundenes C-Raf gezeigt werden konnte (Stokoe, Macdonald et al. 1994; Marais, Light et al. 1995; Marais, Light et al. 1997). Zur

vollständigen Aktivierung sind jedoch zusätzliche Ras vermittelte Effekte notwendig (Mineo, Anderson et al. 1997; Li, Melnick et al. 1998; Sun, King et al. 2000). Der genaue Mechanismus, der zur vollständigen Aktivierung von Raf führt, ist sehr komplex und noch nicht vollständig verstanden. Die Evidenz für weitere Interaktionspartner wächst stetig, ähnlich wie die Zahl der für die Regulation der Kinase sensiblen Phosphorylierungsstellen. Sowohl Phosphorylierung, als auch Dephosphorylierung sind zur Aktivierung von Raf notwendig. Nach Bindung an Ras dissoziiert 14-3-3 Protein (Aitken, Jones et al. 1995; Tzivion and Avruch 2002) von Raf, was der Protein Phosphatase 2A (PP2A) ermöglicht den Phosphatrest von Serin 259 zu entfernen (Yeung, Seitz et al. 1999). Serin 259 und 621 sind die Bindungsstellen von 14-3-3. Man nimmt an, dass durch die Bindung beider Serine, 14-3-3 C-Raf in einer inaktiven, geschlossenen Konformation hält, in der katalytische und regulatorische Domäne einander zugewandt sind (Luo, Budihardjo et al. 1998; Tzivion, Luo et al. 1998). Im Gegensatz zu Serin 259 hat Serin 621 wohl eine ambivalente, sowohl mit der Inaktivierung, aber auch der Aktivierung verbundene Funktion. So führt dessen Mutation einerseits zum Verlust der katalytischen Aktivität, andererseits korreliert die Phosphorylierung mit der Inhibition durch PKA (Thorson, Yu et al. 1998). Neben den genannten Serin Resten führt auch Phosphorylierung von Serin 233 zur Inaktivierung, vermutlich ebenfalls durch PKA vermittelt (Dumaz, Light et al. 2002). Entscheidende Bedeutung kommt jedoch der Dephosphorylierung von Serin 259 zu, denn erst sie ermöglicht die Aktivierung durch Mitogene (Dhillon, Meikle et al. 2002). Ras induziert die Phosphorylierung an Serin 338, Thyrosin 341, Threonin 491 und Serin 494. PAK3 und PAK1 phosphorylieren C-Raf an Serin 338, welches direkt aminoterminal der Kinasedomäne liegt. Sowohl PI3-Kinase als auch Rac1 und Cdc42 aus der Rho GTPase Familie sind als beteiligte Intermediäre beschrieben (Diaz, Barnard et al. 1997; King, Sun et al. 1998; Mason, Springer et al. 1999; Chen, Edelstein et al. 2000; Sun, King et al. 2000; Chong, Lee et al. 2001; Li, Chong et al. 2001). Tyrosin 341 wird von einer Tyrosinkinase der Src Familie und eventuell von einer JAK (Janus Kinase, just another kinase) phosphoryliert (Fabian, Morrison et al. 1993; Winston and Hunter 1995; Xia, Mukhopadhyay et al. 1996). Dies ist vermutlich für das Aufheben des inhibitorischen Effektes der regulatorischen Domäne auf die Kinase Domäne von Bedeutung (Cutler, Stephens et al. 1998). C-Raf wird darüber hinaus an Threonin 491 und Serin 494 in der Aktivierungsschleife phosphoryliert und hierdurch aktiviert. Die verantwortliche Kinase ist jedoch bislang unbekannt (Chong, Lee et al. 2001). Als mögliche Phosphorylierungsstellen von PKC sind die Serine 497 und 499 auf C-Raf beschrieben

worden (Sozeri, Vollmer et al. 1992; Kolch, Heidecker et al. 1993; Cai, Smola et al. 1997; Barnard, Diaz et al. 1998; Chong, Lee et al. 2001).

Wie bereits erwähnt ist die Dephosphorylierung an bestimmten Stellen von entscheidender Bedeutung für die Aktivierung von Raf, umgekehrt führt die Phosphorylierung dieser zur Inaktivierung. Eine herausragende Rolle hat Serin 259, welches sowohl von AKT, als auch cAMP abhängig von PKA phosphoryliert wird (Zimmermann and Moelling 1999; Dhillon, Pollock et al. 2002) und die Bindung von 14-3-3 und Inaktivierung von Raf vermittelt. Die Phosphorylierung von Serin 43 in C-Raf ist ebenfalls mit der Inaktivierung von Raf gekoppelt. Serin 43 ist für die Bindung von Ras essentiell und reguliert vermutlich den Turnover der Ras<sub>GTP</sub>-Raf Komplexe. Im basalen, unstimulierten Zustand von Raf ist es wie Serin 259 und 621 phosphoryliert. Die Phosphorylierung durch PKA reduziert die Affinität für Ras (Wu, Dent et al. 1993; Mischak, Seitz et al. 1996), was nicht unbedingt zu erwarten wäre, da auch Wachstumsfaktoren eine starke Phosphorylierung von Serin 43 auslösen (Abraham, Podar et al. 2000). Vermutlich liegt in der Phosphorylierung von Serin 43 der Schlüssel zum Verständnis über die Dissoziation von Ras und Terminierung der Aktivierung von Raf an der Plasmamembran (Dhillon and Kolch 2002).

Die Aktivierung von Raf lässt sich somit in drei Abschnitte gliedern: Translokation an die Membran und partielle Aktivierung, stabile Bindung und weitere Aktivierung und letztlich Dissoziation von Ras und Terminierung der Aktivierung (Dhillon and Kolch 2002).

Die Aktivierung von Raf gewinnt zusätzlich an Komplexität durch die Entdeckung weiterer an der Regulation beteiligter Stoffe und Vorgänge. Lipide sind beschrieben Einfluss zu nehmen, genauso wie die Dimerisierung von Raf und zusätzliche Proteine wie Chaperone und Scaffolder (Morrison and Cutler 1997; Slupsky, Weber et al. 1998; Hagemann and Rapp 1999; Dhillon and Kolch 2002; Chong, Vikis et al. 2003).

Die einzigen bisher bekannten Substrate aller drei Raf Isoformen sind die MAPK Kinasen (mitogen activated protein kinase kinase MAPKK) MEK1 und MEK2 (MAPK/ERK kinase) (Daum, Eisenmann-Tappe et al. 1994). Auch wenn weitere Kinasen, wie MEKK-1 (Yan and Templeton 1994; Xu, Robbins et al. 1995), gefunden wurden, die MEK an typischer Stelle phosphorylieren, so sind die Raf Kinasen doch der dominierende MEK Aktivator in Reaktion auf Stimulation durch Wachstumsfaktoren (Kolch, Heidecker et al. 1991; Howe, Leever et al. 1992; Schaap, van der Wal et al. 1993; Troppmair, Bruder et al. 1994).

Raf ist in der Lage sowohl MEK1 als auch MEK2 zu aktivieren, jedoch mit interindividuellen Unterschieden, sowohl zwischen den Raf als auch den MEK Isoformen (Hagemann and Rapp 1999).

Die Aktivierung von MEK1 erfolgt durch Phosphorylierung an Serin 218 und 222 in der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne (Alessi, Saito et al. 1994). Substitution dieser Aminosäuren durch Glutamat führt zur konstitutiven Aktivierung (Alessi, Saito et al. 1994; Huang and Erikson 1994). Weitere Mutationsanalysen offenbarten den negativ regulatorischen Einfluss des aminoterminalen Proteinabschnittes. Deletion der aminoterminalen Aminosäuren, insbesondere des Abschnitts 32-52, erbringt konstitutiv aktive Mutanten. Der Proteinabschnitt 32-52 entspricht einer  $\alpha$ -Helix mit inhibitorischem Einfluss auf die Kinasedomäne (Mansour, Matten et al. 1994). Negative Regulation wird aber auch durch Phosphorylierung an Threonin 286(287) und Threonin 292(283) erreicht (Rossomando, Dent et al. 1994). Neben der Kinasedomäne besitzt MEK drei weitere nicht enzymatische Domänen. Eine aminoterminal nukleäre Export Sequenz (NES) ist für die vornehmlich zytoplasmatische Lokalisation von MEK verantwortlich (Lenormand, Sardet et al. 1993; Zheng and Guan 1994; Tolwinski, Shapiro et al. 1999). Die ERK1/2 bindende Domäne, auch D (docking) Domäne genannt, ist aminoterminal lokalisiert und besitzt basische und hydrophobe Reste. Saure Valenzen im carboxyterminal gelegenen CD Motiv von ERK sollen MEK hierüber binden (Xu and Goldfarb 2001). Die dritte ist eine Prolin-reiche Domäne in der carboxyterminalen Hälfte der Kinasedomäne. Sie ist Gegenstand von Phosphorylierung und Proteininteraktionen (Gardner, Vaillancourt et al. 1994; Mansour, Resing et al. 1994; Catling, Schaeffer et al. 1995; Cobb, Xu et al. 1996; Frost, Steen et al. 1997; Dang, Frost et al. 1998), unter anderen mit dem Scaffold MP-1 (Schaeffer, Catling et al. 1998).

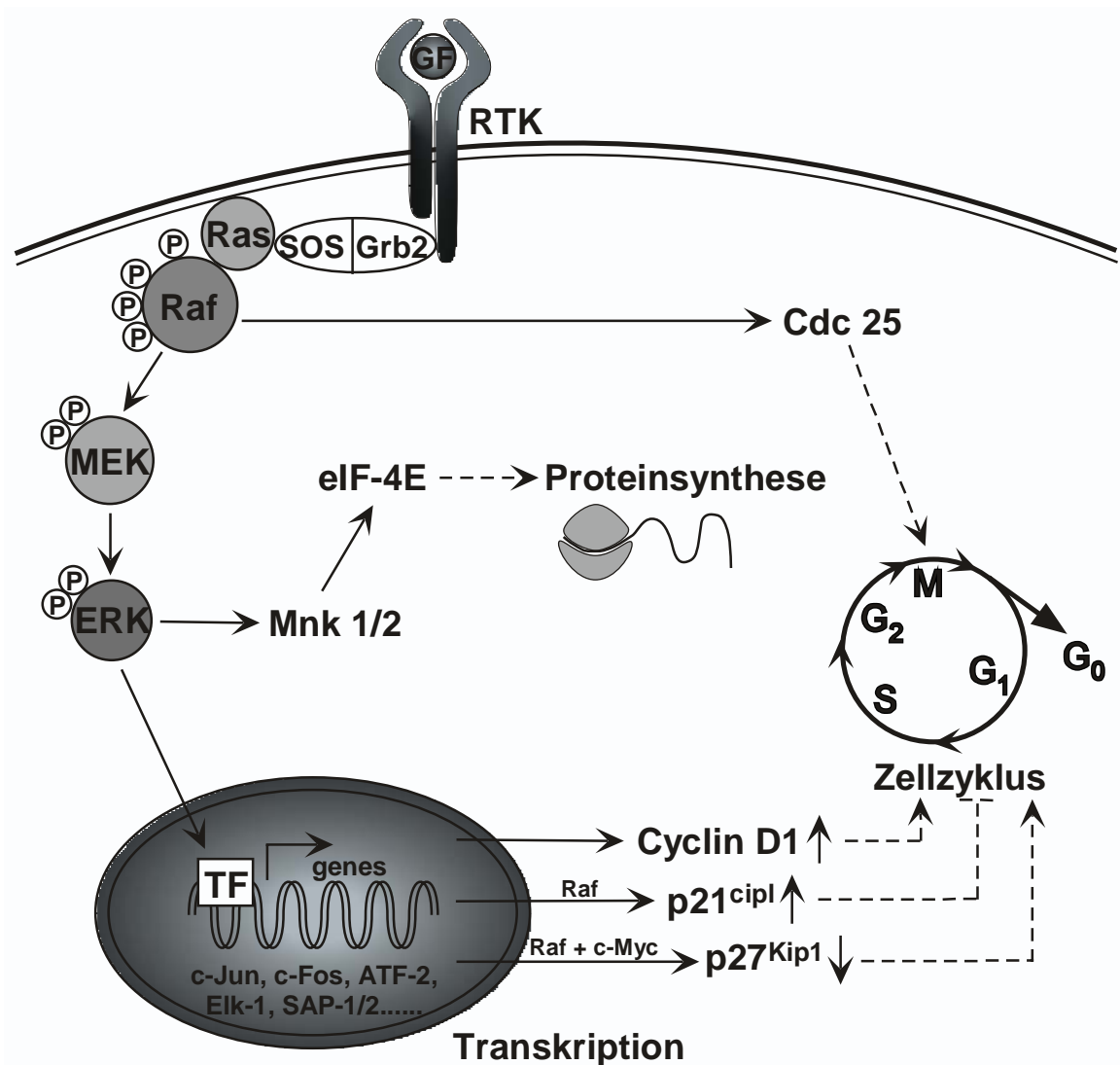
MEK gehört zu den seltenen dual-spezifischen Kinasen, die sowohl Threonin als auch Tyrosin spezifisch phosphorylieren. Ihr einziges bisher bekanntes Substrat sind die mitogen aktivierten Protein Kinasen (MAPK) ERK1 und ERK2 (extracellular signal regulated kinase).

Aufgrund des Molekulargewichtes werden die beiden Kinasen auch als p44<sup>MAPK</sup> und p42<sup>MAPK</sup> bezeichnet. Aktiviertes MEK phosphoryliert ERK1 und ERK2 an einem Thr-Glu-Tyr-Motiv und führt dabei diese in ihren aktiven Zustand über (Boulton, Nye et al. 1991). Bekannte Substrate des aktivierten ERK sind Transkriptionsfaktoren, unter ihnen c-Jun, c-Fos und ATF-2 der AP-1 (activating protein-1) Familie und die Transkriptionsfaktoren der TCF (ternary complex factors) Familie, Elk-1 (Daum, Eisenmann-Tappe et al. 1994) und SAP-1/2 (Raingeaud, Gupta et al. 1995; Dziarski, Jin et al. 1996; Beltman, Erickson et al. 1999; Barsyte-Lovejoy, Galanis et al. 2002). Somit führt ein durch Rezeptorbindung an der Zellmembran initiiertes und über Ras, Raf und MEK vermitteltes Signal letztlich zur spezifischen Genexpression und Zellantwort.

Neben den nukleären Substraten in Form der Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und reguliert ERK weitere auch zytoplasmatische Proteine, wie Proteinkinasen der Rsk (pp90 ribosomal S6 kinase) Familie oder Mnk (s.u.), membrangebundene, wie den TNF-Rezeptor CD120a oder strukturelle Proteine, wie die Neurofilamente (NF) (Lewis, Shapiro et al. 1998; Gotoh, Fukuda et al. 1999; Chen, Gibson et al. 2001; Pearson, Robinson et al. 2001). Ras, Raf und MEK, die in der mitogenen Kaskade letztlich ERK rekrutieren, kontrollieren hierüber entscheidende zelluläre Funktionen und Vorgänge.

ERK aktiviert die Serin/Threonin Kinasen Mnk1 und Mnk2, welche ihrerseits eIF-4E (eukaryotic initiation factor 4E) phosphorylieren (Sherr 1994; Gotoh, Fukuda et al. 1999). Nachfolgend der ebenfalls durch sie kontrollierten Transkription gewinnen somit Raf und MEK über ERK auch Einfluss auf die Proteinsynthese und Expression von Proteinen. Darüber hinaus regulieren Ras und Raf die Proliferation und Differenzierung von Zellen. Sie erreichen dies durch die Beeinflussung bestimmter Akteure der Zellzyklusmaschinerie. Der Zellzyklus wird von nukleären Enzymen, den Cdk (cyclin-dependent kinases) kontrolliert. Sie werden konstitutiv exprimiert, sind aber in Abwesenheit ihres Cyclins inaktiv. Die Progression durch die G1 Phase, dem Schritt des Zellzyklus, der am sensibelsten für extrazelluläre Regulation ist, wird von Cdk4 und Cdk2 kontrolliert (Sherr 1994). Typ D Cycline binden an Cdk4, Cyclin E an Cdk2. Der stimulierende Effekt der Cyclinbindung wird durch Cdk inhibitorische Proteine (CKI) unterdrückt, während Cyclin-aktivierende Kinasen (CAK), über Phosphorylierung, und die Phosphatase Cdc25, über Dephosphorylierung, Cdk aktivieren.

Aktivierung von Ras, Raf und MEK führt zur erhöhten Transkription von CyclinD1, vermutlich über c-Jun und Ets Transkriptionsfaktoren. Die Expression des CKI p27<sup>Kip1</sup> wird durch Raf und c-Myc reduziert. Beides führt zur Zellzyklusprogression und Proliferation. Interessanterweise führen starke Raf Signale zur Induktion der p21<sup>Cip1</sup> Expression, eines weiteren CKI, und zum Zellzyklusarrest, während schwächere Induktion von ERK, wie durch A-Raf, keine erhöhte Expression des Zellzyklusinhibitors zeigt. Auch die Cdk Phosphatase Cdc25A wird durch c-Myc induziert und post-translationell durch C-Raf phosphoryliert und aktiviert (Kerkhoff and Rapp 1998). Ras, Raf, MEK und ERK kontrollieren also ein weites Spektrum an Komponenten der Zellzyklusmaschinerie, was ihnen erlaubt, Zellarrest, Proliferation und Differenzierung entscheidend zu beeinflussen.



**Abbildung 5: Ras, Raf, MEK und ERK kontrollieren Zellzyklus, Transkription und Proteinsynthese**

Ligandenbindung am Wachstumsrezeptor führt vermittelt durch den Guaninnucleotide Releasing Factor SOS und Grb2 zur Aktivierung von Ras. Durch Bindung und Translokation an die Membran kommt es zur Aktivierung von Raf. Die aktive Serin/Threonin Kinase phosphoryliert und aktiviert MEK. MEK, eine dual-spezifischen Kinase für Threonin und Tyrosin aktiviert ihr bisher einzig bekanntes Substrat die mitogen aktivierte Protein Kinase ERK. Bekannte Substrate des aktivierten ERK sind Transkriptionsfaktoren und weitere auch zytoplasmatische Proteine. Durch spezifische Genexpression und intermediäre zytoplasmatische Signalwege kontrollieren Ras, Raf, MEK und ERK Zellzyklus, Transkription und Proteinsynthese.

Neben der Vermittlung von Proliferation und Transformation bleibt auch die Regulation der Apoptose nicht von Raf unbeeinflusst. Expression von onkogenem Raf (gag-v-raf) zusammen mit v-Myc, wie sie im natürlich auftretenden Retrovirus des Vogels MH2 vorkommt, führt synergistisch zur Transformation und starkem Tumorenwachstum (Rapp, Cleveland et al. 1985). Die Expression beider Proteine in der IL-3 abhängigen Zelllinie FDC-P1 lässt diese, auch in Abwesenheit ihres Wachstumsfaktors, wachsen, wie Cleveland et al. (Cleveland, Dean et al. 1988) zeigten. Wenig später wurde die Fähigkeit zur Suppression der

Apoptose für isoliert exprimiertes onkogenes gag-v-Raf beschrieben. Die Expression des Onkogens verzögert in 32D Zellen das Einsetzen der Apoptose nach Entzug des Wachstumsfaktors, ist jedoch nicht ausreichend eine völlige Unabhängigkeit von diesem zu induzieren (Cleveland, Troppmair et al. 1994). Raf kooperiert mit Bcl-2 in diesem Prozess. Die weitere Untersuchung der Raf-Bcl-2 Kooperation zeigte eine Komplexierung beider Proteine, jedoch ohne den Charakter eines Enzym-Substrat-Verhältnisses (Wang, Miyashita et al. 1994). Bcl-2 dient vielmehr als Adaptor für C-Raf an das Mitochondrium, wo dieses seinen anti-apoptotischen Effekt entfaltet. Die Expression einer aktiven, an die äußere Mitochondrienmembran gerichteten C-Raf Mutante imitiert die Raf/Bcl-2 Beziehung und bietet der Zelle ebenso Schutz. C-Raf vermittelt seinen anti-apoptotischen Effekt unabhängig von der bekannten MAPK-Kaskade über MEK und ERK, vermutlich durch Phosphorylierung und Inaktivierung des pro-apoptotischen Bcl-2 Homologen BAD (Wang, Rapp et al. 1996). Auch das anti-apoptotische BCR/ABL Protein induziert die Translokation von endogenem C-Raf an das Mitochondrium. Eine Mutante von Raf, die zur Aktivierung des MEK/ERK Signalweges, nicht aber zur Transformation von NIH 3T3 Zellen fähig ist, vermag nicht die Apoptose zu unterdrücken. Die Expression einer aktiven mitochondrialen C-Raf Mutante schützt 32D Zellen vor dem programmierten Zelltod und stellt das leukaemoide Potential von BCR/ABL wieder her (Salomoni, Wasik et al. 1998). Die Unabhängigkeit vom ERK Signalweg, in der Unterdrückung der Apoptose durch C-Raf, wird darüber hinaus durch jüngere genetische Studien unterstützt. C-Raf defiziente Mäuse zeigen eine gesteigerte Apoptose in embryonalen Geweben. Die Fähigkeit zur Proliferation, sowie Aktivierung von ERK hingegen ist erhalten, zumindest in *in vitro* Versuchen mit isolierten Fibroblasten und haematopoetischen Zellen (Huser, Luckett et al. 2001; Mikula, Schreiber et al. 2001). Huser et al. (Huser, Luckett et al. 2001) mutmaßen aufgrund der unbeeinflussten Proliferation und ERK Aktivierung in den C-Raf defizienten Mäusen, dass C-Raf überwiegend eine Aufgabe in der Regulation der Apoptose zukommt und B-Raf der dominierende Aktivator von MEK und ERK ist. Demgegenüber stehen eine Vielzahl von Studien, die C-Raf als den Effektor von onkogenem Ras identifiziert haben (Kolch, Heidecker et al. 1991; Schaap, van der Wal et al. 1993; Chao, Foster et al. 1994; Troppmair, Bruder et al. 1994). Auch B-Raf defiziente Mäuse zeigen eine gesteigerte Apoptose im embryonalen Gewebe, welche besonders das Endothel betrifft und zu einer Fragilität und massiven Hämorrhagien führt (Wojnowski, Zimmer et al. 1997).

Entgegen der Vorstellung, dass Raf seinen anti-apoptotischen Effekt unabhängig vom ERK MAPK-Signalweg über bisher unbekannte Mechanismen am Mitochondrium entfaltet,



zeigten Ehrhardt et al. (Erhardt, Schremser et al. 1999), dass B-Raf, nachfolgend der Freisetzung von Cytochrom *c*, die Apoptose über einen MEK und ERK vermittelten Signalweg zu unterdrücken vermag (Erhardt, Schremser et al. 1999). Weitere Hinweise für eine Bedeutung der klassischen mitogenen Kaskade in der Regulation der Apoptose ergaben sich aus genetischen Studien in der Fliege *Drosophila melanogaster*. Sowohl die Aktivität, als auch die Expression von HID, welches neben GRIM und REAPER von zentraler Bedeutung für die Apoptose in *Drosophila* ist, unterliegen überwiegend der Kontrolle durch den Ras/MAPK Signalweg (Bergmann, Agapite et al. 1998; Bergmann, Agapite et al. 1998; Kurada and White 1998). Parallel zu dieser Studie entstanden eine Vielzahl weiterer, die ein komplexes Bild der Regulation der Apoptose durch Raf, MEK und ERK zeichnen. Sie sollen an gegebener Stelle erläutert und diskutiert werden.

### **1.5.2 AKT und AKT- abhängige Signaltransduktion**

Eine Serin-/Threonin Kinase, die neben Funktionen in Proliferation, Transformation und Zellmetabolismus, auch regulierend in die Apoptose eingreift ist AKT. AKT wurde von drei unabhängigen Arbeitsgruppen charakterisiert. Eine Gruppe identifizierte es als das zelluläre Homolog eines viralen Onkogens, *v-akt*, das bei Mäusen Leukämien auslöst (Staal, Hartley et al. 1977; Bellacosa, Testa et al. 1991). Die beiden anderen Gruppen stießen auf diese „neue“ Serin/Threonin Kinase, bei der Suche nach weiteren Verwandten der Proteinkinasen A und C und etablierten analog hierzu die Namen Proteinkinase B (PKB) bzw. RAC (related to A and C kinases) (Coffer and Woodgett 1991; Jones, Jakubowicz et al. 1991). Die Proteinkinasen PKA, AKT und PKC werden zu der 'AGC' Superfamilie der Proteinkinasen gezählt, die inzwischen mehr als 80 Mitglieder umfasst. Sie zeichnen sich durch eine strukturell ähnliche Kinasedomäne und einen ähnlichen Aktivierungsmechanismus aus (Scheid and Woodgett 2003). Säuger besitzen drei Isoformen von AKT/PKB, AKT1/PKB $\alpha$ , AKT2/PKB $\beta$  und AKT3/PKB $\gamma$ , die in über 85% ihrer Sequenz übereinstimmen. Die Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 56 kDa zeigen den gleichen strukturellen Aufbau. Aminoterminal erstreckt sich über etwa 100 Aminosäuren eine Pleckstrin homologe Domäne (PH domain). PH Domänen zeichnen sich durch ihre dem Pleckstrin ähnliche dreidimensionale Struktur und ihrer Fähigkeit zur Bindung von Phosphoinositolen aus (Ferguson, Kavran et al. 2000; Lietzke, Bose et al. 2000). Gefolgt wird die PH Domäne von der Kinasedomäne, die große Ähnlichkeit zu denen von PKA und PKC besitzt (Jones, Jakubowicz et al. 1991; Andjolkovic, Jones et al. 1995). Weiter carboxyterminal schließt sich eine hydrophobe Domäne der Kinase an, die als allosterischer Regulator der katalytischen Aktivität dient (s.u.). Alle drei Isoformen besitzen konservierte

Phosphorylierungsstellen an einem Threonin (AKT1: T308; AKT2: T309; AKT3: T302) in der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne und einem Serin (AKT1: S473; AKT2: S474; AKT3: S472) in der hydrophoben Domäne (Kandel and Hay 1999; Yang, Cron et al. 2002; Yang, Cron et al. 2002). Zusammen mit der PH Domäne sind sie maßgeblich an der Aktivierung von AKT beteiligt. Die drei AKT Isoformen werden mit unterschiedlicher gewebsspezifischer Ausprägung exprimiert (Jones, Jakubowicz et al. 1991; Bellacosa, Franke et al. 1993; Altomare, Guo et al. 1995; Konishi, Matsuzaki et al. 1996; Brodbeck, Cron et al. 1999; Nakatani, Sakaue et al. 1999). AKT1 dominiert in den meisten Geweben. AKT2 Expression ist am höchsten in Geweben, die einem starken Einfluss des Insulins unterliegen, wie Skelettmuskel, Herz, Leber und Niere. Einfluss auf die Glucosehomöostase wird vorwiegend dieser Isoform zugeschrieben (Altomare, Guo et al. 1995). Die Expression von AKT3 ist eher restriktiv und vorwiegend auf Pankreas, Herz und Niere im adulten Organismus beschränkt (Altomare, Guo et al. 1995; Konishi, Matsuzaki et al. 1996; Brodbeck, Cron et al. 1999; Nakatani, Sakaue et al. 1999). Interessanterweise muss die am stärksten exprimierte Isoform nicht zwingend die aktivste im dem jeweiligen Gewebe sein (Walker, Deak et al. 1998; Fujio, Guo et al. 1999).

AKT wird durch Wachstumsfaktoren aktiviert, die ihr Signal über PI3-Kinase (phosphoinositide 3-kinase) vermitteln, wie z.B. PDGF (platelet-derived growth factor), EGF (epidermal growth factor) und Insulin. Die durch Wachstumsfaktoren induzierte Aktivierung konnte durch Inhibitoren der PI3K, Wortmannin und LY94002 antagonisiert werden. Mutanten des Wachstumsfaktorrezeptors, die nicht in der Lage sind PI3K zu aktivieren, sind auch nicht in der Lage AKT zu stimulieren (Coffer, Jin et al. 1998). PI3K phosphoryliert die 3'-OH Position im Inositolring von Phosphoinositolen. Die resultierenden Produkte sind Phosphatidylinositol 3-phosphat (*PtdIns3P*), Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphat (*PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>*) und Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat (*PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>*). Drei PI3-Kinase Isoformen sind beschrieben, wobei die der Klasse I für die zelluläre Aktivierung von AKT von Bedeutung sind. Klasse I PI3-Kinasen stehen in der Signalkette ausgehend von Rezeptortyrosinkinasen und heterotrimeren G-Protein gekoppelten Rezeptoren, eine Bindung an das monomere G-Protein Ras wurde jedoch auch beschrieben (Marte, Rodriguez-Viciana et al. 1997; Vanhaesebroeck and Alessi 2000). Die PI3-Kinasen der Klasse I sind Heterodimere, bestehend aus einer katalytischen (p110) und einer regulatorischen (p85/p55/p100) Untereinheit. Sowohl die katalytische als auch die regulatorische Untereinheit existiert in mehreren Isoformen. Mittels zweier SH2 Domänen bindet die regulatorische Untereinheit an spezifische, phosphorylierte Tyrosinreste aktivierter Rezeptoren oder

Adapterproteine. Die zytosolische PI3-Kinase wird dadurch mit ihrer katalytischen Domäne der Membran und damit ihren Substraten angenähert. Bevorzugtes Substrat der Klasse I PI3-Kinasen ist PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Das resultierende PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> wird teilweise zu PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> dephosphoryliert (Woscholski and Parker 1997), welches zusammen mit ersterem über eine Bindung der PH Domäne zur Translokation des zytosolischen AKT an die Membran führt (Vanhaesebroeck and Alessi 2000). Vermutlich ermöglicht eine durch die Lipidbindung der PH Domäne erreichte Konformationsänderung die Phosphorylierung durch PDK-1 (phosphoinositide-dependent kinase-1). PDK-1 ist eine Serin/Threonin Kinase, die über eine carboxyterminale PH Domäne mit hoher Affinität PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> und PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> bindet. Phosphorylierung am Threonin in der Kinasedomäne (s.o.) führt zur Aktivierung von AKT. Eine vollständige Aktivierung wird aber erst nach Phosphorylierung an dem carboxyterminalen Serin (s.o.) erreicht. PDK-1 gilt als etablierte Kinase für die Phosphorylierung der Threoninreste, scheint aber keine Rolle bei der Phosphorylierung der Serine zu spielen. Mehrere andere Theorien existieren, wie die Phosphorylierung durch eine mögliche PDK-2, durch ILK (integrin-linked kinase/fokal adhesion kinase) oder durch Autophosphorylierung (Nicholson and Anderson 2002). Die Phosphorylierung des Serins in der hydrophoben carboxyterminalen Domäne induziert eine Konformationsänderung hin zu einer geordneten Proteinstruktur, die das katalytische Segment stabilisiert und zur vollen Entfaltung der Kinaseaktivität führt (Yang, Cron et al. 2002; Yang, Cron et al. 2002). Nach der vollständigen Aktivierung verlässt AKT die Membran und transloziert ins Zytoplasma und in den Zellkern.

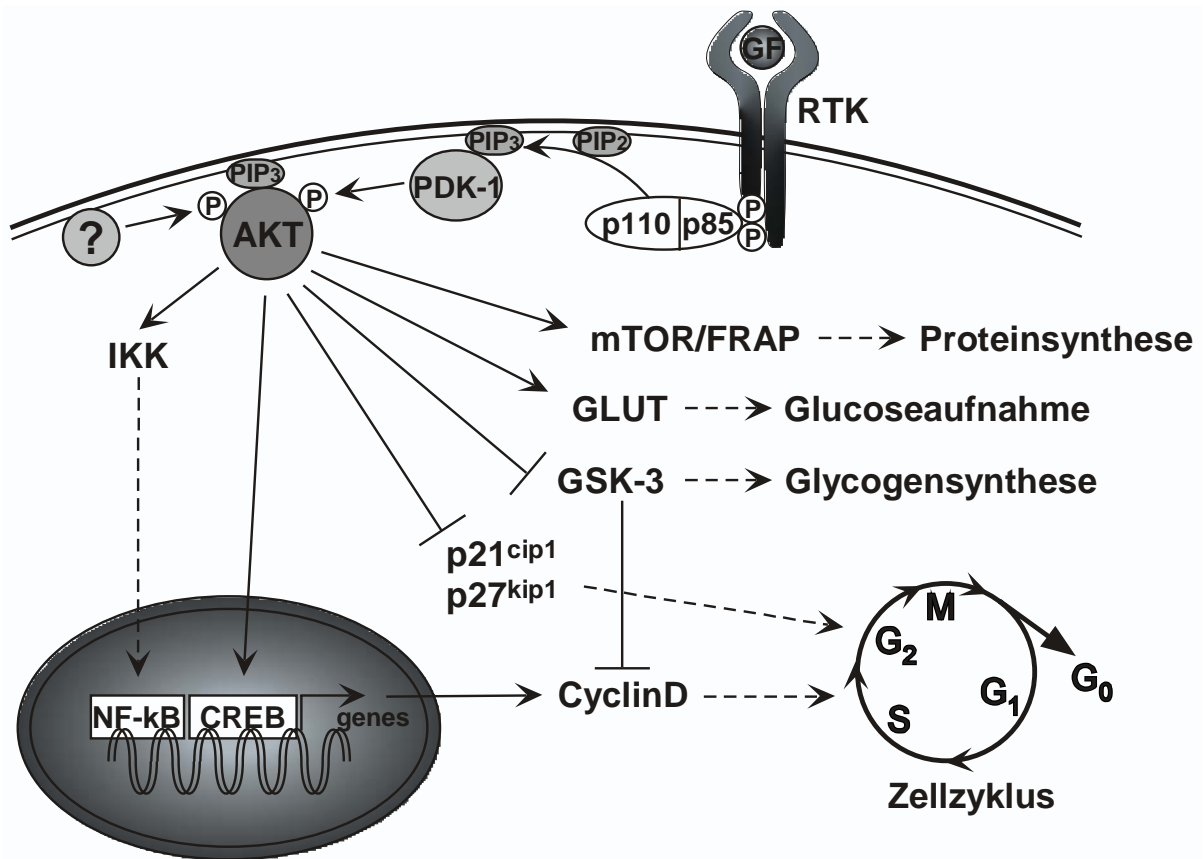
Wie die Aktivierung von AKT an der Membran, erfolgt auch die negative Regulation dieses Vorgangs über Phosphatidylinositol abhängige Prozesse. PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10), ein neuartiges Tumorsuppressorprotein mit Protein- und Lipidphosphataseaktivität, dephosphoryliert PtdInsP<sub>3</sub> in 3' Position und antagonisiert die Translokation und damit sukzessive Aktivierung von AKT. Eine weitere Lipidphosphatase SHIP (SH2-domain-containing inositol phosphatases) hemmt auf ähnliche Weise die AKT Aktivierung durch Dephosphorylierung in 5' Position der PtdInsP<sub>3</sub> (Kandel and Hay 1999; Brazil and Hemmings 2001).

AKT beeinflusst unterschiedliche zelluläre Prozesse. In insulinabhängigen Geweben reguliert AKT den Glucosestoffwechsel. Es steigert die Expression von Glucosetransportern und die Aufnahme von Glucose in die Zellen. Die Glycogensynthese wird durch Inaktivierung des Glycogensynthese Inhibitors GSK-3 (glycogen synthase kinase3) gefördert (Cross, Alessi et al. 1995; Kohn, Summers et al. 1996; Cong, Chen et al. 1997; Tanti, Grillo et al. 1997;

Hajdуч, Alessi et al. 1998; Barthel, Okino et al. 1999). Neben der Glycogen- erleichtert AKT aber auch die Proteinsynthese über einen noch nicht gänzlich geklärten Mechanismus, der die PI3K verwandte Proteinkinase mTOR/FRAP einschließt. AKT initiiert die Translation von mRNA nach Phosphorylierung und Inaktivierung von 4E-BP, dem Inhibitor des Elongationsfaktors eIF-2B (Gingras, Kennedy et al. 1998; Scott, Brunn et al. 1998). Zusätzlich unterliegt die Expression einer Vielzahl von Genen der Kontrolle der Transkription durch AKT. So werden die Transkriptionsfaktoren der Forkhead Familie FKHR, FKHL und AFX von AKT phosphoryliert und inaktiviert (Brunet, Bonni et al. 1999; Guo, Rena et al. 1999). CREB (cAMP-responsive element binding protein), ein weiterer Transkriptionsfaktor, wird durch Phosphorylierung hingegen aktiviert. NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) wird durch die Degradation seines Inhibitors I $\kappa$ B (inhibitor of NF- $\kappa$ B) nach Phosphorylierung und Aktivierung der Inhibitor kinase IKK (inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase) durch AKT aktiviert (Biggs, Meisenhelder et al. 1999; Kane, Shapiro et al. 1999). AKT reguliert somit die Expression einer Summe von Genen mit den unterschiedlichsten Funktionen, unter anderem auch in der Kontrolle der Apoptose (s.u.).

Es ist nicht verwunderlich, dass sich AKT als Onkogen an der Kontrolle der Zellzyklusprogression beteiligt. Entscheidende Proteine der Zellzyklus Maschinerie sind die Cycline, ihre abhängigen Kinasen Cdks (cyclin-dependent kinases) und deren Inhibitoren CKI (Cdk inhibitors). AKT kontrolliert in komplexer Art und Weise auf transkriptioneller, translationeller und posttranslationeller Ebene cyclinD, sowie p21<sup>Cip1</sup> und p27<sup>Kip1</sup>, aus der Familie der Cip/Kip Cdk Inhibitoren und initiiert dadurch die Progression des Zellzyklus (Nicholson and Anderson 2002).

Neben der Bedeutung für den Metabolismus von Glucose und Proteinen, Transkription und Proliferation greift AKT direkt in die Regulation der Apoptose ein. AKT vermittelt die anti-apoptotische Wirkung von Wachstumsfaktoren. Ektope Expression einer konstitutiv aktiven Mutante mit einer an die Membran gerichteten Sequenz (gag-PKB, myristoylated-PKB) lässt Zellen in Abwesenheit von Serum und IGF-1 überleben (Dudek, Datta et al. 1997; Kauffmann-Zeh, Rodriguez-Viciano et al. 1997; Kennedy, Wagner et al. 1997; Kulik, Klippel et al. 1997). AKT schützt Zellen aber auch vor anderen apoptotischen Signalen, Myc Überexpression (Kauffmann-Zeh, Rodriguez-Viciano et al. 1997; Kennedy, Wagner et al. 1997), UV Bestrahlung und DNA Schädigung (Kulik, Klippel et al. 1997; Kennedy, Kandel et al. 1999), anti-Fas Antikörper und TNF $\beta$  (Parry, Smith et al. 1997; Chen, Su et al. 1998; Chen, Chang et al. 1999; Gibson, Tu et al. 1999).



**Abbildung 6: PI3-Kinase und AKT kontrollieren Zellzyklus, Transkription, Proteinsynthese und Glucosestoffwechsel**

Ligandenbindung am Wachstumsrezeptor führt zur Translokation und Aktivierung einer PI3-Kinase (Darstellung als p110/p85 Untereinheit). Deren Produkte, die Phosphatidylinositolphosphate (PIP3) nähern AKT der Membran an, wo diese durch Phosphorylierung aktiviert wird. AKT transloziert in Zytoplasma und Zellkern. Bekannte Substrate der aktivierten AKT sind Transkriptionsfaktoren und verschiedene zytoplasmatische Proteine. Durch spezifische Genexpression und intermediäre zytoplasmatische Signalwege kontrollieren PI3-Kinase und AKT Zellzyklus, Transkription, Proteinsynthese und Glucosestoffwechsel.

Immer mehr apoptotische und anti-apoptotische Proteine werden als direkter oder indirekter Interaktionspartner von AKT identifiziert. Inaktivierung der Familie der Forkhead Transkriptionsfaktoren vermeidet die Expression pro-apoptotischer Proteine, wie die des Fas-Ligand, des IGF binding protein 1 (IGFBP1) oder des pro-apoptotischen Bcl-2 Homolog Bim (Brunet, Bonni et al. 1999; Dijkers, Medema et al. 2000). Im Gegensatz dazu führt die Aktivierung von CREB und NF-κB zur Expression anti-apoptotischer Genprodukte, wie cIAP1 und cIAP2 (Wang, Mayo et al. 1998; Kane, Shapiro et al. 1999; Wang, Guttridge et al. 1999), sowie Bcl-2 und Mcl-1 (Skorski, Bellacosa et al. 1997; Du and Montminy 1998; Wang, Chao et al. 1999; Pugazhenthii, Nesterova et al. 2000). BAD, das pro-apoptotische Bcl-2 Homolog, wird von AKT an Serin136 phosphoryliert. In phosphorylierter Form ist es nicht in der Lage mit Bcl-2 zu interagieren und wird an 14-3-3 Proteine gebunden (Datta, Dudek et

al. 1997; del Peso, Gonzalez-Garcia et al. 1997). Ein weiterer pro-apoptotischer Effektor, Caspase-9 wird ebenfalls von AKT phosphoryliert und inaktiviert (Cardone, Roy et al. 1998). Wichtig für die anti-apoptotische Wirkung von AKT ist auch seine Fähigkeit über unterschiedliche Mechanismen in den Metabolismus der Zelle einzugreifen, und dadurch die Integrität der Zelle und solch wichtiger Prozesse, wie die mitochondriellen Energiegewinnung zu erhalten (Kandel and Hay 1999).

## **1.6 Ziel der Arbeit**

Haematopoetische Cytokine, wie Interleukin 3 (IL-3), induzieren verschiedene Signalwege, die die durch Rezeptorbindung initiierten, membranösen Signale in die Zelle übermitteln und so entscheidende zelluläre Funktionen wie den Zellzyklus, die Differenzierung oder die Apoptose beeinflussen.

Durch Bindung an den IL-3 Rezeptor werden die beiden Ras Signalwege über PI3-Kinase und C-Raf, sowie der von Ras unabhängige Signalweg über die Janus Kinasen (JAK) aktiviert (Carroll, Clark-Lewis et al. 1990; Gold, Duronio et al. 1994; de Groot, Coffey et al. 1998). Sowohl AKT, als auch C-Raf, sind beschrieben, den anti-apoptotischen Effekt von IL-3 zu vermitteln. Expression einer onkogenen Form von C-Raf verzögert das Eintreten des apoptotischen Zelltodes in der IL-3 abhängigen haematopoetischen Zelllinie 32D nach Entzug des Wachstumsfaktors (Cleveland, Troppmair et al. 1994). Weitere Arbeiten zeigten einen Synergismus von C-Raf und Bcl-2 in diesem Prozess (Wang, Miyashita et al. 1994). Die genauere Charakterisierung der C-Raf/Bcl-2 Interaktion offenbart eine mögliche Rolle von Bcl-2 in der mitochondrialen Translokation von C-Raf. Am Mitochondrium phosphoryliert C-Raf das pro-apoptotische Bcl-2 Familienmitglied BAD, was zu dessen Sequestration und Inaktivierung führt (Wang, Rapp et al. 1996). Die Studien etablierten einen neuen Signalweg von C-Raf am Mitochondrium, der unabhängig von MEK-1 und -2 agiert. Dieser ERK (extracellular signal regulated kinase) Aktivator ist demgegenüber bedeutend in der C-Raf induzierten Proliferation, Differenzierung und Transformation, den so entscheidenden Raf Effekten (Cowley, Paterson et al. 1994; Troppmair, Bruder et al. 1994; Kerkhoff and Rapp 1997; Kerkhoff and Rapp 1998; Hartkamp, Troppmair et al. 1999). Eine gänzliche Umgehung des MEK und ERK Signalweges in der Unterdrückung der Apoptose durch C-Raf wäre erstaunlich. So verdichten sich auch die Hinweise für eine Einbeziehung der mitogenen Kaskade (Raf/MEK/ERK) in den anti-apoptotischen Signalweg. Die Unterdrückung des programmierten Zelltodes durch die Raf Isoform B-Raf, in einer Fibroblastenzelllinie, beruht auf einem von MEK und ERK vermittelten Mechanismus. Intervention in den Signalweg durch Einsatz eines MEK Inhibitor oder Koexpression einer dominant negativen MEK

Mutante hebt die anti-apoptotische Aktivität von B-Raf auf (Erhardt, Schremser et al. 1999). Darüber hinaus sprechen die Befunde in *Drosophila melanogaster* für eine Bedeutung der klassischen mitogenen Kaskade in der Regulation der Apoptose. Denn sowohl die Aktivität, als auch die Expression von HID, welches neben GRIM und REAPER von zentraler Bedeutung für die Apoptose in *Drosophila* ist, unterliegen überwiegend der Kontrolle durch den Ras/MAPK Signalweg (Bergmann, Agapite et al. 1998; Bergmann, Agapite et al. 1998; Kurada and White 1998).

Ziel dieser Arbeit ist die Evaluierung der Bedeutung von MEK in der Regulation der Apoptose:

- MEK ist bedeutend in der Proliferation, Differenzierung und Transformation (s.o.). Die Auswirkung einer Inhibition von MEK und damit die Erfordernis von funktionellem MEK für das Überleben der Zelle soll untersucht werden.
- Onkogenes, aktives C-Raf hemmt die Apoptose nachfolgend dem Entzug von IL-3 in der haematopoetischen Zelllinie 32D (Cleveland, Troppmair et al. 1994). Nunmehr soll die Fähigkeit von konstitutiv aktivem MEK, als Raf untergeordnete Kinase, analysiert werden, ebenso eine Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren zu initiieren.
- Der vermeintliche Mechanismus eines anti-apoptotischen Signalweges von MEK soll ergründet werden. Dem einzigen bisher bekannten Substrat von MEK, ERK, kommt hier besondere Bedeutung zu. Darüber hinaus sind die Mitglieder der Bel-2 Familie bekannt im anti-apoptotischen Signalweg ausgehend von Wachstumsfaktor-Rezeptoren assoziiert zu sein. Die Phosphorylierung des pro-apoptotischen Mitglieds BAD ist ein Integrationspunkt von Signaltransduktions- und Kinase- Kaskaden in diesem Prozess. Neben C-Raf ist vor allem AKT als eine effektive Kinase von BAD beschrieben (Wang, Rapp et al. 1996; Datta, Dudek et al. 1997). Die Rekrutierung eines solchen Signalweges in der Unterdrückung der Apoptose durch MEK ist zu überprüfen.
- Raf ist die übergeordnete Kinase von MEK in der „klassischen“ mitogenen Kaskade Ras/Raf/MEK/ERK. Ein anti-apoptotischer Effekt von MEK sollte auch durch C-Raf initiiert sein, so dass letztlich die Gültigkeit der erhobenen Befunde auch für C-Raf evaluiert werden soll.

Als Studienmodell dient vor allem die murine haematopoetische lymphoblastische Zelllinie 32D, die zur Proliferation und zum Überleben von der Stimulation durch das Cytokin IL-3 abhängig ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und radioaktive Verbindungen

12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA)	Sigma, St. Louis
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Acrylamid (40%)/Bisacrylamid (0,8%)	Roth, Karlsruhe
Adenosin-5'Triphosphat (ATP)	Sigma, St. Louis
Agarose, ultra pure	GIBCO BRL, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, St. Louis
Aprotinin	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, St. Louis
Bradford-Reagenz	Biorad, München
Bromphenolblau	Sigma, St. Louis
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, St. Louis
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, St. Louis
DNA-Längenstandardmarker (1kb-Marker)	Sigma, St. Louis
dNTP	Sigma, St. Louis
EDTA	Sigma, St. Louis
EGTA	Sigma, St. Louis
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Giemsa stain	Sigma, St. Louis
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma, St. Louis
IPTG	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma, St. Louis
LipofectAMINE™	GIBCO BRL, Karlsruhe
Natriumdesoxcholat (DOC)	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma, St. Louis
Nitrocellulose	Schleicher & Schüll, Dassel
Nonidet P-40	Sigma, St. Louis
Ortho-Nitrophenyl-β-D-Galaktosid (ONPG)	Applichem, Darmstadt
Pefabloc	Roth, Karlsruhe
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	GIBCO BRL, Karlsruhe



Protein A-Agarose	Boehringer, Mannheim
Protein G-Agarose	Boehringer, Mannheim
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma, St. Louis
Triton-X100	Sigma, St. Louis
Whatman 3MM Papier	Schleicher & Schüll
allgemeine Laborchemikalien	Fluka Chemie, Schweiz
	Merck, Darmstadt
	Roth, Karlsruhe
	SERVA, Heidelberg
	Sigma, St. Louis
Röntgenfilme	Amersham, Braunschweig
Radiochemikalien	Amersham, Braunschweig

### 2.1.2 Inhibitoren und Apoptoseauslöser

Doxorubicin	14-Hydrodaunomycin Anthracyclin, Inhibitor der Topoisomerase II (IC <sub>50</sub> ~ 0,1 µM); interkaliert mit der DNA Doppelhelix und inhibiert Nukleinsäuresynthese, interagiert mit Plasmamembranen und der Atmungskette (cyto p450) unter Bildung freier Radikale, induziert Apoptose löslich in H <sub>2</sub> O Calbiochem, Bad Soden
LY 294002	2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one spezifischer Inhibitor der Phosphatidylinositol 3-Kinase (IC <sub>50</sub> ~ 1,4 µM); interagiert mit der ATP Bindungsstelle des Enzyms; inhibiert PI 3-K ähnliche DNA-PK <sub>CS</sub> löslich in DMSO Calbiochem, Bad Soden
U0126	1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis-[2-aminophenylthio]butadiene Inhibitor von MEK-1 und -2 (IC <sub>50</sub> ~ 1 µM), schwachem Effekt auf Abl, Cdk2, Cdk4, ERK, JNK, MEKK, MKK-3, MKK-4/SEK, MKK-5, MKK-6, PKC und

Raf; vermutliche Bindung an Raf Phosphorylierungsstelle S218 und S222;  
nicht kompetitiv in Bezug auf Substrat, ATP und Raf  
löslich in DMSO  
Calbiochem, Bad Soden

PD 098059 2-Amino-3-methoxyflavon  
Inhibitor von MEK-1 (IC<sub>50</sub> ~ 2-10 µM) und -2 (IC<sub>50</sub> ~ 50 µM), Effekt auf  
MKK-5; hemmt die Aktivierung von basal aktivem MEK und konsekutiv die  
Phosphorylierung von ERK  
löslich in DMSO und Methanol  
Calbiochem, Bad Soden

### 2.1.3 Enzyme

Calf Intestine Phosphatase (CIP)	NEB
DNA Polymerase I (Klenow-Fragment)	MBI
Proteinase K	Sigma, St. Louis
Restriktionsenzyme	Boehringer, Mannheim
	MBI
	NEB, Mississauga
RNase	Boehringer, Mannheim
T4 DNA Ligase	NEB, Mississauga
Taq-Polymerase	Boehringer, Mannheim

### 2.1.4 Plasmide

pBabe-puro MEK LIDEMANE

Referenz S. Cowley (Cowley, Paterson et al. 1994)

Mutation S218E/S222E

pBabe-puro MEK LIDA

Referenz S. Cowley (Cowley, Paterson et al. 1994)

Mutation S218A

pBabe-puro MEK ΔStu LIDEMANE

Referenz S. J. Mansour (Morgenstern and Land 1990; Mansour, Matten et al. 1994)

Mutation S218E/S222E, Deletion Aminosäuren 32-51

Subcloning Die Mutante wurde aus pBabe-puro MEK LIDEMANE generiert; hierzu wurde das Insert mittels eines *Bam*H1/*Eco*R1 Verdau freigesetzt und in pBluescript recloniert. Mit *Stu*I erfolgte ein weiterer Verdau, der ein 60-bp Fragment freisetzte, darauf folgend die Religation. Das freigesetzte Fragment kodiert für eine negativ-regulatorische alpha Helix. Die resultierende Mutante wurde erneut in den Vector pBabe-puro kloniert.

EH neo v-raf

Referenz U. R. Rapp, J. Troppmair (Cleveland, Troppmair et al. 1994; Troppmair, Bruder et al. 1994)

pBabe-puro AKT wt

Referenz B. A. Hemmings, Basel (Andjelkovic, Alessi et al. 1997; Meier, Alessi et al. 1997)

Mutation HA-Tag (aminoterminal)

Subcloning Freisetzung des Inserts aus pCMV5 mittels *Bg*III/*Xba*I Verdau blunt ended und Klonierung in die *Sna*BI Schnittstelle von pBabe-puro

pB puro AKT kd

Referenz B. A. Hemmings, Basel (Andjelkovic, Alessi et al. 1997; Meier, Alessi et al. 1997)

Mutation HA-Tag (aminoterminal), K179A

Subcloning s.o.

pB puro AKT act

Referenz B. A. Hemmings, Basel (Andjelkovic, Alessi et al. 1997; Meier, Alessi et al. 1997)

Mutation HA-Tag (aminoterminal), T308D/S473D, (Myristylierung/Palmitoylierungs-Sequenz)

Subcloning s.o.

mycCMV ERK2-MEK1

Referenz M. J. Robinson, Dallas (Robinson, Stippec et al. 1998)

Mutation Fusion der codierenden Sequenz von ERK2, 3`-terminal mit der von MEK1, über eine ein Glutamat-Glycin-Copolymer codierendes Verbindungsstück (EGEGEGEGEGSGGVGSALPGSK)

### 2.1.5 Zellkulturmaterial

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	GIBCO BRL, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Linz
L-Glutamin	GIBCO BRL, Karlsruhe
RPMI 1650	GIBCO BRL, Karlsruhe
SOC Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Streptomycin und Penicillin	GIBCO BRL, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	GIBCO BRL, Karlsruhe
Zellkulturflaschen und -schalen	Sarstedt, Nümbrecht

### 2.1.6 Zelllinien und Bakterienstämme

NIH 3T3	murine embryonale Fibroblasten Zelllinie ATCC (America Type Culture Collection) CRL-1711 o. 1658
23D clone3	promyeloide Zelllinie aus murinem Knochenmark; IL-3 abhängig DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) ACC 411
BaF3	pro B Zelllinie aus murinem peripherem Blut; IL-3 abhängig DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) ACC 300
WEHI-3B	murine myelomonozytäre, Makrophagen ähnliche Leukämie Zelllinie; produzieren IL-3 DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) ACC 26 ECACC 86013003
Phoenix <sup>TM</sup>	Retrovirus producer line basierend auf HEK293 Zellen, transformiert mit Adenovirus E1a und positiv für das temperatursensitive T-Antigen; produzieren die viralen Strukturproteine codiert von gag, pol und env; das gag-pol-Construct wird von einem RSV, das env-Construct von einem CMV Promotor kontrolliert Stanford University, Nolan Laboratory

*E. coli*            *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) GIBCO-BRL, Karlsruhe

### 2.1.7 Antikörper

anti-AKT1/2	Kaninchen, polyclonal	sc-8312, Santa Cruz
anti-ERK1	Kaninchen, polyclonal	sc-94, Santa Cruz
anti-mc-Tag	Maus, monoclonal	9E10, MSZ Würzburg
anti-MEK1	Kaninchen, polyclonal	C-18, Santa Cruz
anti-p(hospho)AKT (S473)	Kaninchen, polyclonal	9271s, New England Biolabs
anti-p(hospho)ERK1/2	Maus, monoclonal	sc-7383, Santa Cruz
anti-p85	Kaninchen, polyclonal	06-195, UBI
anti-Kaninchen IgG gekoppelt an Peroxidase (POD)		Amersham
anti-Maus IgG gekoppelt an Peroxidase (POD)		Amersham
Protein-A gekoppelte Peroxidase		Boehringer

### 2.1.8 rekombinante Proteine

BAD	MSZ Würzburg
ERK2	MSZ Würzburg

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Transformation und Anzucht von Bakterien

#### 2.2.1.1 Transformation von Bakterien

Kompetente Zellen, wie der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$ , haben die Fähigkeit DNA aufzunehmen. Durch Transformation wird Plasmid DNA in bakterielle Wirtszellen eingebracht. Plasmide sind selbst replizierende, zirkuläre, extrachromosomale DNA. Die als Vektoren in Klonierungen genutzten Plasmide zeichnen sich durch einen Replikator, einen Selektionsmarker und eine Klonierungsseite aus.

Zur Transformation werden in einem sterilen Mikrozentrifugengefäß, auf Eis, 3 – 5  $\mu$ l des Ligationsansatzes oder 10 – 50 ng Plasmid DNA vorgelegt. Bei  $-70^{\circ}\text{C}$  lagernde *E. coli* DH5 $\alpha$  werden auf Eis aufgetaut und ein Aliquot von 25  $\mu$ l zur DNA gegeben und vorsichtig gemixt. Auf 30 Minuten Inkubation auf Eis, folgt ein Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 30 Sekunden. Nach Zugabe von 1 ml SOC Medium werden die Zellen eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  bebrütet. Schütteln verbessert die Transformationseffizienz. 200  $\mu$ l der Suspension werden auf, mit

dem entsprechenden Antibiotikum versehenen, LB Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Bei wachsenden Kolonien ist von einer erfolgreichen Transformation mit Plasmid DNA und dadurch gewonnener Antibiotika Resistenz auszugehen.

Einzelständige Kolonien können gepickt und in Flüssigmedien weiter angezüchtet werden.

## **2.2.1.2 Anzucht von Bakterien**

### **2.2.1.2.1 Vorkultur**

Eine einzelständige Kolonie wird von der Agarplatte gewonnen und in 1-2 ml antibiotikahaltiges LB oder TB Medium überführt. Die Vorkultur wird für 8 Stunden bei 37°C unter ständiger Agitation bebrütet. Die Bakterien dienen zur Beimpfung einer größeren Kultur oder, nach „Minipräparation“ der Plasmid DNA, zur Kontrolle einer erfolgreichen Klonierung.

### **2.2.1.2.2 Hauptkultur**

Die Vorkultur wird 1:500 bis 1:1000 in antibiotikahaltigem LB oder TB Medium verdünnt. Wird die Kultur zur Anzucht und anschließenden „Maxipräparation“ von Plasmid DNA genutzt, richtet sich das Volumen der Kultur nach der Kopienzahl des Plasmids und schwankt zwischen 100 und 500 ml (beachte Herstellerangaben).

Das beimpfte Medium wird für 8 – 12 Stunden (über Nacht) bei 37°C auf einem Schüttler (200 – 300 rpm) inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt findet ein Übergang von der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase statt, der RNA Gehalt der Zelle ist noch niedrig. Durch Zentrifugation werden die Bakterien geerntet und können weiter verarbeitet werden.

### **2.2.1.3 Glycerolstock**

Plasmid tragende *E. coli* Stämme können über Jahre bei –70°C in Glycerol haltigem Medium aufbewahrt werden.

150 µl Glycerol (100%) werden in einem entsprechenden Gefäß autoklaviert. Von einer *E. coli* Vor- oder Hauptkultur werden 850 µl in das vorgelegte Glycerol überführt, sorgfältig gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –70°C gelagert.

### **2.2.1.4 Medien zur bakteriellen Kultur**

Alle Medien werden nach der Zubereitung, oder wie angegeben autoklaviert. Nachträglich zugegebene Lösungen, wie auch die Antibiotika, werden zuvor steril filtriert.

<b>LuriaBertani Medium [pro I]</b>	<b>TerifficBroth Medium [pro I]</b>	<b>SOC Medium [pro I]</b>
10 g Tryptone	12 g Bacto tryptone	20 g Tryptone
5 g Hefe Extrakt	24 g Bacto Hefe Extrakt	5 g Hefe Extrakt
10 g NaCl	4 ml Glycerol	0.5 g NaCl
	<i>auf 900 ml, autoklaviert, dann</i>	<i>auf 965 ml, dann</i>
	100 ml 0,17 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> und	10 ml 250 mM KCl
	0,72 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Lösung	5 ml 2 M MgCl <sub>2</sub>
	(steril*)	<i>autoklaviert, dann</i>
	*Filtration durch 0,2µm Filter	20 ml 1 M Glucose (steril*)

#### **2.2.1.4.1 Agarplatten**

Zur Herstellung von Agarplatten werden 1,4% Agar-Agar zu LB Medium gegeben. Nach dem Autoklavieren lässt man das Medium auf 50°C abkühlen, fügt entsprechend Antibiotika hinzu und gießt unter einer „Laminarbox“ („Hood“) die Platten. Für eine 90 mm Petri-Schale sind 30 – 35 ml Medium notwendig. Die Platten werden über eine Stunde in der „Laminarbox“ („Hood“) getrocknet und bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

#### **2.2.1.4.2 Antibiotika**

Die verwendeten Plasmide besitzen einen Selektionsmarker, der eine Antibiotikaresistenz vermittelt. Die Antibiotika werden in einer sterilen Stocklösung bei -20°C gelagert und in entsprechender Konzentration den Kulturmedien nach dem Autoklavieren zugesetzt.

Im Rahmen dieser Promotion wurden ausschließlich Plasmide mit Ampicillinresistenz verwendet. Ampicillin wird den Kulturmedien in einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

### **2.2.2 Plasmid DNA Präparation**

Zur Plasmid DNA Präparation stehen kommerzielle Kits zur Verfügung, die das Prozedere vereinfachen. Verwendet wurden die Produkte QIAGEN Plasmid Mini/Midi/Maxi Kits®.

Die Präparation der Plasmid DNA erfolgt nach Lyse der Bakterien im alkalischen Milieu. Die durch Zentrifugation geernteten Zellen werden in Tris-HCL-EDTA Puffer (P1) resuspendiert und mit NaOH/SDS (P2) lysiert. Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS) löst die Phospholipid- und Protein-Komponenten der Membran und setzt den Zellinhalt frei. Durch Zusatz von RNase A wird die RNA verdaut. Im Anschluss erfolgt die Neutralisation des Lysates durch Zugabe von saurem Kaliumacetat (P3). Die hohe Salzkonzentration führt zur

Präzipitation von Kalium-Dodecyl-Sulfat (KDS), einschließlich denaturierter Proteine, chromosomaler DNA und Zelldetritus, während Plasmid DNA kovalent im Ring geschlossen in Lösung bleibt.

Die Plasmid-Reinigungs-Kits von Qiagen enthalten Anionen-Austauscher-Säulen (Qiagen-tip) mit denen die gelöste Plasmid DNA gewonnen wird. Negativ geladene Phosphate der DNA binden an die Silica Beads. Die adherente Plasmid DNA kann mit einem Puffer (QF) entsprechend hohen pHs und Salzkonzentration eluiert werden. Verunreinigungen, wie RNA und Proteine, werden zuvor mit Puffern (QC) eines anderen Milieus ausgewaschen. Anschließend findet eine Präzipitation des Eluats mit Isopropanol statt. Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen und in 10 mM Tris·Cl [pH 8.5] oder ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Das Qiagen Protokoll in Kürze:

Die kultivierten Zellen werden durch Zentrifugation bei 4°C geerntet und in 0,3 ml (Mini Prep) bzw. 10 ml (Maxi Prep) Puffer P1 resuspendiert. 0,3 ml (Mini Prep) bzw. 10 ml (Maxi Prep) Puffer P2 werden zugesetzt, die Lösung vorsichtig gemischt, um ein Auseinanderschneiden der genomischen DNA zu verhindern, und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0,3 ml (Mini Prep) bzw. 10 ml (Maxi Prep) gekühltem Puffer P3 erfolgt die Fällung des Zelldetritus für 5 (Mini Prep) bzw. 10 Minuten (Maxi Prep) auf Eis. Das Präzipitat lässt sich durch 10- (Mini Prep) bzw. 30- (Maxi Prep) minütige Zentrifugation bei 4°C vom Überstand trennen, der anschließend auf eine mit Puffer QBT equilibrierte Austauschersäule gegeben wird. Hat der Überstand die Säule passiert, wird diese mehrmals mit 1 ml (Mini Prep), bzw. 30 ml (Maxi Prep) Puffer QC gewaschen. Die Elution der Plasmid DNA erfolgt mit 0,8 ml (Mini Prep), bzw. 15 ml (Maxi Prep) Puffer QF. Zugabe von 560 µl (Mini Prep), bzw. 10,5 ml (Maxi Prep) Isopropanol führt zur Präzipitation der DNA. Das durch 30 Minuten Zentrifugation bei  $\geq 15.000 \times g$  und 4°C gewonnene Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 mM Tris·Cl [pH 8.5] oder ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **2.2.3 Photometrische Bestimmung der Nucleinsäure Konzentration**

Mit einem Photometer kann über die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD<sub>260</sub>) der Nucleinsäuregehalt einer Lösung bestimmt werden.

Zur Messung werden standardisierte Quarzküvetten verwendet, in denen zu 297 µl aqua 3 µl der gewonnenen DNA (Verdünnung 1:100) pipettiert werden.



Die Konzentration der Probe berechnet sich wie folgt:

$$\text{Nucleinsäurekonzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{Koeffizient} \times \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung}$$

Nucleinsäure	Koeffizient
dsDNA/Plasmide	50
ssDNA	33
Oligonucleotide	20 – 30

## 2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine verbreitete Methode zur Auftrennung von DNA Fragmenten mit einer Größe von 0,5 – 25 kb. Die Konzentration der Agarose richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente (s. Tabelle).

Agarose Konzentration (% w/v)	DNA Fragmentgröße (kb)
0,3	5 – 60
0,5	1 – 30
0,7	0,8 – 12
1,0	0,5 – 10
1,2	0,4 – 7
1,5	0,2 – 3
2,0	0,05 – 2

Die Wanderung der DNA Fragmente hängt von der Molekülgröße ab und verhält sich invers zum dekadischen Logarithmus derselben. Die Konformation der DNA, zirkulär oder linear, beeinflusst neben anderen Faktoren ebenso die Laufeigenschaften.

Ethidiumbromid, welches dem Gel und Laufpuffer zugesetzt wird, interkaliert mit der DNA. Unter Beleuchtung mit Licht der Wellenlänge 250 – 310 nm fluoresziert die Substanz. Die aufgetrennten DNA Fragmente werden als orange-rote Banden sichtbar und können nach Extraktion aus dem Gel weiter verarbeitet werden.

Es werden verschiedene Puffer verwendet. Tris-phosphat und Tris-borat zeichnen sich durch eine hohe Pufferkapazität und gute Auflösung aus, während Tris-azetat zwar geringere Pufferkapazität und Trennschärfe besitzt, die Extraktion der DNA aus dem Gel aber einfacher ist.

Die Agarose wird in gewünschter Konzentration in 1x TAE, durch Erhitzen der Lösung in einem Mikrowellenofen gelöst. Nach Abkühlung auf 55 – 60°C wird Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 0,5-1µg/ml zugesetzt und die Lösung in ein Gelbett gegossen und die „Kämme“, die die Ladetaschen bilden, eingesetzt. Das erkaltete Gel wird in der Gelkammer mit 1x TAE überschichtet (1mm) und die Taschen beladen. Die DNA ca. 0,2-0,5 µg wird zuvor mit 10x Probenpuffer versetzt. Als Größenmarker werden 0,1 µg eines 1kb DNA Längenstandards aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei einer Spannung von 1-10 V/cm, worunter die DNA in Richtung der Anode wandert. Unter UV Bestrahlung ist die aufgetrennte DNA, wie bereits erwähnt zu detektieren.

	<b>1x Solution</b>	<b>Stock Solution (pro l)</b>
<b>TAE Elektrophoresepuffer</b>	40 mM Tris-acetat [pH 7,8] 2 mM EDTA	<b>50x</b> 242 g Tris 57,1 ml Eisessig 37,2 g Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O
<b>TPE Elektrophoresepuffer</b>	80 mM Tris-phosphat [pH 7,8] 2 mM EDTA	<b>10x</b> 108 g Tris 15,5 ml 85% Phosphorsäure 40 ml 0,5 M EDTA
<b>TBE Elektrophoresepuffer</b>	89 mM Tris-borat [pH 7,8] 89 mM Borsäure 2 mM EDTA	<b>10x</b> 108 g Tris 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA
<b>Probenpuffer</b>	40% (w/v) Saccharose 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol	

### 2.2.5 Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wird mit dem Qiex II Kit<sup>®</sup> durchgeführt. Das Kit beruht auf der Verflüssigung des Gels und selektiven Adsorption der freigesetzten DNA an Silica Partikeln in einem Milieu hoher Salzkonzentrationen. Die hohe Salzkonzentration im Puffer QX1 zerstört die Hydrogenbindung der Zucker im Agarosegel, verflüssigt es und führt zur Dissoziation DNA-bindender Proteine. Die hohe Elektrolytkonzentration zwingt die DNA zur Bindung an das Silica Gel. Hohe Salzkonzentrationen fördern die Adsorption von Fragmenten kleiner 100 bp, während Fragmente größer 4 kb besser bei niedrigeren Konzentrationen binden. Der optimale pH zur Adsorption ist ≤7,5 und kann mit 3M Natriumacetat angepasst werden. Mit dem Überstand

und durch Waschen mit QX1 Puffer werden Agarose, Proteine und Ethidiumbromid entfernt, während der Ethanol haltige Puffer PE die Silica Partikel von Salzverunreinigungen befreit.

Die Elution der adherenten DNA erfolgt bei niedriger Salzkonzentration. Typischerweise wird 10 mM Tris·Cl [pH 8.5] oder H<sub>2</sub>O verwendet. Der optimale pH zur Elution liegt im basischen. Abhängig von der Größe der DNA Fragmente wird für optimale Ergebnisse die Temperatur erhöht.

Das Protokoll in Kürze (s. Handbuch):

Die zu extrahierende DNA Bande wird aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem dreifachen Volumen/Gewicht des Puffers QX1 versetzt. 10 – 30 µl QIAEX II<sup>®</sup> Silica Partikel werden zugefügt und der Reaktionsansatz für 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Nach Zentrifugation wird der Überstand entfernt und das Pellet nacheinander mit 500 µl Puffer QX1 und PE gewaschen. Nach Trocknung des Pellets wird die DNA mit 20 µl 10 mM Tris·Cl [pH 8.5] oder ddH<sub>2</sub>O nach Herstellerangabe eluiert.

## **2.2.6 Aufreinigung und Konzentrierung von DNA**

Eine verbreitete Methode zur Entfernung von Verunreinigungen, wie Proteinen, aus DNA, ist die Phenolextraktion und Präzipitation der DNA mit Ethanol. Dieses Protokoll wird in modifizierter Form auch zum Nachweis der apoptotischen DNA-Leiter verwendet.

0,1 – 0,4 ml der DNA Lösung werden mit der gleichen Menge Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol des Verhältnisses 25:24:1 (v/v/v), hergestellt aus gepuffertem Phenol, versetzt und vorsichtig vermischt. Die Trennung der Phasen erfolgt durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge für einige Sekunden bis Minuten. Die obere wässrige und DNA haltige Phase wird in ein neues Gefäß überführt. Die Reinheit der DNA kann durch Wiederholung dieser Schritte gesteigert werden, insbesondere wenn sich zwischen den Phasen ein weißliches Präzipitat gebildet hat. Der gewonnenen wässrigen Phase wird 0,1 Volumen 3M Natriumacetat [pH 5,2] und 2 – 2,5 Volumina eiskalten 96% Ethanols zugesetzt und vorsichtig gemischt. Die DNA wird für 10 Minuten auf Trockeneis gefällt und bei 4°C und 14.000 rpm für 5 – 10 Minuten in der Zentrifuge pelletiert. Das Pellet wird mehrfach mit 96% Ethanol und anschließend 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Die trockene DNA wird in 10 mM Tris·Cl [pH 8.5] oder ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

## **2.2.7 Subcloning von DNA**

### **2.2.7.1 Restriktionsverdau**

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen ist eine häufig angewandte und zur Analyse und weiteren Verarbeitung von DNA notwendige Methode.

Restriktionsendonucleasen sind bakterielle Enzyme, die die DNA binden und spalten. Die Bindung erfolgt an einer, für das Enzym spezifischen palindromen Sequenz. Restriktionsendonucleasen zeichnen sich durch ihre divergierenden Anforderungen an den Reaktionspuffer, die Temperatur und ihre unterschiedlichen Schneidemuster aus. Unterschiedliche optimale Salzkonzentrationen und Reaktionstemperaturen erschweren unter Umständen das praktische Vorgehen beim Verdau mit verschiedenen Enzymen. Ein primärer Verdau der Endonuclease mit der niedrigeren nötigen Salzkonzentration, gefolgt von einem zweiten Verdau mit einem zweiten Enzym bei angepasster, höherer Salzkonzentration, gelingt zumeist.

Eine Unit (U/Einheit) ist die Menge einer Restriktionsendonuclease, die 1 µg DNA in einer Stunde spaltet. Ein 20 µl Reaktionsansatz enthält 0,1 – 4 µg DNA, 2 µl des entsprechenden, in der Salzkonzentration angepassten 10x Restriktionspuffer, 1-5 U der Restriktionsendonuclease und eine entsprechende Menge ddH<sub>2</sub>O, wobei die Enzymmenge nicht mehr als 1/10 des Gesamtansatzes ausmachen sollte. Glycerin, das dem Enzym beigemischt ist, hemmt in höheren Konzentrationen die Reaktion. Nach 1 – 2 Stunden Inkubation bei optimaler Temperatur wird die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Agarosegel-Ladepuffer (20% des Reaktionsvolumens) oder durch Komplexbilden der Mg<sup>2+</sup> Ionen mit 0,5 µl 0,5 M EDTA (Endkonzentration 12,5 mM) gestoppt.

### **2.2.7.2 „Blunt-ended“ und „sticky-ended“ Fragmente**

Wie bereits erwähnt, haben die Restriktionsendonucleasen unterschiedliche Schnittmuster. Einige Enzyme schneiden in der Mitte des Pallindroms, unter Ausbildung glatter (blunt) Enden, andere produzieren 3' oder 5' überhängende Enden (sticky ended). „Sticky-ended“ Fragmente können mit anderen komplementären Fragmenten leicht konjugiert werden, während „blunt-ended“ Fragmente nur sehr viel ineffektiver ligiert werden können. Ein Vorteil von „blunt-ended“ Fragmenten ist, dass sie sich mit jedem anderen glatten Fragment legieren lassen. Wenn erforderlich werden „sticky-ended“ Fragmente in „blunt-ended“ übergeführt.

Das Klenow-Fragment ist die carboxyterminale Portion der *E. coli* DNA Polymerase I. Es besitzt die 5'→ 3' Polymeraseaktivität des Gesamtzyms, hat aber keine 3'→ 5' Exonucleaseaktivität und vermag 5' überhängende Enden durch auffüllen mit den entsprechenden *dNTPs* in glatte überzuführen. In einem 20 µl Reaktionsansatz wird 1 µg DNA mit 2 µl 10x „nick-translation“ Puffer, 2 mM *dNTP4* (0,5 mM jeder *DNTP*), 2 U Klenow-Fragment und einer entsprechenden Menge ddH<sub>2</sub>O gemischt und bei 20 – 37°C für

15 Minuten inkubiert und die Reaktion durch 15 minütiges Erhitzen auf 75°C oder Zugabe von 1µl 0,5 M EDTA gestoppt.

Die „Mung Bean“ Nuclease ist eine hochspezifische Einzelstrang Endonuclease, die überhängende Basen deletiert und somit glattändige Fragmente generiert.

In einem 100µl Reaktionsansatz werden 1µg DNA, 10µl 10x „Mung Bean“ Puffer, 15 U „Mung Bean“ Nuclease und eine entsprechende Menge ddH<sub>2</sub>O gemischt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1µl 0,5 M EDTA gestoppt.

Durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung lässt sich die DNA aufreinigen.

### **2.2.7.3 Dephosphorylierung von DNA 5'Enden**

Die Entfernung von 5' terminalen Phosphaten der Vector DNA schützt vor Selbstligatur des Vectors. Calf Intestine Phosphatase (CIP) hydrolysiert die Phosphatreste mit hoher Aktivität. In einem 20µl Reaktionsansatz werden 1 – 2µg DNA, 2µl 10x CIP- Puffer, 1U CIP und eine entsprechende Menge ddH<sub>2</sub>O gemischt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wird durch 15 minütiges Erhitzen auf 75°C gestoppt.

### **2.2.7.4 Ligation**

DNA- Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen dem 5'Phosphat- und dem 3'Hydroxyl- Rest in doppelsträngiger DNA. Die T4 DNA- Ligase ist die einzige Ligase, die effektiv unter normalen Reaktionsbedingungen „blunt-ended“ Fragmente verbindet. Die Ligation von „sticky-ended“ DNA Fragmenten und Plasmid DNA wird bei 12 – 15°C ausgeführt. Unter dieser Temperatur besteht ein Gleichgewicht zwischen dem Annealing der Basen und der Aktivität der Ligase. „Blunt-ended“ Inserts und Plasmid DNA benötigen zur Ligation 10 – 100-mal mehr Enzym, die Reaktion kann allerdings bei Raumtemperatur ausgeführt werden. 0,1 (– 5) µg der DNA in einem molaren Verhältnis Insert:Vector von 3:1 für „sticky-ended“ und 10:1 für „blunt-ended“ Ligation wird in einem 20µl Ansatz mit 2µl 10mM ATP, 2µl 10x Ligationspuffer, 10U („sticky-end“) – 100U („blunt-end“) T4 DNA Ligase und einer entsprechenden Menge ddH<sub>2</sub>O vermischt und über Nacht bei 16°C („sticky-end“), bzw. Raumtemperatur („blunt-end“) inkubiert. Die Reaktion wird durch 15 minütiges Erhitzen auf 75°C gestoppt.

Mit dem Ligationsansatz werden dann kompetente Bakterien transformiert.

<b>10x „nick-translation“ Puffer</b>	<b>10x „Mung Bean“ Puffer</b>
0,5 M Tris Cl [pH 7,5]	0,3 M Na-Acetat [pH 7,5]
0,1 M MgCl <sub>2</sub>	0,5 M NaCl
10 mM DTT	10 mM Zn-Acetat
0,5 mg/ml BSA	0,5 mg/ml BSA

<b>10x CIP Puffer</b>	<b>10x Ligationspuffer</b>
0,2 M Tris Cl [pH 8,0]	0,5 M Tris Cl [pH 7,5]
10 mM MgCl <sub>2</sub>	50 mM MgCl <sub>2</sub>
10 mM ZnCl <sub>2</sub>	50 mM DTT
0,5 mg/ml BSA	0,5 mg/ml BSA

### 2.2.8 Zellkultur

Die eukaryotischen Zellen werden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Feuchtigkeit im Brutschrank gehalten. Alle Zellkulturarbeiten finden unter sterilen Bedingungen an einem Arbeitsplatz mit laminarem, sterilem Luftstrom statt. Die eingesetzten Materialien sind autoklaviert, alle Lösungen autoklaviert oder sterilfiltriert.

Allen Nährmedien wird, zur normalen Kultivierung, 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS; Inaktivierung: 45 Minuten bei 56°C), 2 mM L-Glutamin und jeweils 100µg/ml Penicillin und Streptomycin zugesetzt.

<b>Zelllinie</b>	<b>Medium</b>	<b>Split</b>
<b>WEHI-3B</b>	RPMI 1640	1 zu 10, alle 3 Tage
<b>32D</b>	RPMI 1640	
<b>BA/F3</b>	+ 15% WEHI Überstand	
<b>NIH 3T3</b>	Dulbecco`s modified Eagle`s medium (DMEM)	1 zu 10, bei Subkonfluenz
<b>Phoenix amphi</b>		

Adhärenz Zellen werden zum Splitten von altem Medium befreit, vorsichtig mit PBS gewaschen und die Adhäsion mit 0,5% Trypsin EDTA gelöst. Nach Resuspension mit Medium wird ein Teil der Zellen verworfen, der Rest erneut mit frischem Medium in Kultur genommen.

## 2.2.9 Transiente Transfektion

Zur Einbringung von DNA in eukaryotische Zellen stehen verschiedene Methoden zur Auswahl.

Die zu transfizierenden Zellen werden am Vortag in *6-well*- Gefäßen so ausgesät, dass zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 70% erreicht ist.

Unmittelbar vor der Transfektion nach der Calcium-Präzipitations Methode werden die Zellen mit frischem Medium (2 ml) versehen.

Die mit LipofektAMIN<sup>®</sup> zu transfizierenden Zellen werden zweimalig mit serumfreien Kulturmedium gewaschen, um Serumreste zu entfernen.

### 2.2.9.1 Calcium-Präzipitation

Bei dieser Methode wird die DNA mit Calciumphosphat präzipitiert und als Präzipitat von der Zelle inokuliert.

Zu 1-3 µg der entsprechenden DNA in 135 µl ddH<sub>2</sub>O werden 15 µl CaCl<sub>2</sub> 2,5M gegeben und gut vermischt. Unter ständiger Agitation werden 150 µl 2x BES hinzu getropft. Der Ansatz wird für 15 – 20 Minuten bei Raumtemperatur belassen und dann vorsichtig zu den zu transfizierenden Zellen gegeben; auf eine gleichmäßige Verteilung der Präzipitate ist zu achten. Nach 6 Stunden Inkubation im Brutschrank wird der Zellüberstand abgesaugt, die Zellen 2 – 3 mal mit PBS (einmalig PBS mit 1mM EDTA) gewaschen und mit neuem Medium versehen.

#### 2x BES

5mM BES [pH6,97]

280mM NaCl

1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

### 2.2.9.2 Lipofektion

Negativ geladene Moleküle, wie DNA, bilden mit polykationischen Lipiden in Liposomen Komplexe. Die Komplexe verschmelzen mit der Zellmembran und entlassen die DNA in das Zytoplasma.

NIH 3T3 Zellen lassen sich nur sehr ineffektiv mit der Calciumpräzipitations Methode transfizieren, bei diesen kommt die Lipofektion zum Einsatz

1 – 2 (- 25) µg der entsprechenden DNA werden mit 100 µl des serumfreien Kulturmediums versetzt. In einem zweiten Ansatz werden 6 µl (-25 µl) LipofektAMIN<sup>®</sup> mit 100 µl serumfreien Kulturmediums vermischt und anschließend die beiden Ansätze vereinigt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird der Reaktionsansatz auf 1 ml, mit Medium ohne FCS, ergänzt und auf die zuvor zweimalig, mit serumfreien Medium, gewaschenen Zellen gegeben. 5 – 6 Stunden nach der Transfektion wird die Transfektionslösung gegen frisches Medium ausgetauscht.

## **2.2.10 Herstellung stabiler Zelllinien**

Ungefähr eine von  $10^4$  transfizierten Zellen integriert die eingeführte DNA in ihr Genom. Derartig integrierte DNA wird stabil transkribiert, während es bei der transienten Transfektion als Folge der Zellteilung zu einer allmählichen Ausdünnung der eingeführten DNA kommt, was einem Stop der Proteinproduktion gleichkommt. Zur Herstellung stabiler Zelllinien werden Vektoren verwendet, die ein Resistenzgen enthalten. Die Selektion der stabil transformierten Zellen ist mit dem entsprechenden Chemotherapeutikum möglich.

### **2.2.10.1 Herstellung stabiler Zelllinien mit einem retroviralen Transduktionssystem**

Retrovirale Vektoren werden genutzt, um nichtvirale Gene in mitotische Zellen einzuführen. Die Vektoren entstammen retroviralen Proviren, die durch Deletion einige oder alle Gene einbüßen, die die zur Bildung eines infektiösen Partikel benötigten Strukturproteine kodieren. Den Vektoren gemein ist das „packaging signal“ Psi Ψ, sowie die LTR- Sequenz (long term repeat), die den viralen Promoter, Enhancer und die Polyadenylierungssequenz enthält.

Nach Deletion eines einzelnen oder aller viraler Gene *gag*, *pol* und *env* entsteht ein Genom das replikationsinkompetent ist. Zur Generierung infektiöser Viruspartikel werden sogenannte „packaging cell lines genutzt“, die die fehlenden strukturellen Proteine exprimieren.

Transfektion einer solchen Zelle führt zur transienten, von nicht integrierter, oder stabiler Transkription, von integrierter Plasmid DNA. Das virale Transkript enthält das „packaging signal“ Ψ, welches von Capsidproteinen erkannt, zur Produktion von infektiösen Partikeln führt. Der Kulturüberstand enthält die Viren, die zur Infektion der entsprechenden Zellen dienen.



Das Phoenix System ist eine „packaging cell line“ oder „retrovirus producer cell line“, die zur Helferviren freien Produktion von ecotropen und amphotropen Retroviren genutzt wird. Sie wurde in den Nolan Laboratories der Stanford University etabliert und basiert auf der 293T Zelllinie.

Phoenix Zellen werden am Vortag so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 60-70% erreicht haben. Die Transfektion erfolgt nach dem Calciumphosphat Protokoll in 6-well-Platten. Die Präzipitate werden für 24 Stunden auf den Zellen belassen, erst dann wird das Medium gegen frisches ausgetauscht. 48 Stunden nach der Transfektion wird der Überstand abpipettiert, bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und durch einen 0,45 µm Filter „steril“ filtriert.  $5 \times 10^5$  der zu infizierenden BaF3 und 32D Zellen werden in 1 ml des Virusüberstandes aufgenommen, mit 4 µg Polybrene und 250 µl WEHI Überstand versetzt. Der Austausch des Mediums gegen frisches, WEHI haltiges Medium, erfolgt nach 24 Stunden. Nach weiteren 24-48 Stunden ist von einer erfolgreichen reversen Transkription, Integration und Expression auszugehen. Die Selektion wird mit 2 µg/ml Puromycin durchgeführt, das Selektionsmedium täglich erneuert.

## **2.2.11 Survival-Assay**

### **2.2.11.1 32D und BaF3 Zellen**

Die beiden haematopoetischen Zelllinien 32D und BaF3 bedürfen für Wachstum und Überleben der Stimulation durch IL-3. Nach Entzug des Wachstumsfaktors verharren sie in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Phase des Zellzyklus und sterben bei ausbleibender Stimulation einen apoptotischen Zelltod. Durch Entzug des Wachstumsfaktors kann also Apoptose induziert und studiert werden.

Zu diesem Zwecke werden die Zellen einer Kultur zentrifugiert, das Medium abgesaugt und das Pellet 2–3 mal mit RPMI 1640 gewaschen, um letzte Reste des Wachstumsfaktors auszuspülen. In einer Dichte von  $0,5 \times 10^6$ /well werden die Zellen in 6-well-Platten ausgesät. Das Medium RPMI 1640 ist mit 10% FCS, Penicillin, Streptomycin und L-Glutamin versetzt und, sofern nicht anders angegeben, frei von WEHI Überstand und damit IL-3.

In einigen Experimenten kommen die sich in Struktur und Wirkungsweise unterscheidenden „zytotoxischen“ Substanzen Doxorubicin, U0126 und LY294002 zum Einsatz. U0126 und LY294002 sind in DMSO gelöst und werden, entsprechend der angegebenen Konzentration, der Zellkultur zugesetzt. Die Kontrollgruppe erhält lediglich das Lösungsmittel DMSO.

### **2.2.11.2 NIH 3T3 Zellen**

Doxorubicin ist in Wasser gelöst. Es inhibiert die Topoisomerase II und löst bei NIH 3T3 Fibroblasten den apoptotischen Zelluntergang aus.

Im entsprechenden Experiment werden die  $0,25 \times 10^6$  Fibroblasten in 6-well-Platten ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit der angegebenen Menge des Anthracyclins versetzt. Die Zellen werden bis zum angegebenen Zeitpunkt im Brutschrank inkubiert, zur Ernte in ein Röhrchen überführt und weiter verarbeitet oder nach Anfärbung mit Trypanblau unter dem Lichtmikroskop die Zahl und das Verhältnis von lebenden und toten Zellen bestimmt.

### **2.2.12 Trypanblaufärbung**

Die Schädigung der Zellmembran in der späten Apoptose, aber auch während der Nekrose, erlaubt den Eintritt von Trypanblau in die Zelle und dessen Bindung an intrazelluläre Proteine. Viable, vitale Zellen werden nicht penetriert, also auch nicht angefärbt und können so von toten oder sterbenden Zellen unterschieden werden.

Die auf ihre Vitalität zu überprüfenden Zellen werden geerntet, mit PBS gewaschen und mit 0,5 ml Trypanblau (je nach eingesetzter Zahl an Zellen, diese zuvor verdünnen) versetzt. Nach 5 Minuten Inkubation wird ein Haemocytometer mit einem Tropfen der Zellsuspension gefüllt.

Die Viabilität errechnet sich nach folgender Formel:

$$\% \text{ lebende Zellen} = \text{Zahl gefärbter Zellen} \times 100 / \text{Gesamtzahl der Zellen}$$

### **2.2.13 SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS – PAGE)**

SDS ist ein anionisches Detergenz, das in einem festen Verhältnis von 1.4:1 an lösliche Polypeptide bindet. Die Polypeptide werden dadurch denaturiert, größtenteils ihre Sekundär- und Tertiärstruktur zerstört. Disulfidbrücken werden zuvor durch 2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol reduziert. Der resultierende Polypeptid-SDS-Komplex hat eine einheitliche negative Ladung, so dass sich das Laufverhalten im elektrischen Feld nach der Größe des Komplexes und aufgrund des festen Bindungsverhältnis proportional zur Größe des Polypeptides verhält.

In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese kommen diskontinuierliche Systeme zum Einsatz, die sich durch ein in Sammel- und Trenngel separiertes Gel auszeichnen. Das Sammelgel bewirkt eine „Kompression“ des zu trennenden Polypeptidgemisches vor Eintritt ins Trenngel, was eine höhere Trennschärfe garantiert.

Das Gießen der Gele wird in einem Gelgießstand durchgeführt, in dem pro Gel zwei Glasplatten, durch „Spacer“ getrennt, eingespannt sind. Das Trenngel von 6-15% setzt sich

wie angegeben zusammen. Das Verhältnis von ddH<sub>2</sub>O zu Acrylamid/Bisacrylamid richtet sich nach der gewünschten Dichte des Gels. TEMED (N-, N'-tetramethylenediamine) wird zuletzt zur Lösung gegeben, gefolgt von vorsichtigem, aber gründlichem Mischen. Die Lösung wird rasch zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen, bis zu einer Markierung, die mindestens eine 1 cm Laufstrecke im Sammelgel gewährleistet. Ein Überschichten des unpolymerisierten Gels mit Isopropanol sorgt für eine gleichmäßige Oberfläche. Nach der vollständigen Polymerisation wird der Alkohol entfernt und das Trenngel gegossen, in das der, die Ladetaschen generierende, „Kamm“ eingebracht wird.

<b>Trenngel (10 ml)</b>		<b>Sammelgel</b>	
1,25 ml	3 M Tris [pH8,9]	1,25 ml	1,0 M Tris [pH6,8]
1,5-3,75 ml	Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (40%)	1,1 ml	Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (40%)
0,05 ml	20% SDS	0,05 ml	20% SDS
5-7,25 ml	ddH <sub>2</sub> O	6,8 ml	ddH <sub>2</sub> O
0,1 ml	10% APS	0,1 ml	10% APS
10 µl	TEMED	10 µl	TEMED

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in einer Elektrophorese-Kammer, in der das Gel zwischen zwei Tanks, die mit Laufpuffer gefüllt sind, eingespannt ist. Die Proteine wandern vom Sammelgel ausgehend durch das Trenngel zur Anode.

Das zu fraktionierende Proteingemisch (ca. 50 µg) wird nach Zugabe einer identischen Menge eines 2x SDS-Ladepuffers für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Taschen des Gels werden beladen und die Elektrophorese bei einer Spannung von 10 V/cm durchgeführt.

<b>Laufpuffer</b>		<b>SDS-Ladepuffer (1x Lämmli)</b>	
25 mM	Tris [pH8,3]	60 mM	Tris [pH6,8]
190 mM	Glycin	10 % (v/v)	Glycerol
0,1 % (w/v)	SDS	3 % (w/v)	SDS
		5 % (v/v)	2-Mercaptoethanol
		0,05 % (w/v)	Bromphenolblau

### 2.2.14 Immunoblot

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden zunächst auf eine Nitrocellulose Membran übertragen. Hierzu wird das Sammelgel abgeschnitten, das Laufgel auf der einen Seite mit mehreren Lagen Blotting-Papier und auf der anderen Seite zunächst mit einer Nitrozellulose- Membran gefolgt von Blotting-Papier belegt. Alle Papiere und Membranen sind anzufeuchten und auf luftblasenfreies Arbeiten zu achten. In der Blotting-Kammer, die Transferpuffer enthält, erfolgt der Transfer unter einer Stromstärke von 800 mA (1.9 - 2.5 mA per cm<sup>2</sup>) in ungefähr 45 Minuten; die Nitrocellulose ist dabei auf der Seite der Anode anzubringen.

#### Transferpuffer

39 mM	Tris [pH8,3]
48 mM	Glycin
0,037 % (w/v) SDS	

Die auf die Nitrocellulose Membran transferierten Proteine werden von spezifischen Antikörpern im Immunoblot gebunden und können in einer Meerrettich-Peroxidase-Reaktion detektiert werden:

Die trockene Nitrocellulose Membran wird für 10 Minuten in Puffer eingeweicht und anschließend mit Blocking-Puffer über eine Stunde die unspezifischen Bindungen gesättigt. Die geblockte Membran wird mit dem ersten, spezifischen Antikörper (1:1000 in PBSTB verdünnt) über drei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert, gefolgt von einem 1 x 10 und 2 x 5 minütigen Waschvorgang mit PBST. Danach wird die Membran mit einem zweiten, gegen den ersten gerichteten Antikörper (1:2000 in PBSTB verdünnt) für 30 – 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang erfolgt die Detektion der antikörpergebundenen Proteine mit ECL.

Der zweite Antikörper ist mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert, die unter alkalischen Bedingungen Luminol oxidiert und damit in einen aktivierten Zustand überführt. Bei Rückführung in den Grundzustand wird Licht emittiert.

Überschüssiges ECL wird mit Filterpapier entfernt und ein Film der Membran exponiert.

<b>Diluent-Puffer (PBST)</b>		<b>Blocking-Puffer (PBSTB)</b>	
PBS	+ 0,05 % (v/v) Tween20	PBS	+ 0,05 % (v/v) Tween20 + 5 % (w/v) Milchpulver, bzw. + 5% BSA, bei Phosphoserin/ threonin spezifischen Antikörpern

### 2.2.15 Immunopräzipitation

Nonadherente Zellen werden zur Ernte in ein Röhrchen überführt, abzentrifugiert, das Medium abgesaugt und die Zellen 2-3-mal mit PBS gewaschen.

Adherente Zellen werden vom Medium befreit und ebenfalls 2-3-mal vorsichtig mit PBS in der Kulturschale, ohne den Zellrasen zu lösen, gewaschen.

Alle Lösungen befinden sich auf Eis, alle Arbeiten werden ebenfalls auf Eis oder bei 4°C ausgeführt.

<b>NP-40- Lysis-Puffer</b>		<b>PI3K- Lysis-Puffer</b>	
10 mM	HEPES [pH7,4]	50 mM	HEPES [pH7,5]
145 mM	KCl	150 mM	NaCl
5 mM	MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mM	EGTA	1 mM	EGTA
0,2 % (v/v)	NP-40 (IGEPAL)	1% (v/v)	Triton X-100
1 M	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	10% (v/v)	Glycerol
1 M	NaF	1 mM	PMSF
100 µg/ml	Pefabloc	0,2 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
1 mg/ml	Leupeptin	100 mM	NaF
10 mg/ml	Aprotinin	10 µg/ml	Leupeptin
		10 µg/ml	Aprotinin

Die Lyse erfolgt unter Zugabe von 1 ml eines der beiden Lysis-Puffer für 10-20 Minuten. Die unlöslichen Zelltrümmer werden durch Zentrifugation bei 15000 rpm über 15 Minuten und vorsichtiges Abpipettieren des Überstandes entfernt. 25 µl des Überstandes werden als Lysatkontrolle mit SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Der verbliebene Überstand wird mit 25 µl Protein-A-Agarose für eine Stunde auf

einem Rotator präabsorbiert. Im Anschluss erfolgt die Inkubation des Überstandes mit 25 µl Protein-A-Agarose und dem spezifischen Antikörper (nach Herstellerangabe) über zwei Stunden auf dem Rotator. Die Beads werden nach Entfernen des Überstandes zweimalig mit Lysis-Buffer gewaschen und in einem Kinase-Assay weiterverarbeitet oder unter Zugabe von 100µl SDS-Ladepuffer (1x/2x Lämmli), laut Protokoll, im SDS-Page analysiert.

## 2.2.16 “in vitro” Kinase-Assay

Kinasen übertragen Phosphatgruppen von ATP auf ihre Substrate. In einem Kinase-Assay wird die Aktivität einer Kinase bestimmt und diese über, als Substrat angebotenes [<sup>32</sup>P-γ]-ATP, detektiert.

### 2.2.16.1 MEK Kinase-Assay

Zunächst wird wie oben beschrieben eine Immunopräzipitation mit einem MEK1 spezifischem Antikörper durchgeführt. Die Präzipitate werden zweimal mit Lysis-Puffer und zweimal mit dem Kinase-Puffer gewaschen. Die Kinase Reaktion wird durch Zugabe von 30 µl Kinase-Puffer, 10 µM ATP, 10 µCi [<sup>32</sup>P-γ] ATP und 1 µg Substrat (bakteriell exprimiertes, aufgereinigtes Kinase-totes ERK2) gestartet. Die Kinase Reaktion wird für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler durchgeführt und unter Zusatz von 10 µl 6x SDS-Ladepuffer (6x Lämmli) und Erhitzen gestoppt.

Die Proben werden im SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und sowohl per Autoradiographie als auch im Immunoblot detektiert.

#### MEK- Kinase-Puffer

25 mM	HEPES [pH 7,4]
150 mM	NaCl
25 mM	Glycerophosphat
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mM	DTT

### 2.2.16.2 PI3K Kinase-Assay

PI3-Kinase wird mit einem spezifischen Antikörper gegen die regulatorische Untereinheit p85 präzipitiert. Das Präzipitat wird nach der Immunopräzipitation zweimal mit PI3K-Lysis-Puffer und zweimal mit dem Rinse-Puffer gewaschen. Die Kinase Reaktion wird durch Zugabe von 50 µl PI3K- Kinase-Puffer, 10 µCi [<sup>32</sup>P-γ] ATP, 5 µg „sonicated“ PtdIns und 5 µg „sonicated“ Phosphatidylserine gestartet. Nach 10 Minuten Reaktion bei 30°C

werden die Produkte mit Chloroform/Methanol (1:1) extrahiert, mit Methanol/HCl (1:1) gewaschen und unter N<sub>2</sub> getrocknet. 20 µl nichtradioaktives PtdIns-Phosphat wird als interne Kontrolle zugesetzt und die Phospholipide erneut in Chloroform aufgenommen. Die Auftrennung erfolgt durch Dünnschichtchromatographie. Nichtradioaktives PtdInsP wird durch Anfärbung mit Jod, und die Kinaseprodukte durch Autoradiographie unter Exposition eines Röntgenfilmes visualisiert.

<b>Rinse-Puffer</b>		<b>PI3K- Kinase-Puffer</b>	
50 mM	Hepes [pH7,5]	20 mM	Tris [pH7,5]
150 mM	NaCl	100 mM	NaCl
0,5 mM	EGTA	5 mM	MgOAc
10 %	Glycerol	5 mM	MnCl <sub>2</sub>
0,2 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	0,5 mM	EGTA
		200 µM	Adenosin
		20 µM	ATP

## 3 Ergebnisse

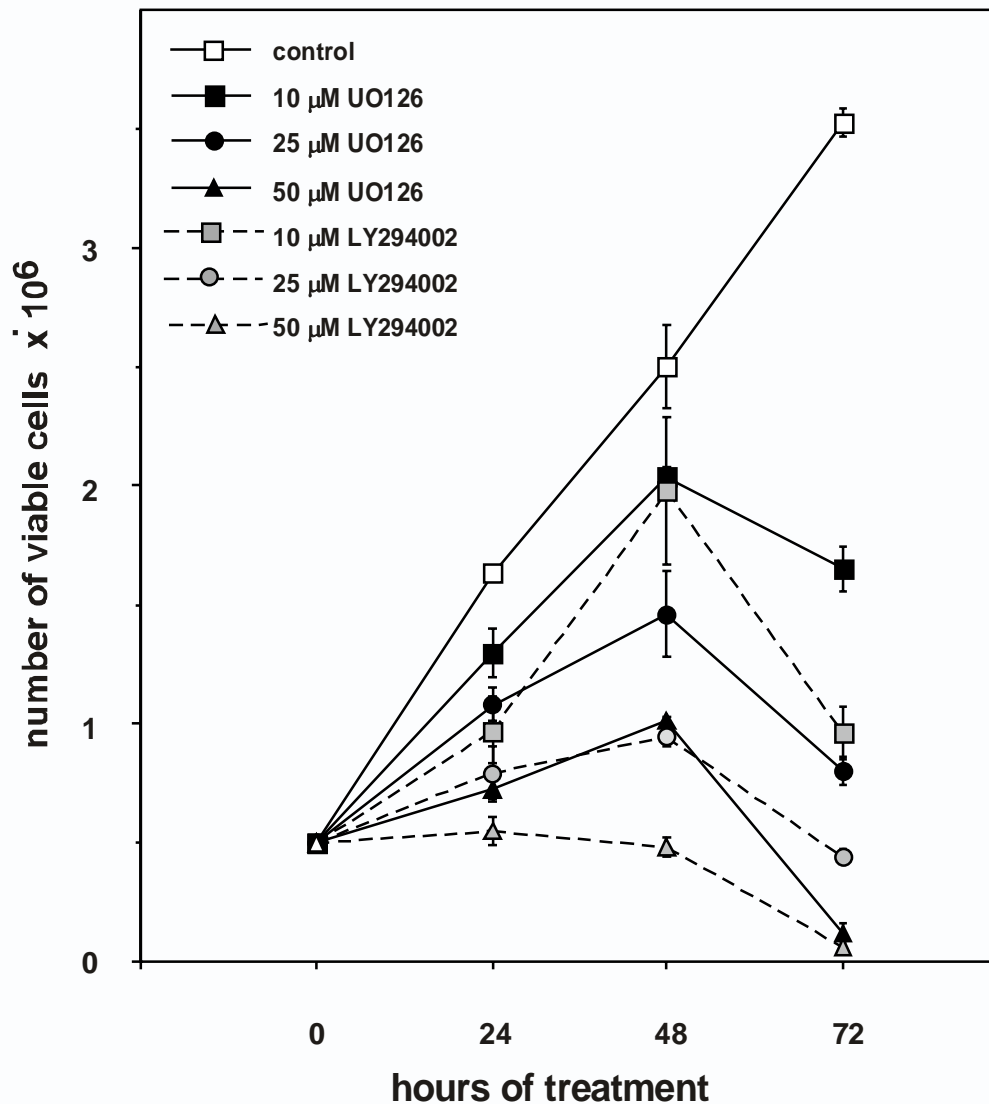
### 3.1 *IL-3 induziertes Zellwachstum und -überleben ist von MEK und PI3K Signalwegen abhängig*

Ein Großteil der Versuche wurde in der IL-3 abhängigen, immortalisierten, Myeloblasten ähnlichen Zelllinie 32D durchgeführt (Greenberger, Sakakeeny et al. 1983). Wachstum und Überleben dieser Zellen ist von der Anwesenheit von IL-3 abhängig. In Reaktion auf Entzug des Wachstumsfaktors arretieren diese Zellen in der G1 Phase des Zellzyklus und sterben dann ( $\geq 80\%$ ) innerhalb von 24 Stunden unter Ausbildung der typischen morphologischen Veränderungen von Zellen während der Apoptose ab (Cleveland, Troppmair et al. 1994). Die Signaltransduktion, ausgehend vom IL-3 Rezeptor, erfolgt überwiegend über die Aktivierung des JAK/STAT Weges und über Effektor Signalwege des kleinen G Proteins Ras. Sowohl Raf als auch PI3K sind als Ras Effektoren beschrieben (Carroll, Clark-Lewis et al. 1990; Gold, Duronio et al. 1994) und ihre nachgeschalteten Module MEK/ERK und AKT sind weitere Vermittler im Signalweg.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, führt die Expression von onkogenem Raf (gag-v-raf) zusammen mit v-Myc zu Transformation und starkem Tumorenwachstum (Rapp, Cleveland et al. 1985). Die Expression beider Proteine in einer IL-3 abhängigen Zelllinie lässt diese, auch in Abwesenheit ihres Wachstumsfaktors, wachsen, wie Cleveland et al. (Cleveland, Dean et al. 1988) zeigten. Wenig später wurde die Fähigkeit zur Suppression der Apoptose für isoliert exprimiertes onkogenes gag-v-Raf beschrieben. Die Expression des Onkogens verzögert in 32D Zellen das Einsetzen der Apoptose nach Entzug des Wachstumsfaktor, ist jedoch nicht ausreichend, um eine völlige Unabhängigkeit zu induzieren (Cleveland, Troppmair et al. 1994). Raf kooperiert mit Bcl-2 in diesem Prozess. Die weitere Untersuchung der Raf-Bcl-2 Kooperation zeigte eine Komplexierung beider Proteine, jedoch ohne den Charakter eines Enzym-Substrat Verhältnisses (Wang, Miyashita et al. 1994). Bcl-2 dient vielmehr als Adaptor für C-Raf an das Mitochondrium, wo dieses seinen anti-apoptotischen Effekt entfaltet. Die Expression einer aktiven an die äußere Mitochondrienmembrane gerichteten C-Raf Mutante imitiert die Raf/Bcl-2 Beziehung und bietet der Zelle ebenso Schutz. C-Raf vermittelt seinen anti-apoptotischen Effekt unabhängig von der bekannten MAPK-Kaskade über MEK und ERK, vermutlich durch Phosphorylierung und Inaktivierung des pro-apoptotischen Bcl-2 Homologen BAD (Wang, Rapp et al. 1996).



Entzug von IL-3 führt sowohl zu einem Stopp im Zellwachstum als auch zu Zelltod. Zunächst war daher zu überprüfen, ob beide Effekte die Funktion von MEK und PI3K erfordern.



**Abbildung 7: Effekt von MEK und PI3K Inhibitoren auf IL-3 induziertes Wachstum von 32D Zellen**

32D Zellen wurden in Medium mit 15% WEHI Überstand kultiviert und mit unterschiedlichen Konzentrationen der Inhibitoren für MEK (U0126) und PI3K (LY294002) inkubiert. Prozent lebender Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten; Mittelwert mit Standardabweichung.

32D Zellen wurden unter adäquaten Bedingungen für Überleben und Proliferation, also unter Supplementation des Zellkulturmediums mit 15% WEHI Überstand, als Quelle für IL-3, kultiviert. In mehreren Parallelansätzen wurden unter solch optimalen Bedingungen wachsende Zellen mit den synthetischen Inhibitoren U0126 und LY29004 in verschiedenen Konzentrationen versetzt. U0126 unterbindet sowohl die Raf abhängige Aktivierung von MEK, als auch die Transduktion des Signals durch MEK (Ahn, Nahreini et al. 2001).

LY29004 inhibiert PI3K und damit die Aktivierung von AKT (Vlahos, Matter et al. 1994). Im Abstand von 24 Stunden wurden die Zellen gezählt, wobei tote, apoptotische Zellen durch den Einschluss von Trypanblau identifiziert werden konnten. Wie aus der Abbildung 7 (Seite 56) ersichtlich ist, ist die Proliferation von 32D Zellen, gemessen an der absoluten Zahl lebender Zellen, sowohl von MEK als auch PI3K Signalen abhängig. Die Suppression der Proliferation ist, je nach Konzentration des Inhibitors, unterschiedlich stark ausgeprägt. Hohe Konzentrationen auch nur einer Substanz sind ausreichend, um die Proliferation gänzlich zu unterbinden. Dieser Befund lässt vermuten, dass die Aktivität eines Signalweges allein nicht ausreichend ist, das Wachstum der Zellen zu stimulieren, sondern dass beide gemeinschaftlich notwendig sind.

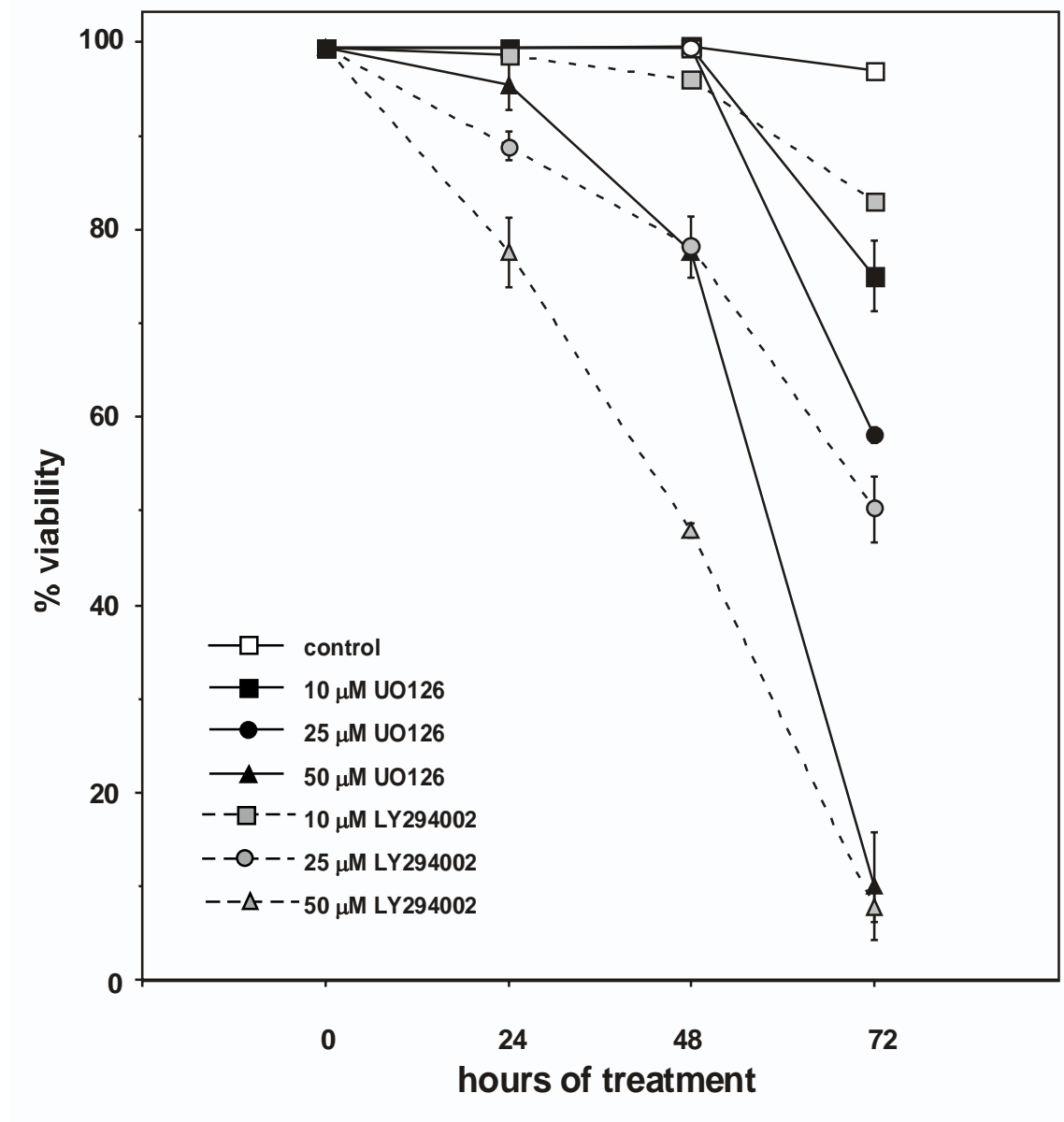
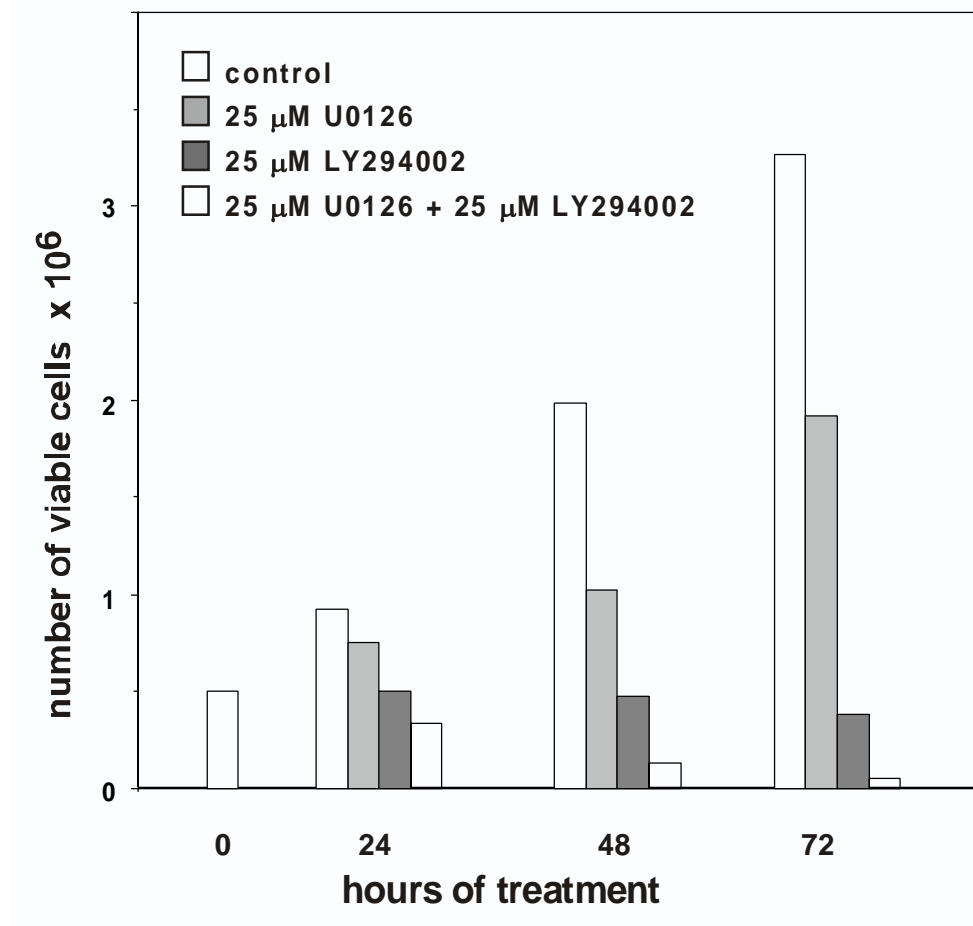


Abbildung 8: Effekt von MEK und PI3K Inhibitoren auf Il-3 induziertes Überleben von 32D Zellen

32D Zellen wurden in Medium mit 15% WEHI Überstand kultiviert und mit unterschiedlichen Konzentrationen der Inhibitoren für MEK (U0126) und PI3K (LY294002) inkubiert. Viabilität zu den angegebenen Zeitpunkten; Mittelwert mit Standardabweichung.

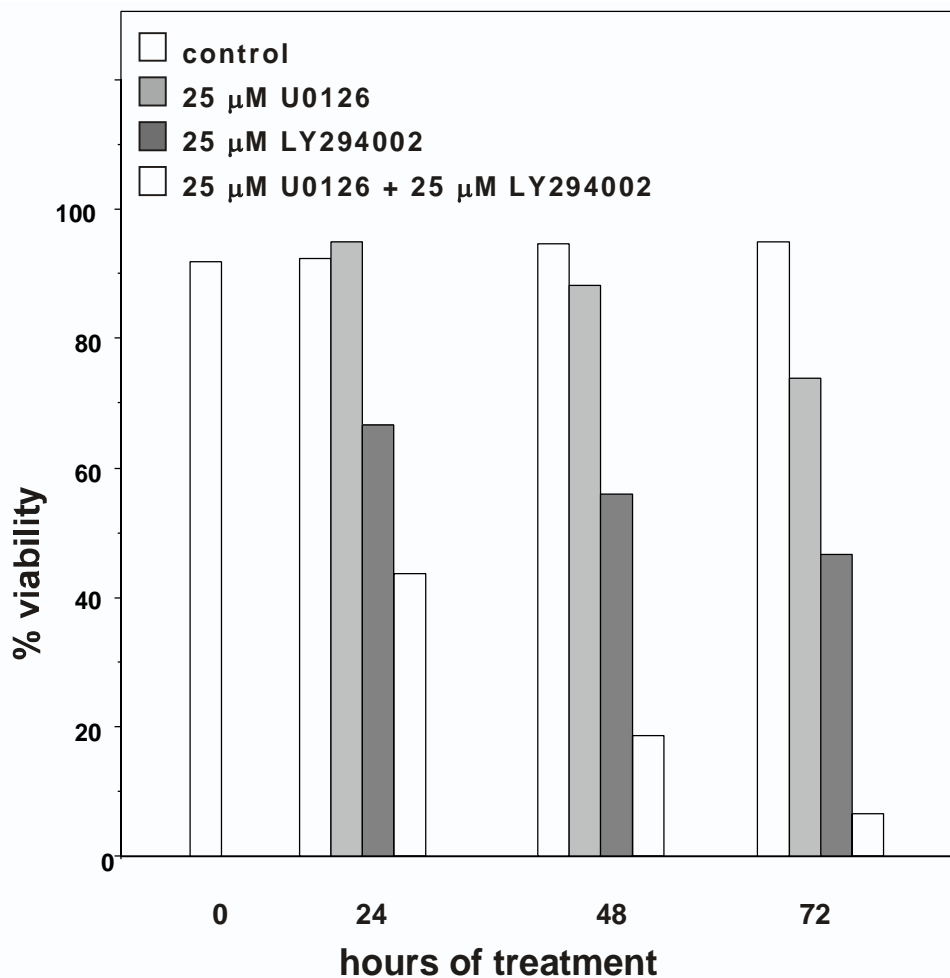
Die Bedeutung von MEK, als ein Teil des Raf/MEK/ERK Moduls, für die Proliferation, aber auch Transformation und Differenzierung ist hinlänglich bekannt (Cowley, Paterson et al. 1994; Troppmair, Bruder et al. 1994; Kerkhoff and Rapp 1997; Kerkhoff and Rapp 1998; Hartkamp, Troppmair et al. 1999). Das Ergebnis aus diesem Versuch mit dem Inhibitor von MEK war also zu erwarten. Interessant ist aber, dass die gleiche Beobachtung auch für die Viabilität zutrifft (Abbildung 8, Seite 57). Abhängig von der Konzentration des Inhibitors ist sie unterschiedlich stark reduziert. Hohe Konzentrationen von U0126 oder LY29004 sind nicht mit dem Leben der Zellen vereinbar, was wiederum die Erforderlichkeit beider Signalwege zeigt, diesmal in der Prävention des Todes der Zelle.



**Abbildung 9: Effekt von MEK und PI3K Inhibitoren auf Il-3 induziertes Wachstum von 32D Zellen**

32D Zellen wurden in Medium mit 15% WEHI Überstand kultiviert und entweder mit dem Inhibitor für MEK (U0126) oder PI3K (LY294002) oder simultan mit beiden Inhibitoren inkubiert. Prozent lebender Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten.

Um auszuschließen, dass hohe Konzentrationen von U0126 eine unspezifische toxische Wirkung haben, auf der der inhibitorische Effekt auf Proliferation und Viabilität beruht, wurde eine Kombination beider Inhibitoren in einer niedrigen Konzentration eingesetzt. Wie schon im letzten Versuch, hat U0126 in einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  einen nur geringen Einfluss auf das Überleben der Zellen, zumindest zu frühen Zeitpunkten. LY29004 hingegen zeigt unter der gleichen Konzentration eine deutliche Wirkung. Bei Kombination beider, mit einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$ , wird dieser bereits signifikante Effekt des LY29004 signifikant verstärkt. Sowohl die Zahl der lebenden Zellen als auch die Viabilität der Population ist durch die gleichzeitige Blockade beider Signalwege mit niedrigen Hemmstoffkonzentrationen stärker beeinträchtigt als durch eine Substanz allein, wie in Abbildung 9 und Abbildung 10 (Seite 58 und 59) verdeutlicht wird.

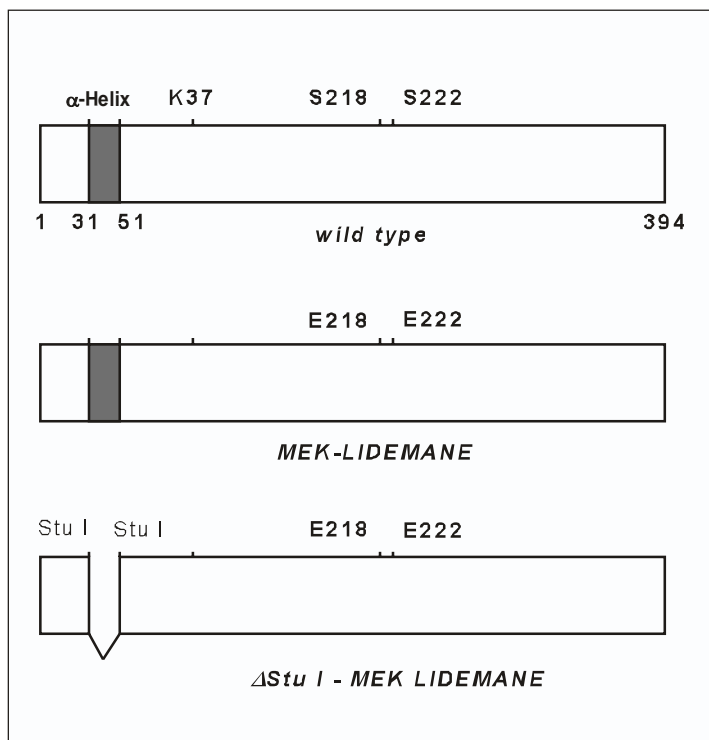


**Abbildung 10: Effekt von MEK und PI3K Inhibitoren auf Il-3 induziertes Überleben von 32D Zellen**

32D Zellen wurden in Medium mit 15% WEHI Überstand kultiviert und entweder mit dem Inhibitor für MEK (U0126) oder PI3K (LY294002) oder simultan mit beiden Inhibitoren inkubiert. Viabilität zu den angegebenen Zeitpunkten.

### 3.2 Expression von aktiviertem MEK führt zur Suppression der Apoptose

Die ersten Versuche festigen die Vorstellung, dass der MEK Signalweg für die Proliferation aber auch das Überleben der Zellen notwendig ist. Weitere Versuche sollten die Rolle von MEK im Schutz vor dem programmierten Zelltod genauer charakterisieren. Es wurden 32D Zellen etabliert, die verschiedene Mutanten des Kaninchen MEK1 stabil exprimieren (siehe Methoden).



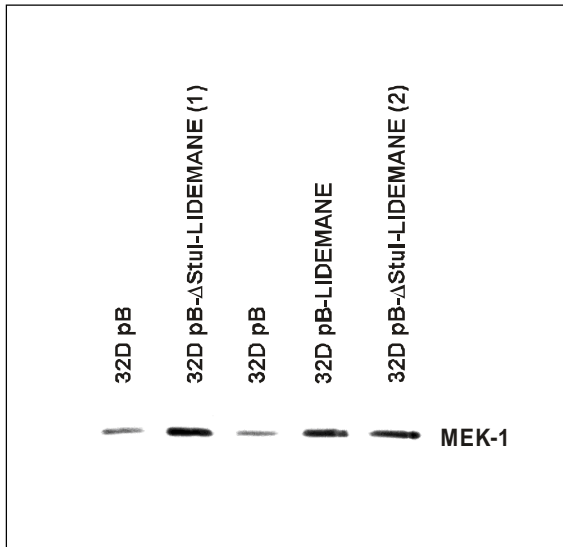
**Abbildung 11: Schematische Darstellung von MEK1 und konstitutiv aktiver Mutanten**

Aktivierung resultiert aus der Phosphorylierung der beiden Serine 218 und 222 oder konstitutiv aus dem Austausch dieser durch Glutamat, MEK LIDEMANE. Zusätzliche Deletion der alpha Helix mittels des Restriktionsenzym *Stu*I führt zu einer weiteren Aktivierung, MEK  $\Delta$ *Stu*I-LIDEMANE.

Zwei der Mutanten sind konstitutiv aktiv. Raf aktiviert MEK1 durch Phosphorylierung an den Serinen in Position 218 und 222 in der Sequenz LIDSMANS<sub>S</sub>. Der Austausch dieser Serine durch Glutamat resultiert in der Aktivierung von MEK (Cowley, Paterson et al. 1994). Weitere Mutationsanalysen deckten die Bedeutung einer alpha Helix für die negative Regulierung der Kinaseaktivität auf. Diese 20 Aminosäuren umfassende Sequenz wird von Schnittstellen des Restriktionsenzym *Stu*I flankiert, das zur Deletion dieser Domäne während der Klonierung verwendet wurde. Ihre Entfernung führt zu einer weiteren Aktivierung der Mutante. Gemäß den Veränderungen in der Sequenz werden die resultierenden Mutanten MEK LIDEMANE und MEK  $\Delta$ *Stu*I-LIDEMANE bezeichnet. Eine schematische Darstellung

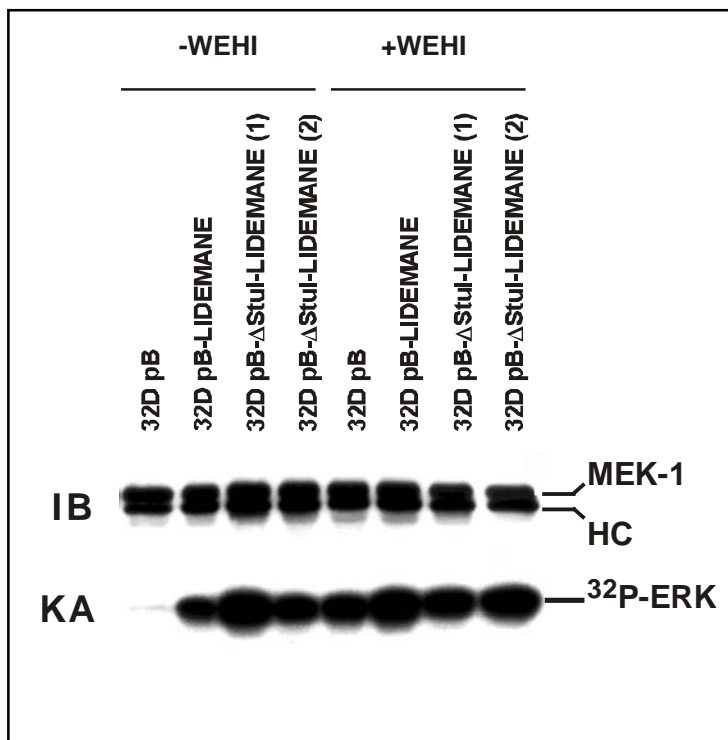
gibt Abbildung 11 (Seite 60) Als Klonierungsvektor wurde der retrovirale Vektor pBABEpuro (Morgenstern and Land 1990) verwendet, der es erlaubt in der Verpackungszelllinie Phoenix Viruspartikel herzustellen, die dann für die Infektion der 32D Zellen verwendet wurden. Außerdem trägt dieser Vektor ein Puromycin Resistenzgen, das es ermöglicht infizierte Zellen durch Puromycinselektion anzureichern.

Der Erfolg der Infektion wurde nach Selektion der Zellen mit Puromycin im Western-Blot verifiziert. Abbildung 12 (Seite 62) zeigt den auf MEK1 geproben Immunoblot. Die Zellen der Vektorkontrolle in der ersten und dritten Bande exprimieren das endogene MEK. Die Überexpression der unterschiedlichen MEK Mutanten ist in den etwas stärkeren Banden zu erkennen. Die konstitutive Aktivität der MEK Mutanten lässt sich in einem Kinase-Assay überprüfen. Die verschiedenen Zellpopulationen wurden in einem doppelten Ansatz unter voller Substitution von Serum und WEHI Überstand, der als Quelle für das für Wachstum und Überleben essentielle IL-3 fungiert, gehalten oder für 24 Stunden bei reduziertem Serum und ohne WEHI Überstand, um eine Stimulation des Signalweges durch exogene Faktoren zu verhindern, belassen. Nach der Lyse der Zellen wurde MEK1 immunopräzipitiert und den Präzipitaten, in Anwesenheit von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP, kinasetotes ERK2 als Substrat dargeboten. Die Phosphorylierung des Substrates konnte nach Auftrennung der Proteine durch SDS/PAGE, Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und Filmexposition sichtbar gemacht werden. In den ersten vier Banden (Abbildung 13, KA; Seite 62) sind die „gehungerten“ Zellen aufgetragen. Die Vektorkontrolle (pB) zeigt nach 24 Stunden Zytokinentzug keine oder nur noch marginale Aktivität des endogenen MEK. Im Gegensatz dazu gibt das von den konstitutivaktiven MEK Mutanten phosphorylierte ERK in den Banden zwei bis vier (pB-LIDEMANE und pB- $\Delta$ Stu-LIDEMANE) ein deutliches Signal. Die durch WEHI Zugabe stimulierte endogene MEK der Vektorkontrolle in Bande fünf ist gleichwohl in der Lage das Substrat zu phosphorylieren, während in den Zellen, die die MEK Mutanten exprimieren keine weitere Steigerung beobachtet wird.. Der Erfolg der Immunopräzipitation und der Einsatz vergleichbarer Mengen von MEK im Kinase-Assay ist im Immunoblot nach Anfärbung von MEK1 zu sehen (Abbildung 13, IB; Seite 62). Knapp unterhalb der MEK-Bande läuft die schwere Kette des zur Präzipitation verwendeten Antikörpers. Die Aktivität der transgenen MEK unter Ausschluss einer Stimulation durch Zytokine ist somit nachgewiesen.



**Abbildung 12: Stabile Expression von aktiviertem MEK-1 in 32D Zellen**

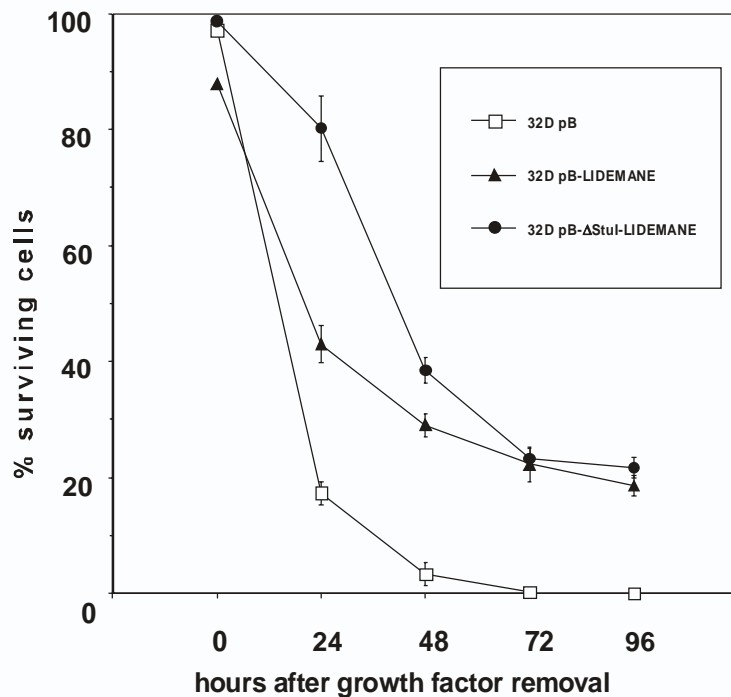
Retrovirale Infektion von 32D Zellen zur stabilen Expression des Vektors (pB) oder der konstitutiv aktiven MEK Mutanten (pB LIDEMANE und pB  $\Delta$ Stu-LIDEMANE). Kontrolle der Expression im Western Blot nach MEK-1. 32D pB Zellen exprimieren nur endogenes MEK-1.



**Abbildung 13: MEK Kinase-Assay**

Darstellung der Kinaseaktivität nach 24 Stunden Inkubation in Abwesenheit (–WEHI) oder Anwesenheit (+WEHI) von WEHI konditioniertem Medium. Immunpräzipitation von MEK nach Zellyse und Durchführung eines Immunkomplex Kinase-Assay mit bakteriell exprimiertem ERK2 als Substrat. Kontrolle der Expression im Western Blot nach MEK-1 (IB). Kinaseaktivität als Radiographie von  $^{32}$ P-ERK (KA).

32D Zellen verharren nach Entzug von IL-3 in der G<sub>1</sub> Phase des Zellzyklus und zeigen nach 24 Stunden ausgebliebener Stimulation durch Zytokine alle physiologischen, als auch biochemischen Veränderungen einer apoptotisch sterbenden Zelle (Cleveland, Troppmair et al. 1994). Wie der erste Versuch gezeigt hat ist nicht nur das Wachstum, sondern auch das Überleben der 32D Zellen von einem intakten MEK Signalweg abhängig. Es drängt sich nunmehr die Frage auf, ob aktiviertes MEK allein in der Lage ist, 32D Zellen nach Entzug von IL-3 vor dem Tod durch Apoptose zu retten. 32D Zellen, die entweder den leeren Vektor pBabe tragen oder aber die konstitutivaktiven MEK Mutanten -LIDEMANE und - $\Delta$ Stu-LIDEMANE exprimieren, wurden extensiv gewaschen und in Abwesenheit von IL-3 erneut ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen gezählt, die apoptotischen über Trypanblau Aufnahme identifiziert und so die Viabilität der unterschiedlichen Populationen bestimmt.



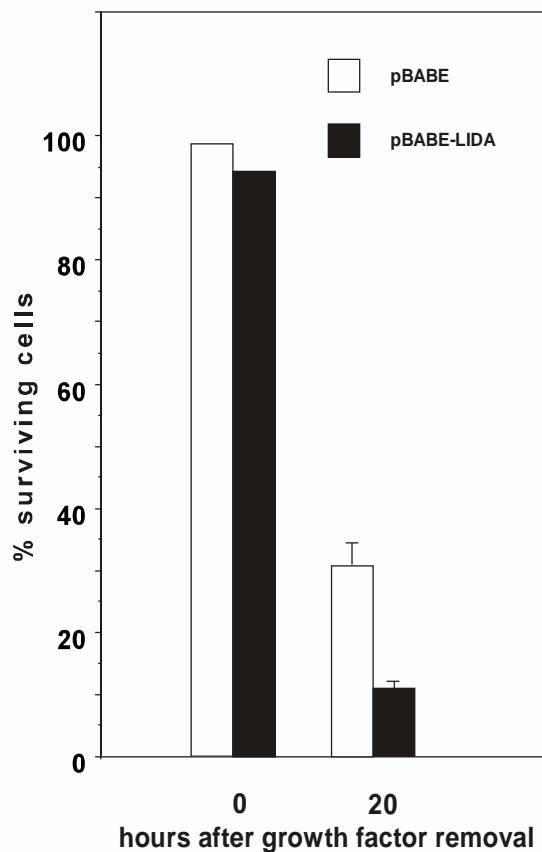
**Abbildung 14: Expression von aktiviertem MEK verzögert Apoptose von 32D Zellen**

Leeren Vektor (pB) und konstitutiv aktives MEK (MEK LIDEMANE und MEK  $\Delta$ Stu-LIDEMANE) exprimierende 32D Zellen wurden in Abwesenheit von WEHI inkubiert. Prozent lebender Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten; Mittelwert mit Standardabweichung.

Wie Abbildung 14 (Seite 63) zeigt kommt es in der Kontrollgruppe 32D pB bereits nach 24 Stunden zu einem massiven Verlust vitaler Zellen. Der apoptotische Zelluntergang ist in der Gruppe der pB-LIDEMANE exprimierenden 32D Zellen deutlich attenuiert. Die Viabilität der pB- $\Delta$ Stu-LIDEMANE Population ist nur wenig beeinträchtigt. 48 Stunden nach Entzug von IL-3 hat in der Kontrollgruppe nur eine marginale Zahl an Zellen überlebt, nach



72 Stunden ist in dieser Gruppe Leben praktisch nicht mehr existent. Die Population der pB-LIDEMANE und pB- $\Delta$ Stu-LIDEMANE nähern sich 48 Stunden nach Versuchsbeginn in ihrer Viabilität an. Selbst nach prolongiert ausbleibender Stimulation durch Zytokine ist ein Teil der Zellen noch vital. Wie aber bereits früher für aktiviertes C-Raf beschrieben, ist die Expression von aktiviertem MEK aber nicht ausreichend, um diesen Zellen das Wachstum in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren zu erlauben.



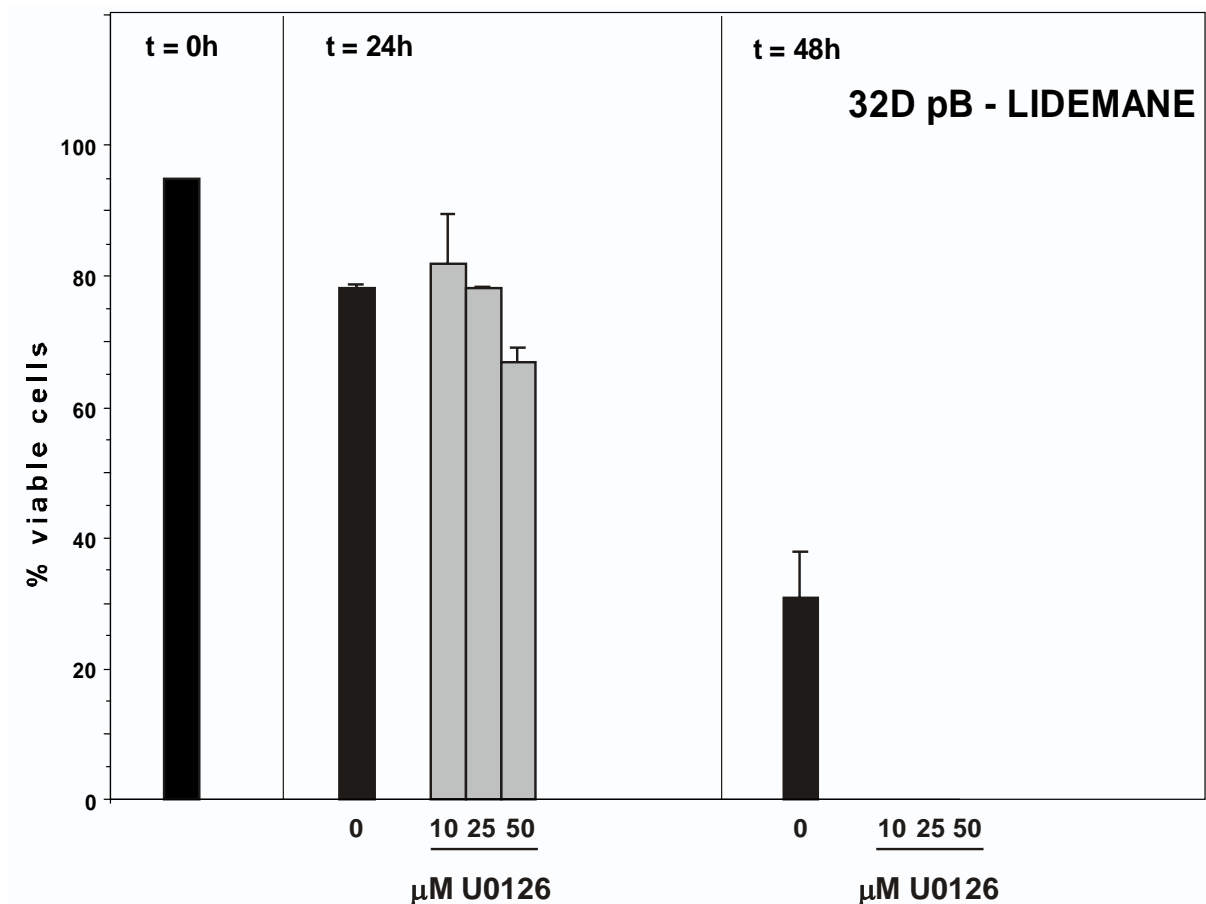
**Abbildung 15: Expression einer dominant negativen Form von MEK akzeleriert Apoptose von 32D Zellen**  
 Leeren Vektor (pBABE) und eine dominant negativen Form von MEK (pBABE-LIDA) exprimierende 32D Zellen wurden in Abwesenheit von WEHI inkubiert. Prozent lebender Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten; Mittelwert mit Standardabweichung.

Sollte das prolongierte Überleben der Zellen tatsächlich auf einem MEK-vermittelten Effekt beruhen, müsste eine dominant negative Mutante von MEK dies antagonisieren. MEK-LIDA ist eine solche, dominant negative Form. In der Sequenz LIDSMANS in der Kinasedomäne wurde das Serin 218 gegen Alanin ausgetauscht, was zur Sequenz LIDA führt (Cowley, Paterson et al. 1994). Diese Mutante ist resistent gegenüber der Aktivierung durch Raf und verhindert nach Überexpression auch die Aktivierung von endogenem MEK. 32D Zellen, die das Konstrukt pB-MEK-LIDA oder nur den Vektor pB exprimieren wurden

extensiv gewaschen und ebenso ohne Zusatz von IL-3 erneut ausgesät. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Zahl der lebenden und apoptotischen Zellen bestimmt. Der Entzug des Wachstumsfaktors führt in der Kontrollgruppe zu dem bereits zuvor beobachteten dramatischen Untergang der Zellen, der durch die Expression der kinasetoten und dominant negativen Form von MEK noch weiter akzeleriert wird (Abbildung 15, Seite 64). Eine Antagonisierung von MEK abhängigen Signalwegen führt zum Zelltod durch Apoptose. Diese zuvor schon mit dem Inhibitor U0126 zu erhebenden Befunde ließen sich durch den Einsatz einer dominant negativen MEK Mutante hier nochmals bestätigen.

### ***3.3 Die Suppression der Apoptose durch MEK1 geht mit prolongierter Aktivität von ERK1 und -2 einher und erfordert die Kinaseaktivität von MEK1***

Der präventive Effekt, der von MEK-LIDEMANE und MEK- $\Delta$ Stu-LIDEMANE ausgeht und die Zellen vor der Apoptose schützt, beruht am wahrscheinlichsten auf der konstitutiven Aktivität der MEK Mutanten. Zur Bestätigung wurden Zellen der einzelnen Populationen erneut gewaschen und unter den bekannten Bedingungen, also ohne IL-3 ausgesät, diesmal jedoch unter Zusatz verschiedener Konzentrationen des Inhibitors U0126. Als Kontrollgruppe dienten Zellen der jeweiligen Population, die nur mit dem Lösungsmittel des Inhibitors versetzt wurden. U0126 ist nicht nur als Inhibitor der Raf-spezifischen Phosphorylierung von MEK bekannt, sondern unterbindet auch die MEK-spezifische Aktivierung der weiteren Effektoren (Fruman, Mauvais-Jarvis et al. 2000; Ahn, Nahreini et al. 2001). Die Viabilität der Zellen wurde wiederum in 24 stündigen Abständen bestimmt. Der Einsatz niedriger Konzentrationen von U0126 zeigt in den pB-MEK-LIDEMANE exprimierenden Zellen nach 24 Stunden Inkubation zunächst noch keinen Effekt. Unter einer hohen Dosis von 50  $\mu$ M ist die Viabilität im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch erniedrigt (Abbildung 16, Seite 66). Der Befund deckt sich mit den Ergebnissen der vorherigen Versuche (siehe Kapitel 3.1, Seite 55ff) in denen niedrige Konzentrationen eine nur insuffiziente Wirkung zeigen.

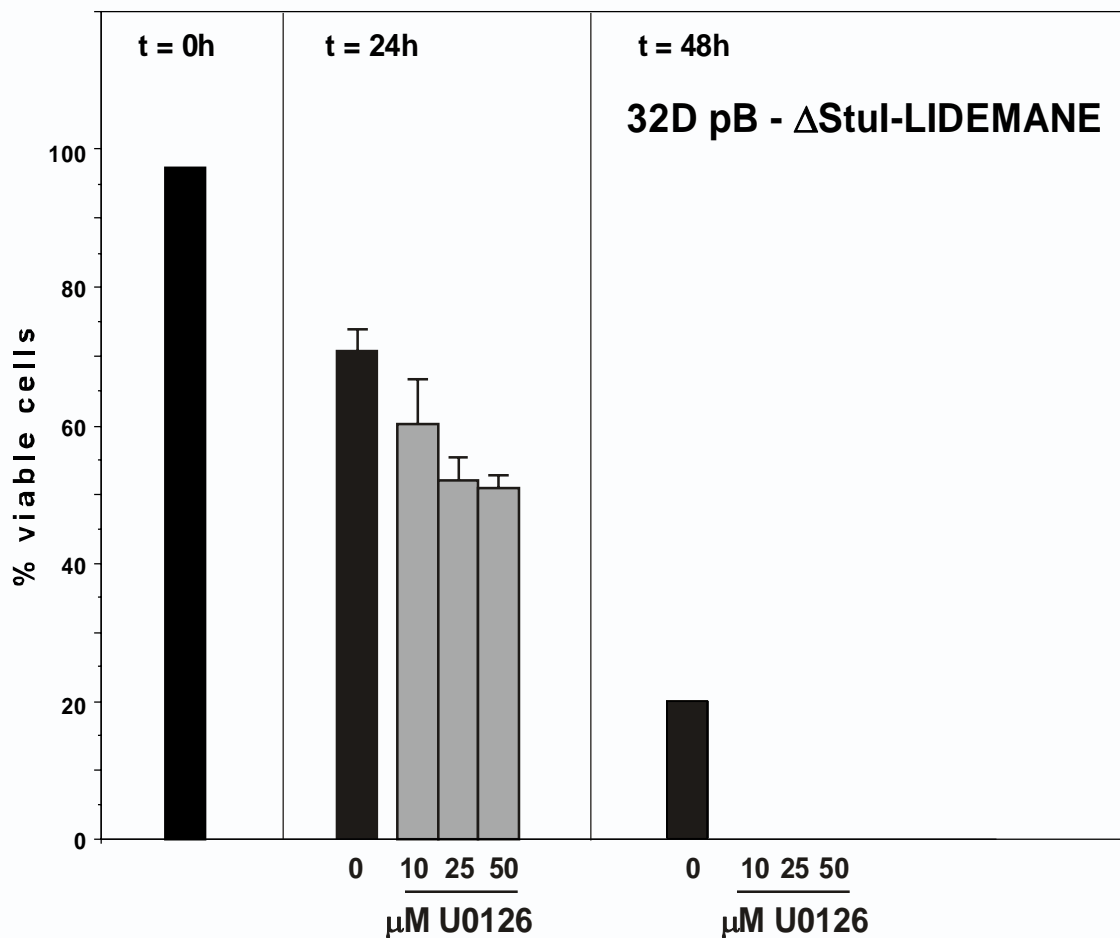


**Abbildung 16: Suppression der Apoptose durch MEK LIDEMANE wird durch einen Inhibitor von MEK gehemmt**

Konstitutiv aktives MEK LIDEMANE exprimierende 32D Zellen wurden in Abwesenheit von WEHI mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors für MEK (U0126) inkubiert. Prozent lebender Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten; Mittelwert mit Standardabweichung.

Interessanterweise werden die 32D pB-ΔStu-LIDEMANE Zellen auch schon von niedrigen Konzentrationen des Inhibitors beeinträchtigt (Abbildung 17, Seite 67).

Nach 48 Stunden ist die Wirkung des Inhibitors unbestritten. Gleich welche Konzentration von U0126 zum Einsatz kommt, in keiner der beiden Populationen, weder in der 32D pB-LIDEMANE, noch in der 32D pB-ΔStu-LIDEMANE exprimierenden, hat nach 48 Stunden eine mehr als marginale Zahl an Zellen überlebt. Die Viabilität der Kontrollgruppe dagegen ist signifikant höher.

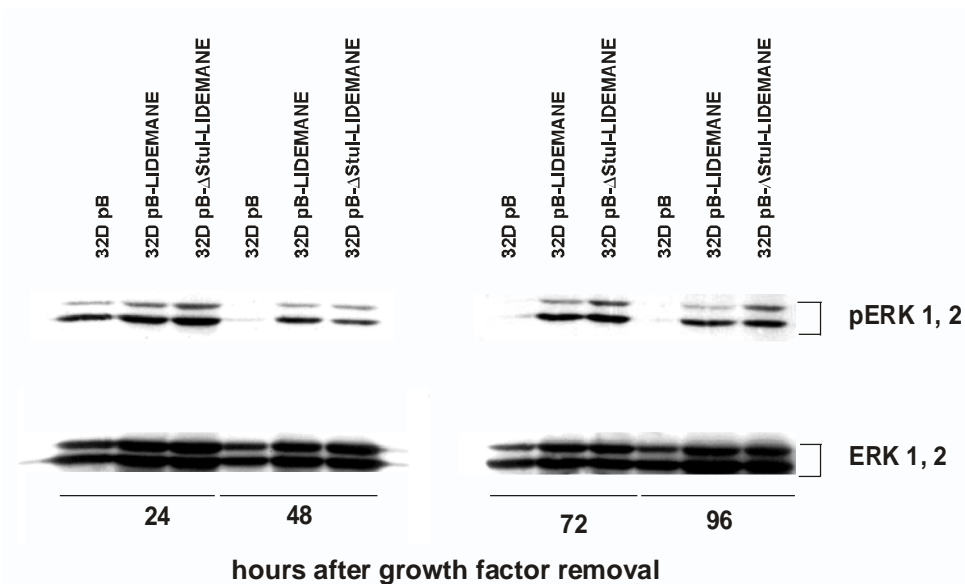


**Abbildung 17: Suppression der Apoptose durch MEK  $\Delta$ Stu-LIDEMANE wird durch einen Inhibitor von MEK gehemmt**

Konstitutiv aktives MEK  $\Delta$ Stu-LIDEMANE exprimierende 32D Zellen wurden in Abwesenheit von WEHI mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors für MEK (U0126) inkubiert. Prozent lebender Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten; Mittelwert mit Standardabweichung.

Es ist wahrscheinlich, dass konstitutiv aktives MEK, analog zu dem Signalweg in der mitogenen Kaskade Raf/MEK/ERK, sein einzig bekanntes Substrat ERK aktiviert und über diesen Weg das Signal zum Überleben der Zelle vermittelt. In dem, unter Kapitel 3.2 (Seite 60 ff) beschriebenen Versuch wurde von den gehungerten 32D Zellen, die entweder den leeren Vektor pB oder aber pB-LIDEMANE oder pB- $\Delta$ Stu-LIDEMANE tragen, zu den gegebenen Zeiten ein Zelllysate angefertigt. Die Lysate wurden auf ein Gel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und im Western-Blot mit phospho-ERK Antikörpern, bzw. ERK1/2 Antikörpern geprobt. Der phospho-ERK Antikörper erkennt spezifisch (von MEK1) phosphoryliertes und damit aktiviertes ERK1 und -2. Wie Abbildung 18 (Seite 68) zeigt, persistiert die Phosphorylierung der ERK über den Versuchszeitraum von 96 Stunden. Die Phosphorylierung ist unabhängig von Wachstumsfaktoren. Endogenes MEK ist unter der ausbleibenden Stimulation durch Wachstumsfaktoren nicht in der Lage ERK zu aktivieren,

wie die Vektorkontrolle zeigt. Die Expressionslevel sind gleichmäßig, wie der Immunoblot nach ERK beweist. Das prolongierte Überleben der 32D pB-LIDEMANE und 32D pB- $\Delta$ Stu-LIDEMANE Zellen nach Entzug der Wachstumsfaktoren geht mit einer persistierenden Phosphorylierung und damit Aktivierung der ERK einher. Diese Befunde schlagen vor, dass die kontinuierliche Aktivierung von ERK für die protektive Wirkung der konstitutiv aktiven MEK Mutanten verantwortlich ist und das Einsetzen der Apoptose verzögert. Konstitutiv aktives ERK müsste demnach in ähnlicher Weise die Apoptose unterdrücken.

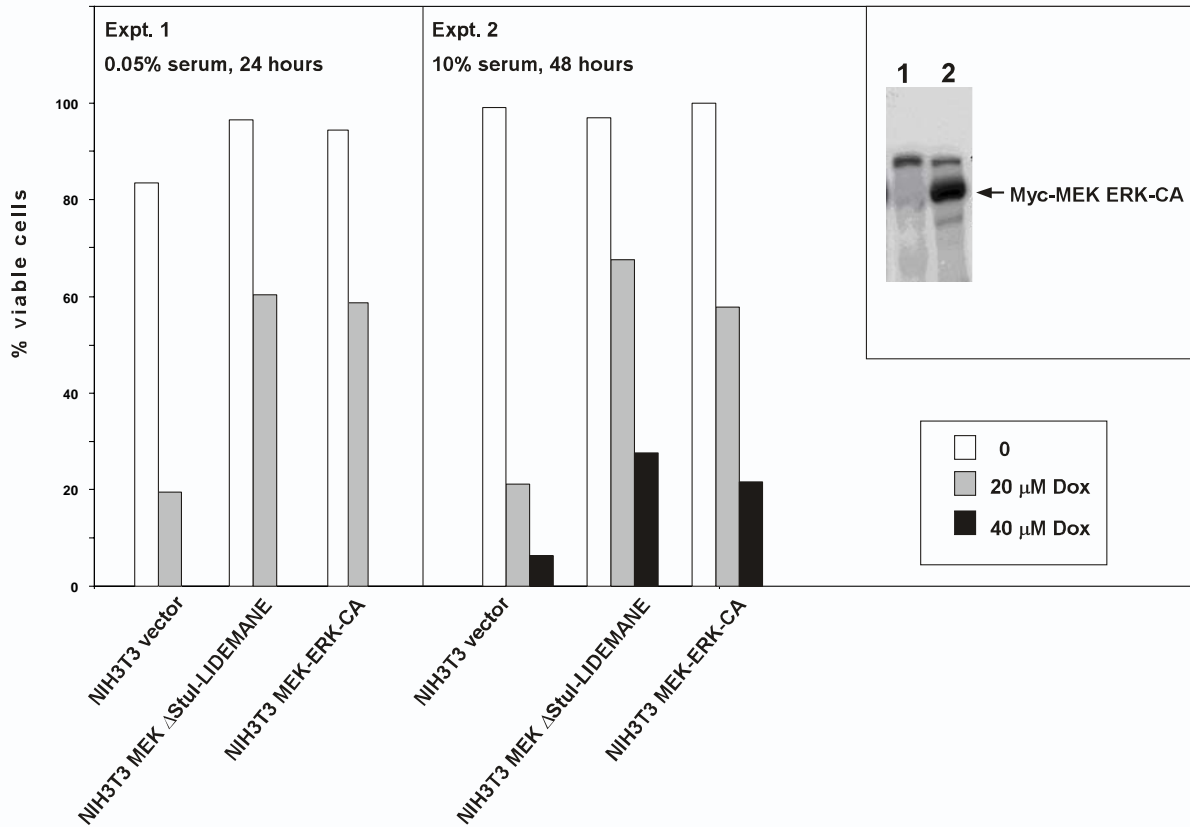


**Abbildung 18: Prolongierte Aktivität von ERK1 und -2 in gehungerten, aktiviertes MEK exprimierenden 32D Zellen**

Leeren Vektor (pB) und konstitutiv aktives MEK (MEK LIDEMANE und MEK  $\Delta$ Stu-LIDEMANE) exprimierende 32D Zellen wurden in Abwesenheit von WEHI inkubiert. Western Blot Analyse nach pERK 1,2 zur Bestimmung des Aktivierungszustandes von ERK-1 und -2 zu den angegebenen Zeitpunkten.

### **3.4 Expression von aktiviertem ERK führt zur Suppression der Apoptose**

Das Hybrid Myc-MEK-ERK-CA ist eine konstitutiv aktive ERK2 Mutante (Robinson, Stippec et al. 1998). Mit dem Topoisomerase II Inhibitor Doxorubicin lässt sich in Fibroblasten der Zelllinie NIH 3T3 Apoptose induzieren. NIH 3T3 Zellen, die entweder konstitutiv aktives MEK- $\Delta$ Stu-LIDEMANE oder MEK-ERK-CA exprimieren, wurden mit verschiedenen Konzentrationen Doxorubicin inkubiert. Die Zellen wuchsen wahlweise unter voller Serumstimulation oder wurden zusätzlich „gehungert“. Nach 24 Stunden wird die Viabilität der verschiedenen Zellpopulationen mittels Trypanblau bestimmt.



**Abbildung 19: Expression von aktiviertem ERK inhibiert Doxorubicin induzierte Apoptose von NIH 3T3 Zellen**

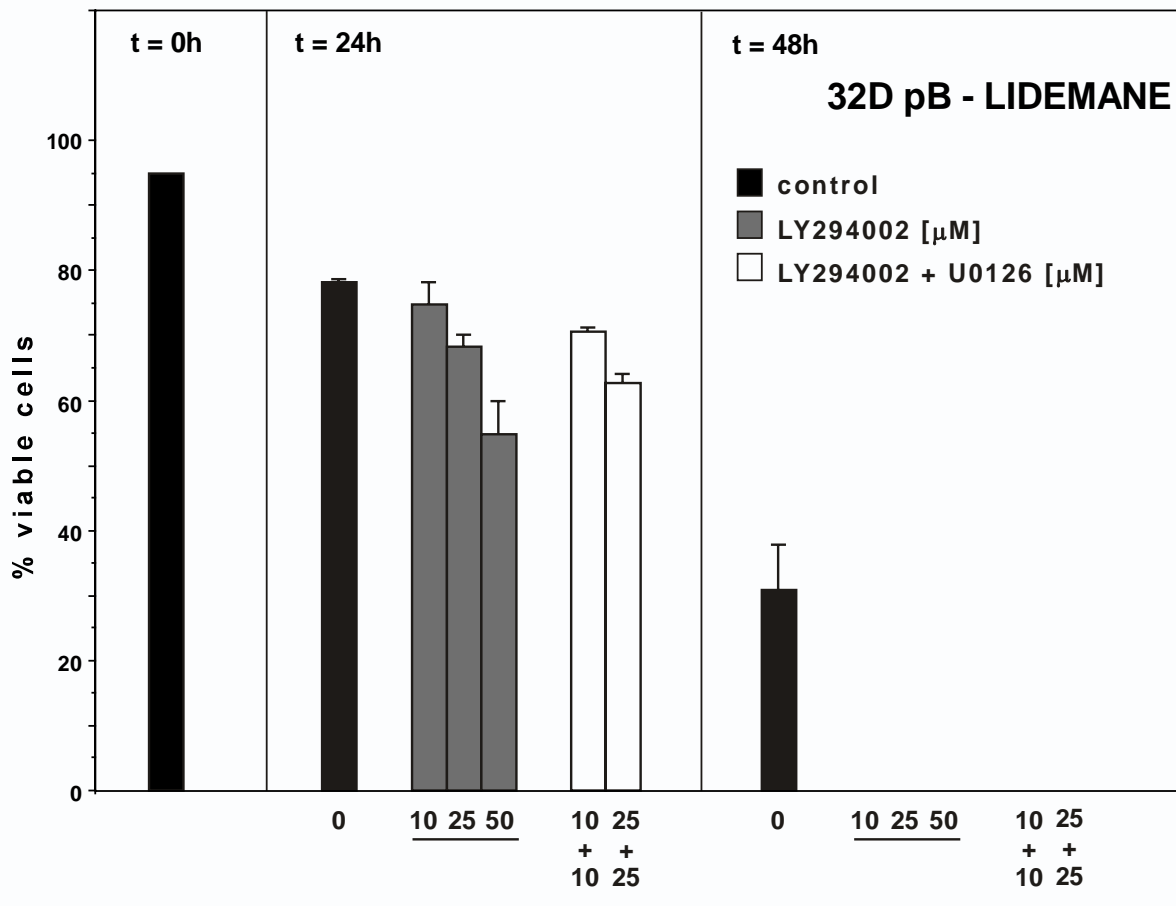
Konfluierende Monolayer von NIH 3T3 Zellen, die entweder den leeren Vektor, konstitutiv aktives MEK  $\Delta$ Stu-LIDEMANE oder myc-getaggt konstitutiv aktives ERK2 (MEK-ERK-CA) exprimieren wurden mit Apoptose induzierendem Doxorubicin für 24 Stunden (in 0,05% Serum) oder 48 Stunden (in 10% Serum) behandelt. Prozent lebender Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten. Western Blot Analyse des myc-getaggten MEK-ERK Fusionsproteins mit Myc Antikörpern (oben rechts). 1, NIH 3T3 Zellen mit Leervektor transfiziert; 2, NIH 3T3 Zellen transfiziert mit myc-getaggt MEK-ERK-CA.

Doxorubicin induziert sehr potent Apoptose in NIH 3T3 Zellen. Der Entzug des Serums vermag dies hingegen nur unzureichend, wie aus den Viabilitäten der Zellen der Vektorkontrolle abzuleiten ist. Sowohl die Expression von konstitutiv aktivem MEK als auch ERK schützt die Zellen in ähnlicher Weise vor dem apoptotischen Zelltod. Die Beobachtung, dass aktiviertes ERK in der Lage ist die Apoptose zu supprimieren, macht es wahrscheinlich, dass die anti-apoptotische Wirkung von MEK über ERK vermittelt wird (Abbildung 19, Seite 69).

### **3.5 Inhibitoren der PI3K Aktivierung beeinflussen die anti-apoptotische Wirkung von MEK1 negativ**

Die Aktivierung von AKT durch PI3-Kinase nach Wachstumsfaktorstimulation ist in einer Vielzahl von Zellen ein potentes anti-apoptotisches Signal, das die Zellen vor den

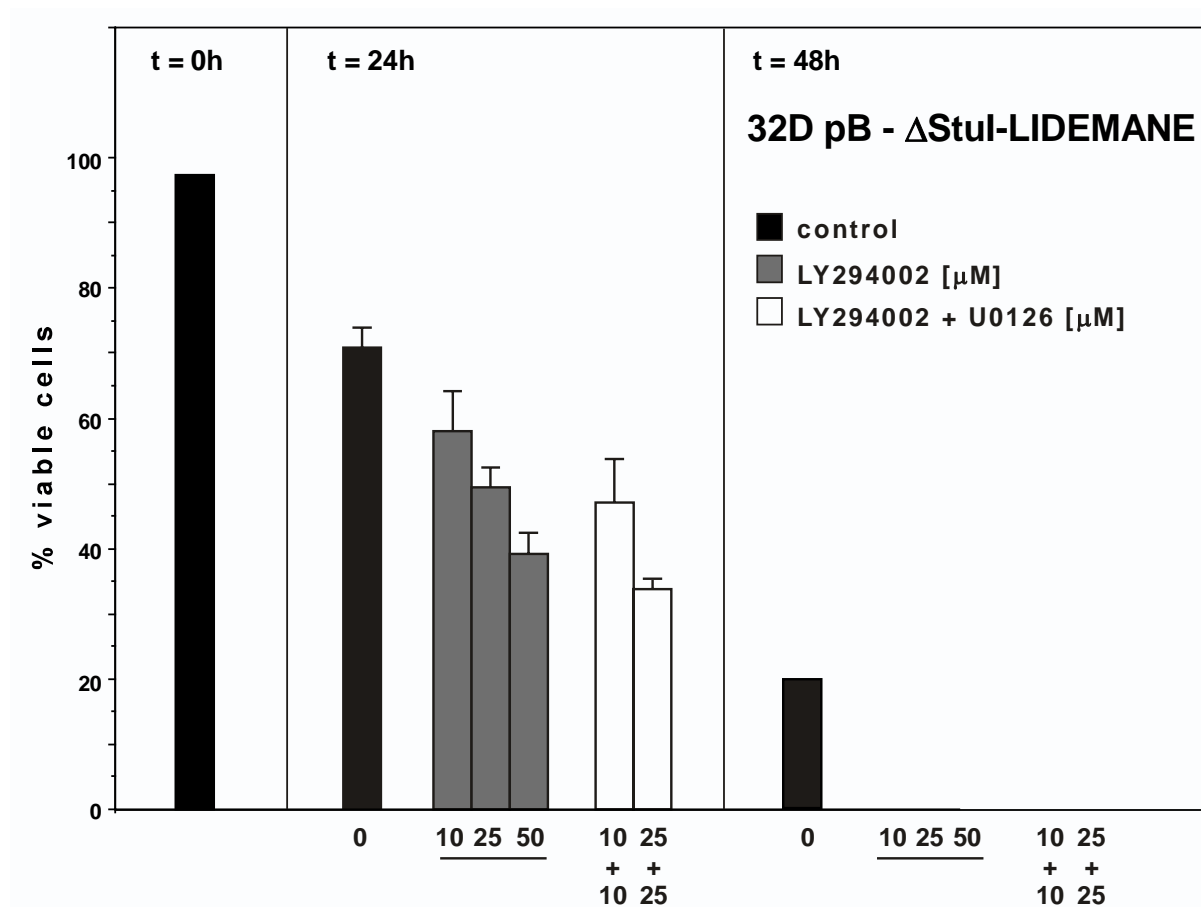
verschiedensten apoptotischen Stimuli zu schützen vermag (Datta, Brunet et al. 1999). Wie bereits zuvor erläutert, ist die anti-apoptotische Potenz von AKT einer weiten Bandbreite von Mechanismen zuzuschreiben. Sowohl die Alteration der Transkription durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren oder anderen Regulatoren, als auch die direkte Inaktivierung von pro-apoptotischen Akteuren spielt dabei eine Rolle (Brunet, Bonni et al. 1999; Datta, Brunet et al. 1999; Romashkova and Makarov 1999). Die Aktivierung der PI3-Kinase nach IL-3 Bindung am Rezeptor löst eine AKT vermittelte Phosphorylierung von BAD aus (Datta, Dudek et al. 1997; del Peso, Gonzalez-Garcia et al. 1997; Songyang, Baltimore et al. 1997). BAD, ein pro-apoptotisches Bcl-2 Homolog, bindet nach Phosphorylierung an das zytosolische Protein 14-3-3 und verliert durch Translokation in das Zytoplasma seine pro-apoptotischen Fähigkeiten, da die zur Apoptose führende Bindung an Bcl-2 verhindert wird.



**Abbildung 20: Suppression der Apoptose durch MEK LIDEMANE wird durch einen Inhibitor von PI3K gehemmt**

Konstitutiv aktives MEK LIDEMANE exprimierende 32D Zellen wurden in Abwesenheit von WEHI mit dem Inhibitor für PI3K (LY294002) oder simultan mit den Inhibitoren für PI3K (LY294002) und MEK (U0126) in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Prozent lebender Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten; Mittelwert mit Standardabweichung.

Die PI3K/AKT Kaskade ist als ein Ras Effektor Signalweg beschrieben, der parallel zu Raf/MEK/ERK verläuft. Wie bereits der Einsatz von LY294002, einem Inhibitor von PI3K, in parentalen 32D Zellen gezeigt hat, sind PI3K abhängige Signalwege zur Suppression der Apoptose in der Lage. Die Vorstellung ist allerdings die, dass MEK und PI3K isoliert und nicht voneinander abhängig die Apoptose unterdrücken. Die Inkubation der konstitutiv aktiven MEK exprimierenden 32D Zellen mit LY294002 würde also keinen großen Einfluss auf die anti-apoptotische Aktivität von MEK erwarten lassen und als Kontrolle für die Eigenständigkeit des Signalweges dienen.



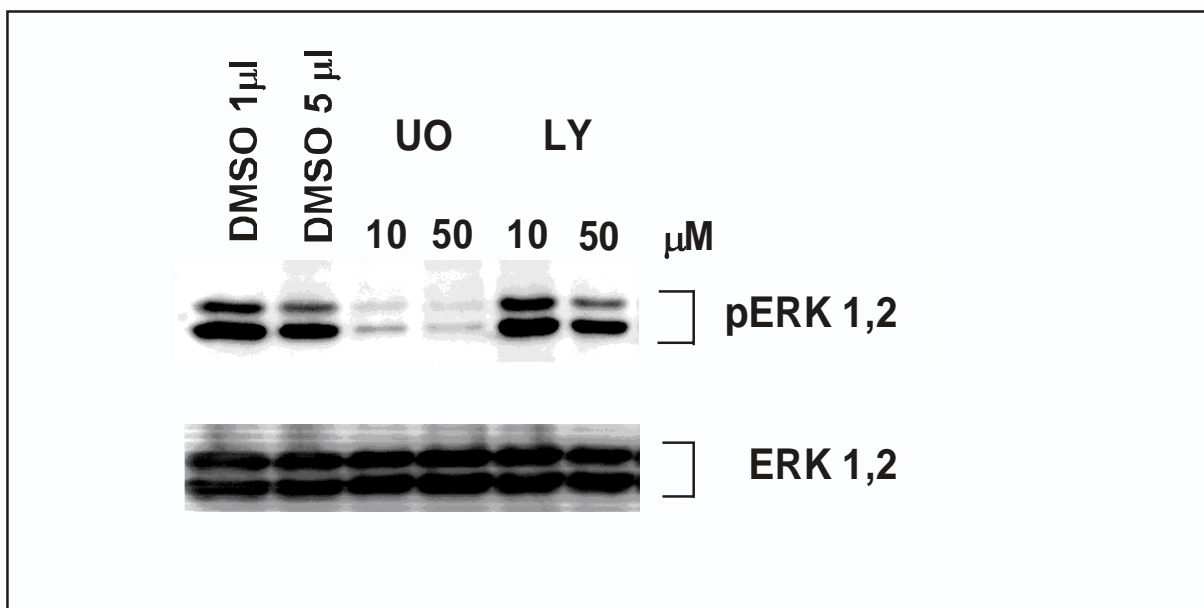
**Abbildung 21: Suppression der Apoptose durch MEK  $\Delta$ Stu-LIDEMANE wird durch einen Inhibitor von PI3K gehemmt**

Konstitutiv aktives MEK  $\Delta$ Stu-LIDEMANE exprimierende 32D Zellen wurden in Abwesenheit von WEHI mit dem Inhibitor für PI3K (LY294002) oder simultan mit den Inhibitoren für PI3K (LY294002) und MEK (U0126) in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Prozent lebender Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten; Mittelwert mit Standardabweichung.

32D Zellen, die entweder pB-LIDEMANE oder pB- $\Delta$ Stu-LIDEMANE exprimieren, wurden analog zum Experiment unter Kapitel 3.3 (Seite 65ff) in Abwesenheit von IL-3 ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen des PI3K Inhibitors LY294002 oder einer



Kombination von LY294002 und dem MEK Inhibitor U0126 inkubiert. Die Zahl der lebenden und toten Zellen wurde zu den angegebenen Zeiten bestimmt. Ähnlich wie der Inhibitor der MEK Aktivierung und Aktivität U0126 antagonisiert auch der Inhibitor von PI3K LY294002 den protektiven, anti-apoptotischen Effekt des konstitutiv aktiven MEK. 24 Stunden Inkubation mit LY294002 führen zu einer dosisabhängigen Reduktion der Viabilität sowohl in der pB-LIDEMANE als auch in der pB- $\Delta$ Stu-LIDEMANE Population. Nach 48 Stunden haben nur noch Zellen der Kontrollgruppe überlebt, die zwar ebenfalls ohne IL-3, aber lediglich mit dem Lösungsmittel (DMSO) der synthetischen Inhibitoren kultiviert wurden (Abbildung 20 und Abbildung 21, Seite 70 und 71).



**Abbildung 22: Inkubation mit dem Inhibitor von PI3K LY29004 beeinflusst nicht die Phosphorylation von ERK 1,2**

Konstitutiv aktives MEK LIDEMANE exprimierende 32D Zellen wurden in Abwesenheit von WEHI mit dem Inhibitor für PI3K (LY29004) über 24 Stunden inkubiert. Western Blot Analyse nach pERK 1,2 zur Bestimmung des Aktivierungszustandes von ERK-1 und -2.

Um auszuschließen, dass der antagonistische Effekt des LY294002 auf einer unspezifischen Hemmung von MEK beruht, wurde die Aktivierung des MEK Substrates ERK beurteilt. 32D pB-LIDEMANE Zellen wurden erneut ohne IL-3 in Kultur genommen und mit den beiden Inhibitoren U0126 und LY294002 für 24 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und lysiert, das Lysat im Gel aufgetrennt und geblottet. Im Western-Blot kam der bereits bekannte phosphospezifische ERK Antikörper zum Einsatz. Wie Abbildung 22 (Seite 72) zeigt, hemmt U0126 die MEK spezifische Phosphorylierung von ERK. LY294002 hingegen hat, wie das Lösungsmittel DMSO, keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der

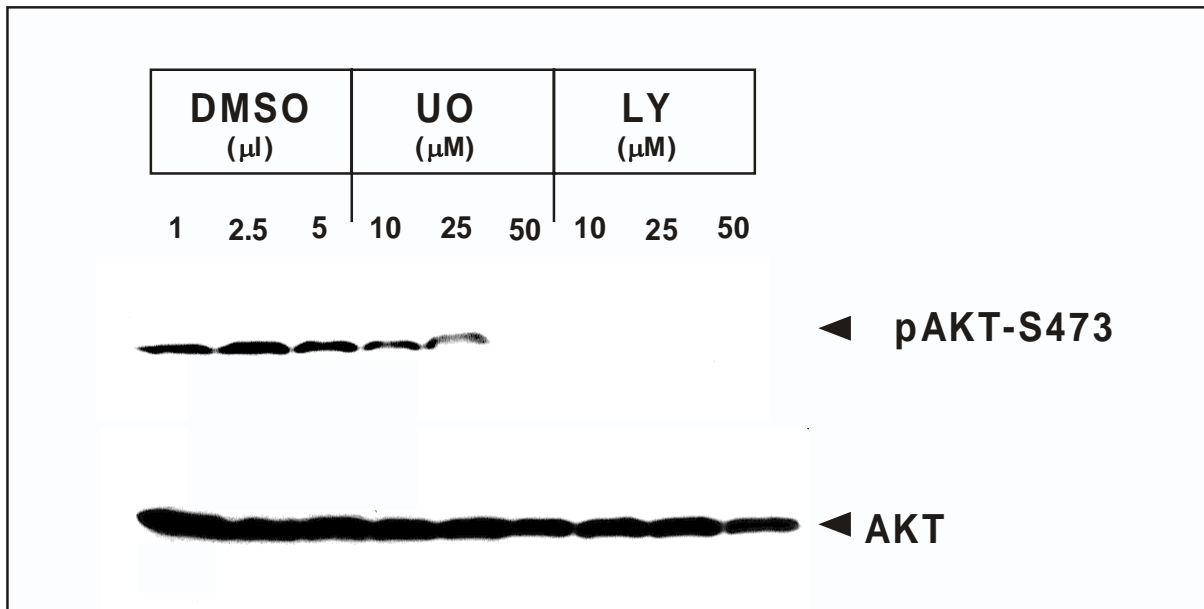
ERK. Die gleichmäßige Expression von ERK wird durch den Immunoblot bestätigt. Eine unspezifische Blockierung der MEK durch LY294002 konnte somit ausgeschlossen werden. Die negative Beeinflussung der anti-apoptotischen Kapazität von MEK beruht demnach wahrscheinlich auf der spezifischen Inhibition der PI3-Kinase. Dieser Antagonismus deutet, entgegen der bisherigen Vorstellung von zwei parallel verlaufenden Signalwegen, auf eine Vernetzung und Einbeziehung PI3-Kinase in den MEK abhängigen anti-apoptotischen Signalweg hin.

### **3.6 Expression von aktiviertem MEK führt zur Aktivierung von PI3K und AKT**

Eine Aktivität der PI3-Kinase in den sowohl Serum, als auch IL-3- „gehungerten“ Zellen und damit eine Auswirkung des Inhibitors LY294002 war nicht unbedingt zu erwarten. Um zu bestätigen, dass PI3K in den aktive MEK exprimierenden Zellen dennoch aktiv ist, wurde der Phosphorylierungszustand der Effektor kinase AKT überprüft. Aktive PI3K generiert PInsP<sub>3</sub>, die AKT über die PH Domäne binden und diese an die Membran annähern. An der Membran erfolgt die Aktivierung von AKT durch Phosphorylierung von Serin 308 und 473 (AKT1) durch membranständige Kinasen (Hemmings 1997). Der Nachweis der Phosphorylierung von Serin 473 durch phosphospezifische Antikörper lässt also indirekt auf die Aktivität von PI3K schließen. 32D pB-LIDEMANE Zellen wurden unter Entzug von Wachstumsfaktoren entweder mit verschiedenen Konzentrationen des MEK Inhibitor U0126 oder des PI3K Inhibitor LY294002 für 24 Stunden inkubiert. Die Kontrollgruppe wurde mit dem Lösungsmittel der Inhibitoren, DMSO, versetzt. Die Analyse der Zellysate im Western-Blot offenbart die Phosphorylierung von AKT an Serin 473 in der Kontrollgruppe. Unter Einwirkung von LY294002 kommt es zu keiner Phosphorylierung, während sie von U0126 dosisabhängig unterbunden wird. Ausreichende Expressionslevel von AKT wurden im Western-Blot mit einem AKT spezifischen Antikörper sichergestellt (Abbildung 23, Seite 74).

Der Versuch lässt auf die Aktivität von PI3K in den MEK transformierten Zellen schließen. Dass die Aktivität von PI3K mit der Aktivität von MEK in Zusammenhang steht, wird durch die ausgebliebene Phosphorylierung von AKT unter Einwirkung des MEK spezifischen Inhibitors U0126 deutlich. Die Beobachtung, dass erst hohe Dosen des Inhibitors eine Phosphorylierung vollständig zu unterbinden vermögen, deckt sich wiederum mit dem Befund, der Notwendigkeit hohe Konzentrationen zur Unterdrückung der anti-apoptotische Wirkung der MEK. Um die Aktivität von PI3K direkt zu bestimmen, wurden parentale 32D Zellen in An- und Abwesenheit von IL-3, als auch 32D pB-LIDEMANE und pB-ΔStu-LIDEMANE in Abwesenheit von IL-3 kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen

geerntet, lysiert und über einen an die regulatorische Untereinheit (p85) der PI3K bindenden Antikörper präzipitiert. Es ist bekannt, dass in diesen Ansätzen die katalytische p110 Untereinheit der PI3K mitpräzipitiert wird. Gefolgt von einem Kinase-Assay mit einem Lipidsubstrat lässt sich die Aktivität von PI3K über radioaktiv markiertes PInsP<sub>3</sub> bestimmen.

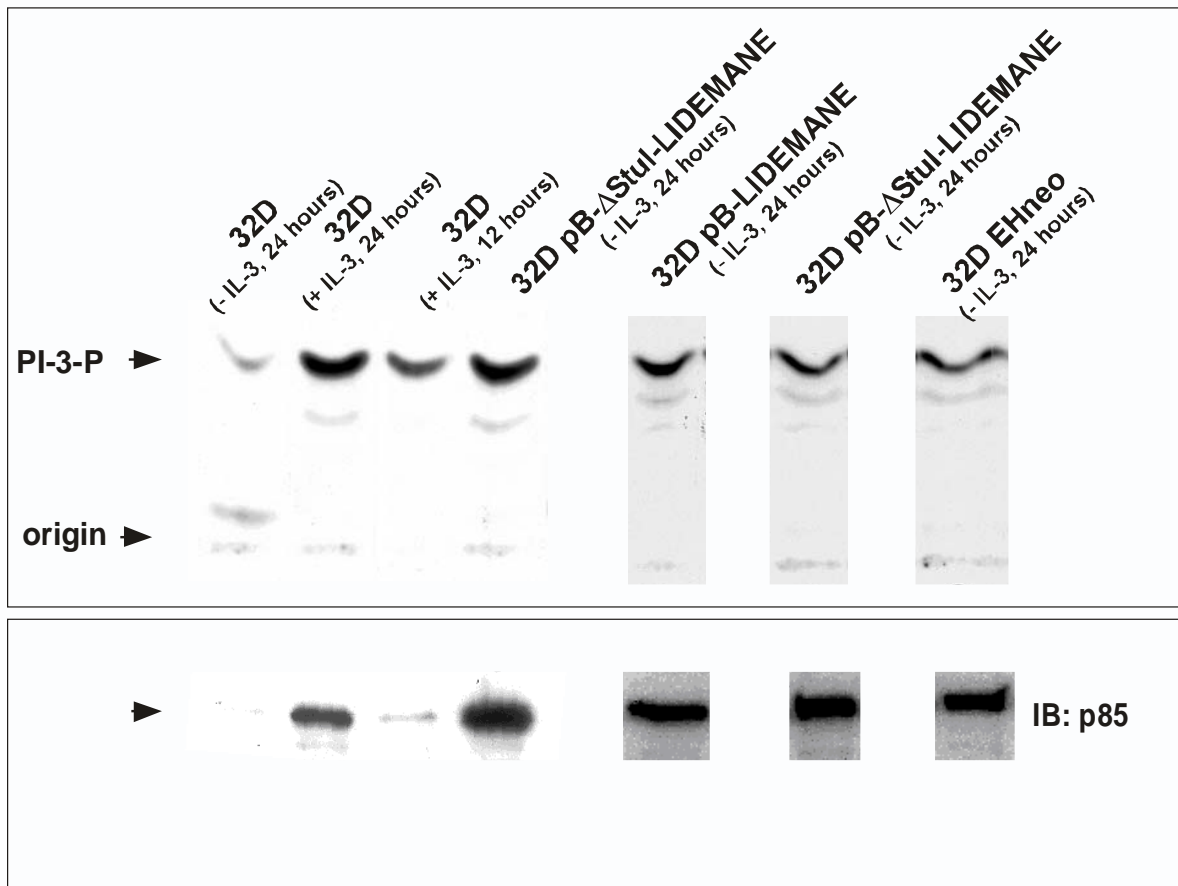


**Abbildung 23: Expression von aktiviertem MEK führt zur Phosphorylierung von AKT**

Konstitutiv aktives MEK LIDEMANE exprimierende 32D Zellen wurden in Abwesenheit von WEHI mit unterschiedlichen Konzentrationen der Inhibitoren für MEK (U0126) und PI3K (LY294002) über 24 Stunden inkubiert. Western Blot Analyse nach pAKT (S473) als indirektem Marker für die Aktivität von PI3K.

Stimulierte parentale 32D Zellen (Abbildung 24, Bande 2 und 3; Seite 75) zeigen eine deutliche Aktivität der PI3-Kinase, während diese nach 24 Stunden Entzug der Wachstumsfaktoren nur noch marginal vorhanden ist. Die konstitutiv aktives MEK exprimierenden 32D Zellen weisen selbst nach 24 Stunden IL-3 Entzug eine noch deutliche Aktivität von PI3K auf. Die erfolgreiche Präzipitation wurde durch einen Immunoblot mit p85 Antikörpern validiert. In der Kontrollgruppe der IL-3 gehungerten parentalen 32D Zellen ist, aufgrund des vorangeschrittenen apoptotischen Zelltodes und der konsekutiven Degradation der Proteine, nach 24 Stunden so gut wie keine PI3-Kinase mehr zu präzipitieren.

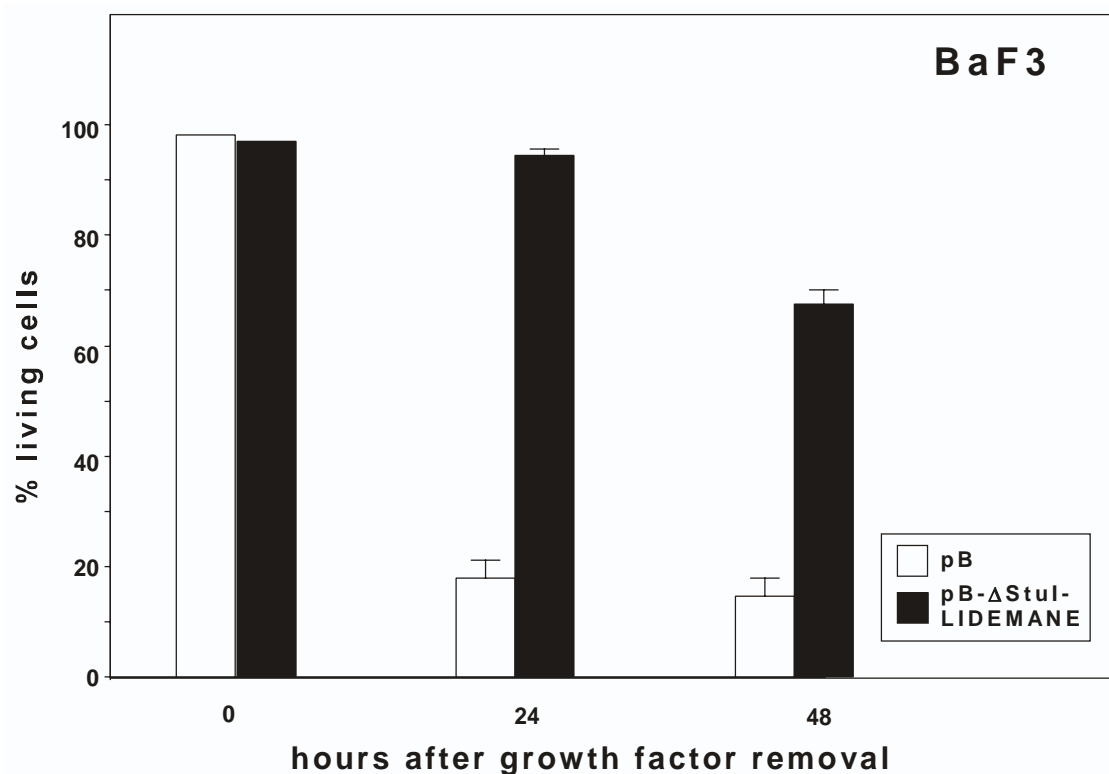
Zusammenfassend deuten diese Befunde auf eine Raf/MEK abhängige Aktivierung von PI3K hin. Darüber hinaus ist die Aktivierung von PI3K für die anti-apoptotische Wirkung von MEK bedeutend, wie der Einsatz des LY294002 Inhibitors gezeigt zeigt.



**Abbildung 24: PI3K ist in MEK und Raf transformierten 32D Zellen aktiviert**

Parentale (32D) Zellen wurden in Ab- ( $-$  IL-3) und Anwesenheit (+ IL-3) von WEHI inkubiert. Konstitutiv aktives MEK (MEK LIDEMANE und MEK  $\Delta$ Stu-LIDEMANE) oder die aktive virale C-Raf Isoform gag-v-Raf (EHneo) exprimierende 32D Zellen wurden in Abwesenheit von WEHI inkubiert. Immunopräzipitation von PI3K (mit einem Antikörper gegen die p85 Untereinheit) nach Zelllyse und Durchführung eines Kinase-Assay mit einem Lipisubstrat. Kontrolle der erfolgreichen Präzipitation im Western Blot nach p85 (IB). Kinaseaktivität als Radiographie (PI3-P).

Die anti-apoptotische Aktivität konnte in der Myeloblasten ähnlichen haematopoetischen Zelllinie 32D aber auch in der Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 gezeigt werden. Um weiteren Aufschluss darüber zu gewinnen, ob es sich um einen eher ubiquitären Signalweg zur Unterdrückung der Apoptose handelt, wurde eine weitere Zelllinie in die Studie eingeschlossen. Die BaF3 Zelllinie ist eine pro-B- Zelllinie, die wie 32D Zellen für Wachstum und Überleben auf die Stimulation durch IL-3 angewiesen ist. Durch retrovirale Infektion wurden BaF3 Zellen generiert, die MEK- $\Delta$ Stu-LIDEMANE exprimieren. Auch diese Zellen wurden einem Survival-Assay unterzogen, also gewaschen, ohne IL-3 ausgesät und zu den angegebenen Zeitpunkten die Viabilität bestimmt. Der Entzug der Wachstumsfaktoren führt in der Kontrollgruppe innerhalb von 24 Stunden zu einem dramatischen Verlust viabler Zellen. Die Expression des transgenen pB- $\Delta$ Stu-LIDEMANE verzögert signifikant den apoptotischen Tod der Zellen (Abbildung 25, Seite 76).

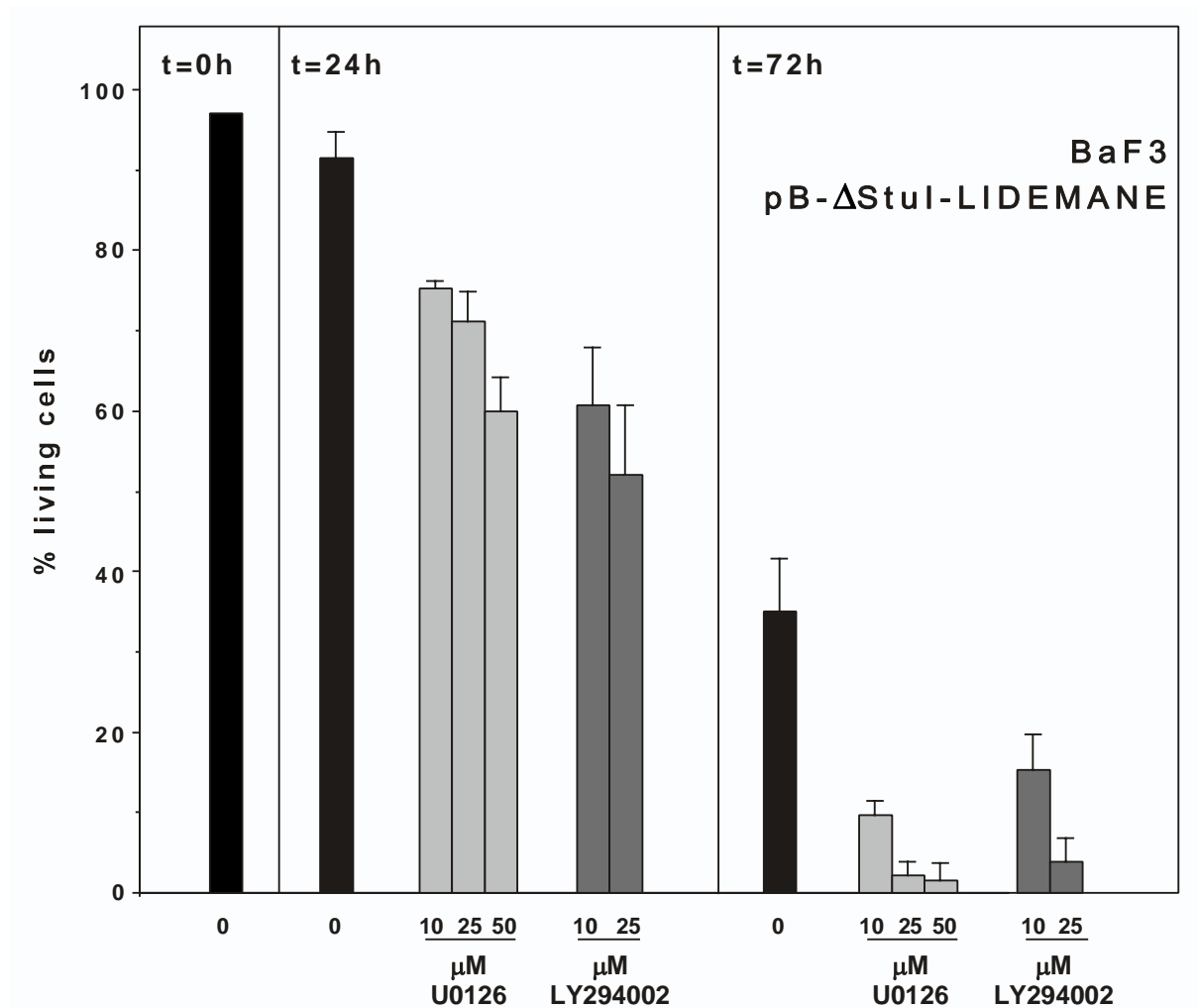


**Abbildung 25: Expression von aktiviertem MEK verzögert Apoptose von BaF3 Zellen**

Leeren Vektor (pB) und konstitutiv aktives MEK (MEK  $\Delta$ Stu-LIDEMANE) exprimierende BaF3 Zellen wurden in Abwesenheit von WEHI inkubiert. Prozent lebender Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten; Mittelwert mit Standardabweichung.

BaF3 Zellen, die MEK- $\Delta$ Stu-LIDEMANE exprimieren, wurden analog zu den vorherigen Versuchen gewaschen, gehungert und mit verschiedenen Konzentrationen der bekannten Inhibitoren U0126 und LY294002 inkubiert. Die mit den Inhibitoren von MEK und PI3K behandelten BaF3 Zellen zeigen eine dosisabhängige, signifikante Reduktion der Viabilität, die Inhibitoren antagonisieren also den protektiven Effekt von MEK (Abbildung 26, Seite 77).

Wie schon die Versuche mit 32D Zellen, so deuten auch diese Experimente auf eine anti-apoptotische Aktivität MEKs hin, die von einem intakten Signalweg, der auch PI3K umfasst, abhängig ist. Die analogen Befunde in den haematopoetischen Zelllinien 32D und BaF3, aber auch in Fibroblasten der Zelllinie NIH 3T3, sprechen für einen eher allgemeingültigen, ubiquitären Signalweg, der hier zum ersten Mal beschrieben wird.



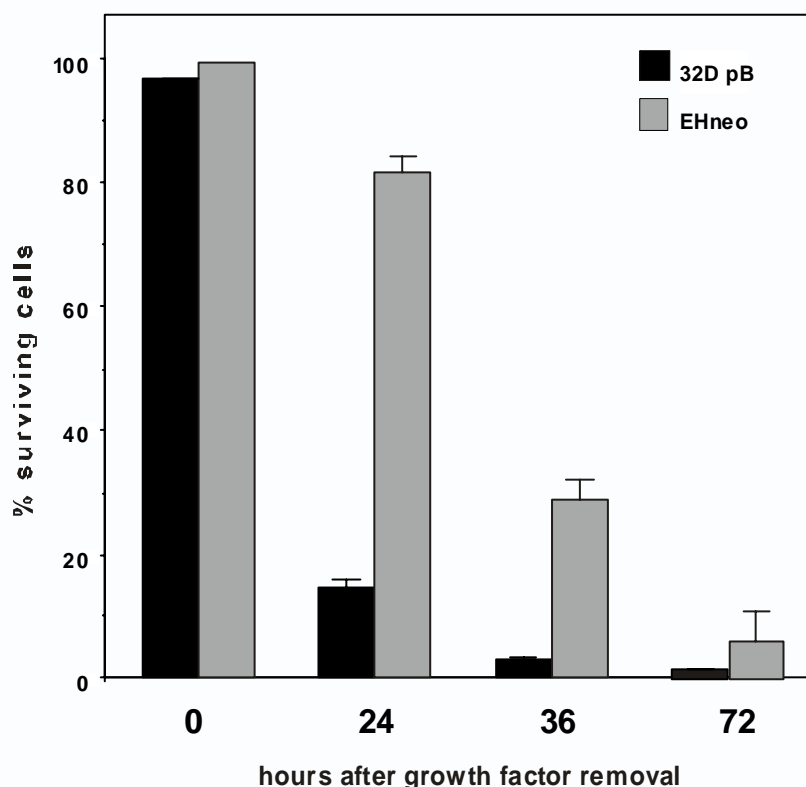
**Abbildung 26: Suppression der Apoptose von BaF3 Zellen durch aktiviertes MEK erfolgt durch einen von MEK und PI3K abhängigen Mechanismus**

Konstitutiv aktives MEK  $\Delta$ Stu-LIDEMANE exprimierende BaF3 Zellen wurden in Abwesenheit von WEHI mit unterschiedlichen Konzentrationen der Inhibitoren für MEK (U0126) und PI3K (LY294002) inkubiert. Prozent lebender Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten; Mittelwert mit Standardabweichung.

### **3.7 C-Raf besitzt anti-apoptotische Potenz, die MEK und AKT abhängig vermittelt ist**

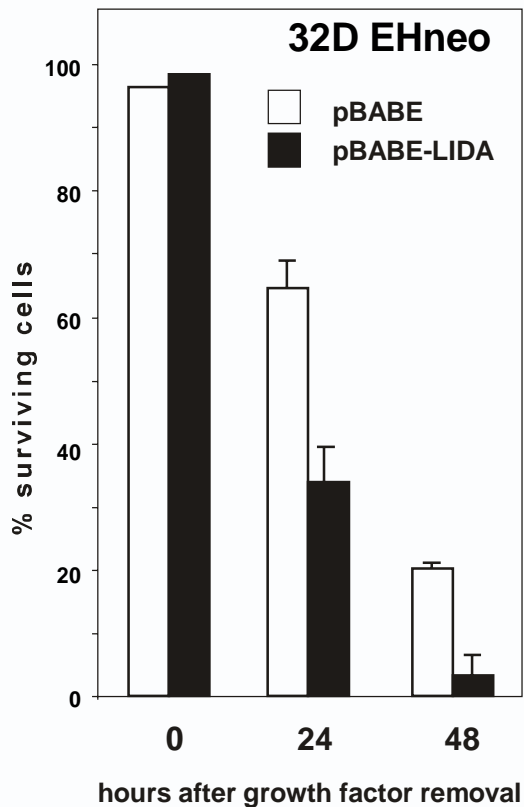
Für MEK und ERK konnte eine anti-apoptotische Aktivität gezeigt werden. MEK vermittelt seine anti-apoptotischen Eigenschaften wahrscheinlich über ERK und benötigt die Aktivität von PI3K in diesem Prozess. Es scheint naheliegend, dass auch Raf, trotz der in der Vergangenheit beschriebenen Raf- Überlebenswege, seine anti-apoptotische Wirkung zumindest teilweise auch über die Aktivierung von MEK und ERK vermittelt und die Aktivierung von PI3K/AKT benötigt. Es wurden 32D Zellen etabliert, die die aktive virale C-Raf Isoform gag-v-Raf im retroviralen Expressionskonstrukt EHneo exprimieren. Die aktives

C-Raf exprimierenden 32D Zellen, sowie Zellen der Vektorkontrolle wurden intensiv gewaschen und ohne Zusatz von IL-3 erneut ausgesät. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Viabilität der Zellen bestimmt. Wie Abbildung 27 (Seite 78) zeigt, verzögert die Expression von C-Raf signifikant den apoptotischen Tod der Zelle in Reaktion auf den Entzug der Wachstumsfaktoren. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Befunden (Cleveland, Troppmair et al. 1994). Um die Frage zu klären, ob der anti-apoptotische Signalweg, ausgehend von C-Raf, MEK einschließt, wurde in den EHneo gag-v-Raf tragenden 32D Zellen die dominant negative Mutante MEK LIDA co-exprimiert. Die gag-v-Raf und den leeren Vektor pB tragenden, sowie die sowohl gag-v-Raf als auch MEK LIDA exprimierenden 32D Zellen wurden intensiv gewaschen und in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren erneut in Kultur genommen. 32D Zellen der nicht MEK LIDA exprimierenden EHneo Population zeigen die bekannte Verzögerung im apoptotischen Zelltod. Dieser anti-apoptotische Effekt wird durch Einbringung des dominant negativen MEK LIDA Konstruktes antagonisiert (Abbildung 28, Seite 79).



**Abbildung 27: Expression von aktiviertem C-Raf verzögert Apoptose von 32D Zellen**

Leeren Vektor (32D pB) und das aktive virale C-Raf Protein, gag-v-Raf (EHneo), exprimierende 32D Zellen wurden in Abwesenheit von WEHI inkubiert. Prozent lebender Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten; Mittelwert mit Standardabweichung.



**Abbildung 28: Suppression der Apoptose durch aktiviertes C-Raf wird durch Expression einer dominant negativen MEK Mutante (MEK LIDA) gehemmt**

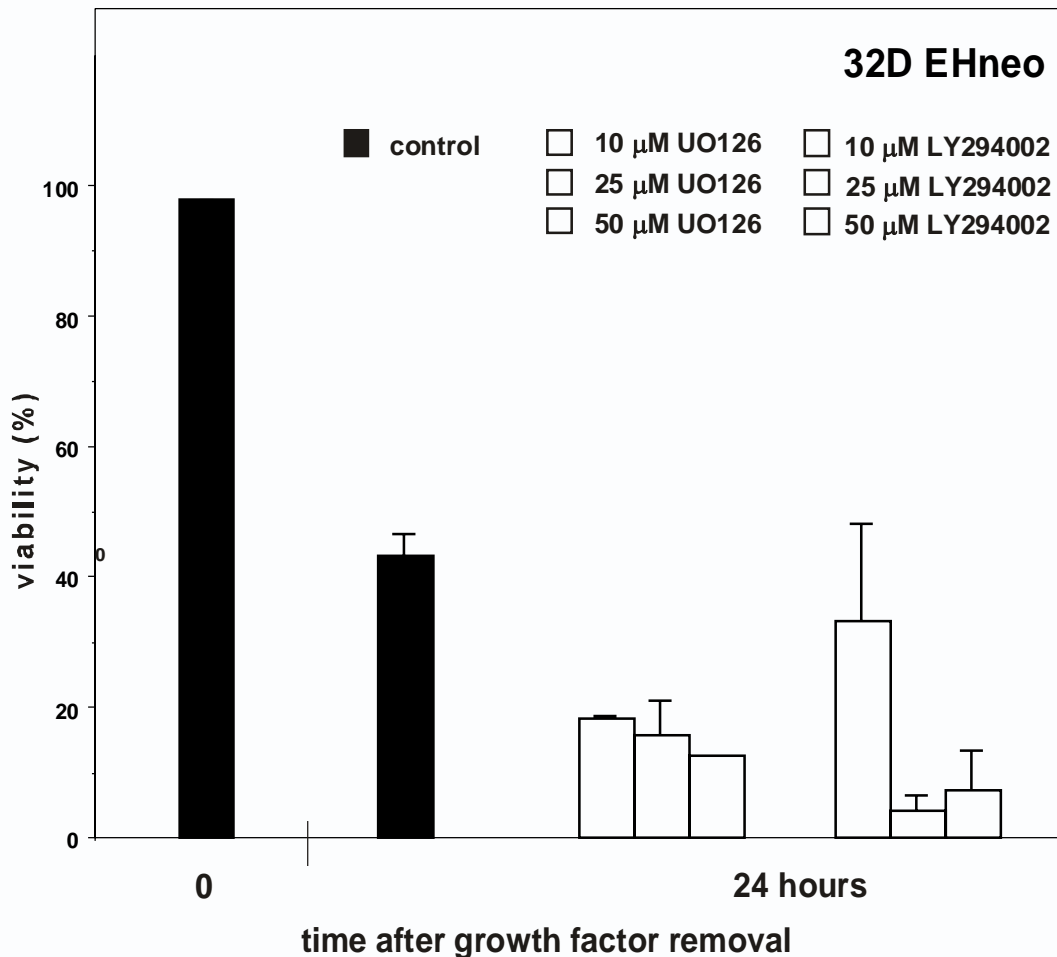
Aktives virales C-Raf Protein, gag-v-Raf (EHneo), sowie leeren Vektor (pBABE) oder die dominant negative MEK Mutante (pBABE LIDA) co-exprimierende 32D Zellen wurden in Abwesenheit von WEHI inkubiert. Prozent lebender Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten; Mittelwert mit Standardabweichung.

Der anti-apoptotische Signalweg von C-Raf ist demnach abhängig von MEK, was sich auch durch den Einsatz des MEK Inhibitors U0126 demonstrieren lässt. In Analogie zu aktivem MEK wurde auch der Inhibitor von PI3K eingesetzt. Erneut wurden EHneo gag-v-Raf 32D Zellen gewaschen, ohne Wachstumsfaktoren ausgesät und entweder mit DMSO oder aufsteigenden Konzentrationen von U0126 oder LY294002 inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Viabilität mit bekannter Methode bestimmt. Wie zuvor die dominant negative MEK Mutante, antagonisiert auch der MEK Inhibitor U0126 die anti-apoptotischen Wirkung von C-Raf, abzulesen in der niedrigeren Viabilität der behandelten Zellen. Der Inhibitor der PI3K LY294002 zeigt seinerseits eine signifikant niedrigere Viabilität der ihm ausgesetzten Zellen, zumindest unter mittlerer und hoher Konzentration (Abbildung 29, Seite 80).

Die anti-apoptotische Wirkung von C-Raf ist also nicht nur von MEK sondern auch von der Aktivität der PI3-Kinase abhängig. Wie bereits in aktivierte MEK exprimierenden Zellen so wurde auch in den EHneo gag-v-Raf 32D Zellen die Aktivität von PI3K in einem



Lipidkinase-Assay bestimmt. Die synoptische Abbildung 24 (Seite 75) zeigt, dass PI3K in EHneo gag-v-Raf, ebenso wie in pB-LIDEMANE und pB- $\Delta$ Stu-LIDEMANE 32D Zellen, aktiviert und aktiv ist.

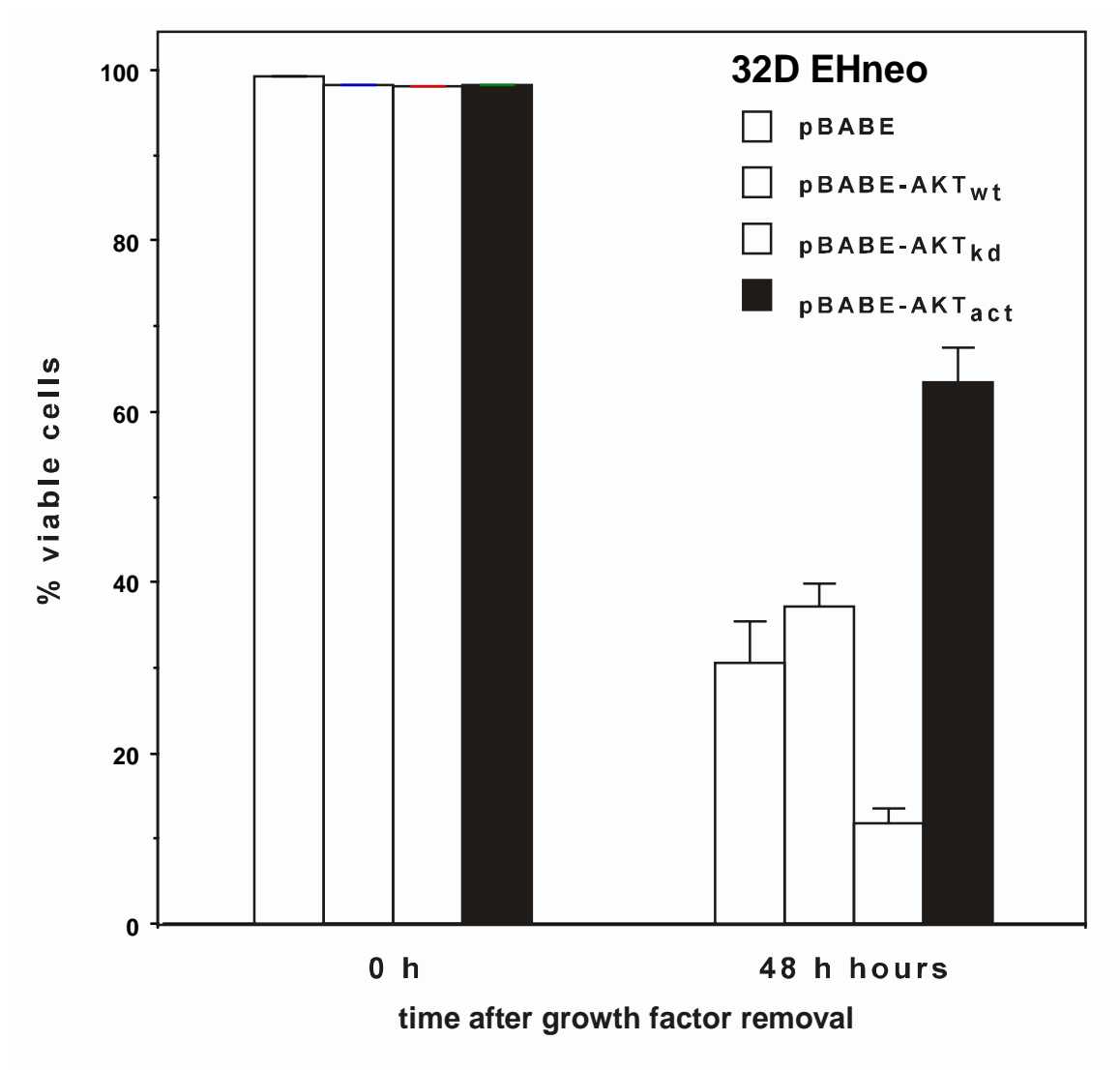


**Abbildung 29: Suppression der Apoptose durch aktiviertes C-Raf wird durch einen Inhibitor von MEK oder PI3K gehemmt**

Aktives virales C-Raf Protein, gag-v-Raf (EHneo), exprimierende 32D Zellen wurden in Abwesenheit von WEHI mit unterschiedlichen Konzentrationen der Inhibitoren für MEK (U0126) und PI3K (LY294002) inkubiert. Prozent lebender Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten; Mittelwert mit Standardabweichung.

AKT ist ein Effektor im PI3K Signalweg, der bekannt ist, verschiedenste anti-apoptotische Effekte zu vermitteln. Die Aktivierung von PI3K im anti-apoptotischen Signalweg von C-Raf und MEK spricht für eine Rekrutierung von AKT und konsekutiver Entfaltung seiner anti-apoptotische Potenz. Die Erforderlichkeit von AKT im anti-apoptotischen Signalweg von C-Raf/MEK soll im folgenden Experiment durch direkte Alteration der AKT Aktivierung untersucht werden. 32D Zellen, die onkogenes gag-v-raf exprimieren, wurden mit retroviralen Expressionskonstrukten für AKT Wildtyp (wt), AKT kinasetot (kd) oder AKT aktiv (act) infiziert. Die Zellen wurden gewaschen, ohne IL-3 erneut

ausgesät und nach 48 Stunden die Viabilität bestimmt. 32D EHneo gag-v-Raf Zellen, die mit dem leeren Vektor infiziert wurden, zeigen die für diese Zellen bekannte Verzögerung im apoptotischen Zelltod. Durch Überexpression von Wildtyp, aber noch deutlicher durch Co-Expression von aktivem AKT, wird die Apoptose noch weiter hinausgezögert. Die Co-Expression der inhibitorischen kinasetoten Mutante antagonisiert die C-Raf Wirkung und führt zu einer signifikanten Akzeleration der Apoptose (Abbildung 30, Seite 81).



**Abbildung 30: AKT ist notwendig zur Suppression der Apoptose durch aktiviertes C-Raf**

Aktives virales C-Raf Protein, gag-v-Raf (EHneo), sowie leeren Vektor (pBABE) oder Konstrukte von AKT Wildtyp (wt), AKT kinasetot (kd) oder AKT aktiv (act) co-exprimierende 32D Zellen wurden in Abwesenheit von WEHI inkubiert. Prozent lebender Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten; Mittelwert mit Standardabweichung.

Die Ergebnisse sprechen für eine Verwicklung des PI3K und AKT Signalweges in der Vermittlung des anti-apoptotischen Signals ausgehend von C-Raf und MEK.

## 4 Diskussion

Schon früh konnte gezeigt werden, dass Raf in seiner onkogenen Form neben Wachstum auch Überleben durch Suppression der Apoptose induziert (Rapp, Cleveland et al. 1985). Das onkogene gag-v-Raf Protein verzögert das Einsetzen der Apoptose, in der auch in dieser Studie verwendeten promyeloide Zelllinie 32D nach Wachstumsfaktorentzug (Cleveland, Troppmair et al. 1994). Weitere Studien offenbarten eine Kooperation von Raf und Bcl-2 in diesem Prozess (Wang, Miyashita et al. 1994). Außerdem lässt sich C-Raf im Komplex mit Bcl-2 nachweisen. Der Komplex spiegelt jedoch keine Enzym-Substrat Beziehung wider, sondern wird als eine durch Bcl-2 vermittelte Translokation von Raf an das Mitochondrium verstanden. Mitochondrial transloziertes Raf, was auch artifiziell durch Fusion von C-Raf mit Anteilen des mitochondrialen Proteins p70Mas erreicht werden kann, phosphoryliert das pro-apoptische Bcl-2 Familienmitglied BAD, welches hierdurch inaktiviert wird (Wang, Miyashita et al. 1994; Wang, Rapp et al. 1996). Diese Ergebnisse deuteten auf einen neuen, am Mitochondrium funktionierenden Signalweg von Raf hin, der die anti-apoptische Wirkung unabhängig von der klassischen mitogenen Kaskade über MEK und ERK vermittelt. MEK und ERK sind als Raf-Effektoren im Signalweg der Proliferation, Differenzierung und Transformation beschrieben und essentiell (Cowley, Paterson et al. 1994; Troppmair, Bruder et al. 1994; Kerkhoff and Rapp 1997; Kerkhoff and Rapp 1998; Hartkamp, Troppmair et al. 1999). Ehrhardt et al. zeigten, dass B-Raf, nachfolgend der Freisetzung von Cytochrom *c*, die Apoptose über einen MEK- vermittelten Signalweg zu unterdrücken vermag (Erhardt, Schremser et al. 1999). Weitere Hinweise für eine Bedeutung der klassischen mitogenen Kaskade in der Regulation der Apoptose ergaben sich aus Untersuchungen an *Drosophila melanogaster*. Sowohl die Aktivität als auch die Expression von HID, welches neben GRIM und REAPER von zentraler Bedeutung für die Apoptose in *Drosophila* ist, unterliegen überwiegend der Kontrolle durch den Ras/MAPK Signalweg (Bergmann, Agapite et al. 1998; Bergmann, Agapite et al. 1998; Kurada and White 1998).

Diese indirekten Hinweise auf eine mögliche Rolle von MEK in der Regulation des Zellüberlebens veranlasste uns zum Studium der Verhältnisse in der promyeloide Zelllinie 32D und weiteren Zelllinien. Durch Entzug von IL-3 lässt sich in der haematopoetischen Zelllinie Apoptose induzieren. Die Zellen arretieren in der G1/G0 Phase des Zellzyklus und zeigen innerhalb von 24 Stunden die typischen morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen (Cleveland, Troppmair et al. 1994). Der Inhibitor U0126 verhindert die

Aktivierung von MEK1/2, ohne mit der Bindung von ATP oder dem Substrat zu konkurrieren. Hierdurch ist MEK einerseits für eine Aktivierung durch Raf „inert“, andererseits wird die Aktivierung von ERK durch die MAPK-Kinase unterbunden.

Mit Einsatz des Inhibitors in parentalen 32D Zellen, die unter optimalen Bedingungen wuchsen, konnte gezeigt werden, dass MEK- abhängige Signalwege für Proliferation und Überleben der Zellen benötigt werden. Eine pharmakologische Intervention in die Signalkette führte zu einer Stagnation der Proliferation und zum programmierten Zelltod. Den gleichen Effekt zeigt eine dominant negative Mutante von MEK. Die zur Unterbrechung der Signalkette führende Kompetition von MEK LIDA mit dem Wildtyp Allel akzeleriert den durch Wachstumsfaktorentzug initiierten Zelltod.

Neben MEK ist die Proliferation und das Überleben der 32D Zellen in der Gegenwart von IL-3 aber auch von einem intakten Signalfluss über PI3K abhängig. Durch Inhibition von PI3K mit dem niedermolekularen Hemmer LY294002 wird die Proliferation der Zellen und ihr Überleben stark beeinträchtigt. Die potente Wirkung einer Kombination beider Inhibitoren verdeutlicht den Synergismus der beiden Signalwege in der Regulation der vitalen Funktionen der Zelle. Es spiegelt die Verhältnisse am membranständigen Interleukinrezeptor wider, der als Ursprungsort verschiedener Signalwege zu sehen ist. Von ihm ausgehend ist eine Aktivierung sowohl des JAK/STAT als auch des Ras/Raf und Ras/PI3K Signalweges möglich und damit die Orchestrierung vielfältiger intrazellulärer Vorgänge (de Groot, Coffey et al. 1998).

Weitere Evidenz für die anti-apoptischen Eigenschaften von MEK erwächst aus der Expression verschiedener MEK Mutanten in der promyeloiden Zelllinie 32D. Die Expression der konstitutiv aktiven Mutanten MEK LIDEMANE und  $\Delta$ Stu LIDEMANE schützt die unstimulierten Zellen vor einem raschen und fulminanten Zelluntergang (Abbildung 14, Seite 63). Die Aktivität von MEK ist für die Entfaltung dieser Wirkung essentiell. So lässt sich durch Inhibition der Mutanten mit U0126 der Effekt aufheben und die Zelle für die Apoptose sensibilisieren (Abbildung 16, Seite 66 und Abbildung 17, Seite 67). Als Substrat von MEK ist ERK der potentielle Vermittler des sich auf aktiven MEK gründenden protektiven Effektes. Ein Indiz für die Rekrutierung von ERK im protektiven Signalweg von aktiviertem MEK ist die prolongierte Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK in den durch die Expression einer konstitutiv aktiven MEK Mutante geschützten Zellen (Abbildung 18, Seite 68). Die Phosphorylierung ist selbst noch nach 96 Stunden detektierbar und deckt sich mit dem Überleben der Zellen über diesen Zeitpunkt hinaus, während parentale Zellen, bzw. die Zellen der Vektorkontrolle, bereits untergegangen sind. Seine anti-apoptische Potenz stellt

ERK in NIH 3T3 Zellen unter Beweis, welche durch Behandlung mit Doxorubicin einem apoptotischen Reiz ausgesetzt wurden. Eine konstitutiv aktive Mutante von ERK2 (Robinson, Stippec et al. 1998) schützt die Fibroblasten in vergleichbarer Weise wie aktives MEK vor dem apoptotischen Zelltod (Abbildung 19, Seite 69). Die Koinzidenz des aktiven Zustandes von ERK mit dem Überleben der MEK transformierten Zellen spricht vor diesem Hintergrund deutlich für einen Signalweg, der die MAP-Kinase einbezieht.

Es konnte von uns gezeigt werden, dass die Endstrecke der mitogenen Kaskade, repräsentiert von MEK und ERK, Apoptose in der haematopoetischen Zelllinie 32D und in den Fibroblasten der Zelllinie NIH 3T3, ausgelöst durch Entzug des Wachstumsfaktors bzw. durch Zytostatika-Exposition, effektiv hemmt. Unterstützung erhielten unsere Befunde durch eine Vielzahl später publizierter Studien, die eine MEK-abhängige Suppression der Apoptose, ausgelöst durch die verschiedensten zytotoxischen Insulte beobachteten. Wenigen gelang es allerdings den zugrunde liegenden Mechanismus zu klären. In einigen Fällen war es möglich, eine Alteration in der Transkription für die Apoptose bedeutender Gene nachzuweisen. In neuronalen Zellen, einer Hepatoma Zelllinie (HepG2), humanen Pankreaskarzinom Zellen und Thymozyten, kann eine MEK und ERK vermittelte erhöhte Transkription von anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern festgestellt werden (Liu, Boxer et al. 1999; Baek, Jang et al. 2000; Boucher, Morisset et al. 2000; Zhou, Yashiro-Ohtani et al. 2000). Neben dem Expressionslevel von Bcl-2 sind, abhängig vom Zelltyp, auch oder stattdessen Bcl-x<sub>L</sub> oder Mcl-1 erhöht. Die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Großfamilie entfalten, wie eingangs dargelegt, ihren zytoprotektiven Effekt vorwiegend am Mitochondrium. Sie sichern die Integrität der Organelle, unterbinden die Freisetzung Caspase aktivierender Substanzen und stehen damit in direkter Konkurrenz mit ihren pro-apoptotischen Verwandten. Eine gesteigerte Expression der anti-apoptotischen Bcl-2 Mitglieder verschiebt das Gleichgewicht zugunsten des Überlebens der Zelle.

Wie für MEK/ERK, so wird auch dem anti-apoptotischen Mechanismus von PI3K/AKT zum Teil die veränderte Transkription und Expression regulatorischer Gene zugrunde gelegt. AKT bewirkt über Inhibition der Forkhead Transkriptionsfaktoren eine verminderte Expression pro-apoptotischer Proteine. Darüber hinaus ist es in der Lage, anti-apoptotische Akteure, wie Bcl-2 in ihrer Expression zu stärken. Interessanterweise ist die Expression von Bcl-x<sub>L</sub> und Mcl-1 in Keratinozyten, bzw. Oesophaguskarzinom Zellen unabhängig von PI3K und AKT (Leu, Chang et al. 2000; Jost, Huggett et al. 2001). In den haematopoetischen Zelllinien TF-1 und JYTF-1 hingegen, ist die Expression von Mcl-1 und damit die Inhibition der Apoptose, nach Stimulation mit stem cell factor (SCF) und IL-5,

sowohl von PI3K/AKT als auch MEK/MAPK Signalwegen abhängig (Huang, Huang et al. 2000). Neben SCF und IL-5 führt auch die Bindung von IL-3 an den Rezeptor zur Induktion von Mcl-1. Die Dissektion des Signalweges zeigte die Abhängigkeit von PI3K und AKT, jedoch auch, dass eine Intervention weiterer Regulatoren, wie CREB möglich ist (Wang, Chao et al. 1999). CREB wurde kurz darauf als ein Effektor des anti-apoptotischen Signalweges von Ras/MAPK in cerebellären Neuronen entdeckt (Bonni, Brunet et al. 1999) und stellt somit einen möglichen Integrationspunkt der beiden Signalwege dar.

Wie bereits eingangs erwähnt ist die Proliferation und das Überleben von parentalen 32D Zellen sowohl von MEK als auch PI3K Signalwegen abhängig. Nach dem bisherigen Verständnis geht man von sich am IL-3 Rezeptor trennenden parallel verlaufenden Signalwegen aus, die ihrerseits den jeweiligen Effekt vermitteln. Der Entzug des Liganden sollte zum Verstummen des Signals führen. Eine Intervention in den PI3K Signalweg sollte keinen Einfluss auf die Protektion der gehungerten, aktives MEK exprimierenden Zellen erwarten lassen. Zur Abklärung oder zum Ausschluss einer Bedeutung von PI3K in diesen Zellen wurde der chemische Inhibitor LY294002 eingesetzt. Entgegen aller Erwartungen beeinflusst der Inhibitor den protektiven Effekt aktiven MEKs negativ. Der Einsatz von LY294002 antagonisiert wie der MEK Inhibitor U0126 die anti-apoptotische Wirkung der konstitutiv aktiven MEK Mutanten (Abbildung 20, Seite 70 und Abbildung 21, Seite 71). Eine unspezifische Inhibition der ERK Aktivierung durch LY294002 konnte mit einem phospho-spezifischen Immunoblot ausgeschlossen werden (Abbildung 22, Seite 72). Da die Zellen gehungert sind und somit eine Stimulation des IL-3 Rezeptors ausbleibt, ist eine mit der Aktivität MEKs verbundene Aktivierung von PI3K wahrscheinlich. Tatsächlich ist PI3K in über 24 Stunden gehungerten, aktives MEK exprimierenden Zellen, im Gegensatz zu parentalen Zellen aktiv (Abbildung 24, Seite 75). Die nachgewiesene Phosphorylierung des PI3K Substrates AKT, deutet auf einen anti-apoptotischen Signalweg hin, der auch diese Kinase mit einschließt. Intervention in den MEK Signalweg mittels U0126 führt zu einer Aufhebung der konsekutiven AKT Phosphorylierung (Abbildung 23, Seite 74).

Wir konnten zuvor zeigen, dass der protektive Effekt von Raf eine intakte Signaltransduktion über MEK voraussetzt. Die Versuche mit den Inhibitoren von MEK und PI3K offenbarten die Einbeziehung der letztgenannten Kinase in den anti-apoptotischen Signalweg von MEK. Es erscheint also naheliegend, dass PI3K ebenso einen „Effektor“ von Raf darstellt. Tatsächlich wird, analog zu den MEK exprimierenden Zellen, die zytoprotektive Wirkung onkogenen Rafs durch LY294002 gehemmt (Abbildung 29, Seite 80). Dieser Befund spricht für eine Rekrutierung von PI3K und konsekutiv auch PI3K abhängiger

Signalwege. Wie bereits erwähnt liegt AKT, das Substrat von PI3K, in aktives MEK exprimierenden Zellen in seiner aktivierten, an Serin 473 phosphorylierten Form vor. Durch Inhibition von MEK oder PI3K lässt sich die Phosphorylierung aufheben (Abbildung 23, Seite 74). Dass die Aktivierung von AKT nicht nur ein Nebenbefund der Rekrutierung von PI3K, sondern von tatsächlicher funktioneller Bedeutung ist, ließ sich durch Koexpression verschiedener AKT Mutanten mit onkogenem Raf beweisen. Sowohl Überexpression der Wildtyp Kinase als auch der aktiven Mutante unterstützen die anti-apoptotische Wirkung von Raf, während Koexpression einer kinasetoten, konkurrierenden Mutante die zytoprotektive Eigenschaft onkogenen Rafs antagonisiert (Abbildung 30, Seite 81).

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Studien publiziert, die auf eine rege Interaktion zwischen dem Raf/MEK/ERK und PI3K/AKT Signalweg hindeuten. Ausgehend von Rezeptortyrosinkinasen und Zytokinrezeptoren können beide simultan erregt werden (Carroll, Clark-Lewis et al. 1990; Rapp, Troppmair et al. 1990; Gold, Duronio et al. 1994), führen dann aber mitunter divergente Antworten, wie Proliferation, Wachstumsarrest, Apoptose, Differenzierung und Zellalterung aus. Mehr und mehr Evidenz spricht, neben einer einfachen Parallelität, für eine direkte Interaktion einzelner Akteure beider Signalwege. Das Schicksal, das der Zelle durch Aktivierung der Kinasekaskaden widerfährt, sowie die Interaktion dieser beiden ist wohl vom Zelltyp, dem Stimulus und unter anderem auch von der Stärke der Stimulation abhängig. IGF-1 stimuliert in der Myoblasten Zelllinie C2C12 sowohl den Raf/MEK/ERK, als auch den PI3K/AKT Signalweg, mit opponierenden Effekten. Aktiviertes AKT oder Inhibition der „mitogenen Kaskade“ führt zur Differenzierung der Zellen unter Ausbildung von Myofibrillen, während die Aktivierung von C-Raf den Arrest im undifferenzierten Zellstadium nach sich zieht. Interessanterweise unterbindet aktives AKT in differenzierten Myozyten die Phosphorylierung von Raf an Serin 338 und damit dessen Aktivierung, während C-Raf in undifferenzierten Myoblasten unbeeinflusst bleibt (Rommel, Clarke et al. 1999). Die Komplexität der Signaltransduktion über diese beiden Wege zeichnet sich auch in MCF-7 Zellen, einer humanen Brustkrebs Zelllinie ab (Moelling, Schad et al. 2002). Hohe Konzentrationen von IGF führen zur schnellen Aktivierung von AKT und nachfolgenden Inhibition von C-Raf. Die Inhibition von C-Raf erlaubt die Proliferation der Zellen. Niedrige Konzentrationen des Wachstumsfaktors haben indes nur einen geringen Effekt auf AKT und lassen Raf unbeeinflusst. Im Gegensatz zu Myoblasten bewirkt das jedoch eine Differenzierung der Zelle. Liganden, die ausschließlich das Ras/Raf Modul aktivieren, wie der Phorbolester PMA, regen die Zellen ebenso zur Differenzierung an und umgehen eine negative Kontrolle durch PI3K. Ähnlich verhält es sich in Gefäßmuskelzellen

neonataler Ratten. In VSM (vascular smooth muscle cell) Zellen wird AKT unter Einwirkung von PDGF (platelet derived growth factor) stark und anhaltend phosphoryliert, wodurch es zur Inhibition von C-Raf kommt. Die Inhibition erlaubt es den Zellen zu proliferieren und zu migrieren, außerdem verharren sie in einem dedifferenzierten Stadium. Thrombin hingegen führt nur zu einer partiellen und temporären Aktivierung von AKT, die Raf nicht beeinflusst, und eine Differenzierung der Zellen zulässt (Reusch, Zimmermann et al. 2001). Rommel et al. gelang es, in differenzierten Myozyten, nicht jedoch in Myoblasten, eine Assoziation von C-Raf und aktiviertem AKT nachzuweisen. Auch Zimmermann et al. (Zimmermann and Moelling 1999) zeigten die Assoziation von C-Raf und AKT, nach Überexpression in HEK 293 Zellen. Aktives AKT phosphoryliert C-Raf an Serin 259, was zur Bindung des 14-3-3 Proteins und Inaktivierung der Kinase führt. In MCF-7 Zellen lässt sich unter hohen IGF Konzentrationen und hoher Aktivität von AKT die Phosphorylierung des betreffenden Serins nachweisen; ebenso in VSM Zellen unter PDGF Einfluss. Die negative Kontrolle von Raf durch PI3K/AKT scheint nicht nur auf C-Raf beschränkt zu sein, sondern konnte auch für die Isoform B-Raf nachgewiesen werden. B-Raf besitzt mehrere mögliche AKT Phosphorylierungsstellen, von denen aber lediglich Serin 364, welches Serin 259 von C-Raf entspricht, und Serin 428 der Phosphorylierung durch AKT unterliegen. Nach Phosphorylierung an den genannten Resten durch coexprimiertes aktiviertes AKT, unterbleibt die Aktivierung von B-Raf in EGF (epidermal growth factor) stimulierten HEK293 Zellen (Guan, Figueroa et al. 2000). Die Beziehung zwischen Raf/MEK/ERK und PI3K/AKT ist jedoch vielschichtiger und komplexer, als es die bisherige Darstellung erahnen lässt. Neben dieser Akkumulation von Hinweisen für eine negative Regulation von Raf durch AKT existieren auch Befunde, die außer einem Synergismus in der Wirkung, auch auf einen positiven Einfluss des PI3K Signalweges auf die Aktivität von Raf deuten. Sutor et al. (Sutor, Vroman et al. 1999) zeigten, dass Zytokinbindung am IL-3 Rezeptor in der IL-3 abhängigen myeloiden Zelllinie FDC-P1 zur Aktivierung von A- und C-Raf führt. Die Aktivierung von A-Raf, aber nicht von C-Raf ist PI3K abhängig. Demgegenüber beschreiben Majewski et al (Majewski, Nieborowska-Skorska et al. 1999), in einer anderen IL-3 abhängigen Zelllinie (32Dcl3) die Phosphorylierung und Aktivierung von C-Raf in Reaktion auf die Aktivierung von AKT. Inhibition von PKC unterbindet die Aktivierung von C-Raf, was in diesem Fall PKC als Bindeglied zwischen AKT und C-Raf offenbart.

Eine frühe erneute Konvergenz der Signalwege jenseits der übergeordneten GTPase Ras wurde in Cos-7 Zellen gezeigt. Im Anschluss an die Ras vermittelte Aktivierung von PI3K kommt es zur Phosphorylierung an Serin 338 und Aktivierung von C-Raf. PI3K



rekrutiert hierzu, alternativ zu dem oben genannten Signalweg über AKT, vermutlich Cdc24, Rac und Pak3 (p21-activated kinase3) (Sun, King et al. 2000). Die Wechselwirkung zwischen Raf und PI3K/AKT ist also scheinbar nicht auf die inhibitorische Wirkung fixiert, sondern vermag durchaus auch Raf positiv zu beeinflussen. Welchen Charakter die Beziehung annimmt, ist dabei wohl vom zellulären Kontext abhängig, dem einwirkenden Stimulus und dem Zustand der Zelle. In Majewskis Studie (Majewski, Nieborowska-Skorska et al. 1999) ist die Apoptose der Zellen durch den Entzug des Wachstumsfaktor IL-3 prädisponiert. Expression von aktivem AKT führt zur Erhöhung der membranösen und mitochondrialen Spiegel von C-Raf, sowie, wie bereits erwähnt, zu dessen Phosphorylierung und Aktivierung. AKT schützt die Zellen vor der Apoptose durch die Phosphorylierung der pro-apoptischen Proteine BAD (Datta, Dudek et al. 1997; del Peso, Gonzalez-Garcia et al. 1997) und Caspase 9 (Cardone, Roy et al. 1998). Expression einer mitochondrialen, dominant negativen Mutante von C-Raf hebt den protektiven Effekt von aktivem AKT auf und sensibilisiert die untersuchten Zellen für die Apoptose. BAD ist in diesen Zellen zu einem geringeren Anteil phosphoryliert. Majewski et al. schlussfolgern, dass der anti-apoptische Effekt von AKT, zumindest zum Teil auf einer Akkumulation und Aktivierung von Raf am Mitochondrium beruht, was auch für die Phosphorylierung von BAD von Bedeutung ist. Ähnliche Befunde wurden zuvor für Bcl-2 erhoben (Wang, Rapp et al. 1996). Zusammen sprechen die Befunde für die Existenz bestimmter C-Raf spezifischer Signalwege an den Mitochondrien, welche weder von AKT noch Bcl-2 direkt aktiviert werden können. Interessanterweise sind diese Effekte sowohl in der Studie von Majewski et al (Majewski, Nieborowska-Skorska et al. 1999), als auch der von Wang et al. (Wang, Rapp et al. 1996) nicht von MEK abhängig, sondern stellen einen unabhängigen Raf Signalweg dar. Unsere Studie hingegen offenbart einen anti-apoptischen Signalweg ausgehend von v-Raf, der MEK und ERK involviert. Es verdichtet sich also die Evidenz für mehrere verschiedene Wege, die Raf beschreitet um die Zelle vor dem Zelluntergang zu schützen.

Es drängt sich nunmehr die Frage nach dem genauen Charakter der Raf/MEK und PI3K/AKT Beziehung und dem genauen Signalweg, der zur Aktivierung von PI3K und zum Überleben der Zelle führt auf. Unser bisheriges Verständnis der beiden Signalwege lässt eine direkte Interaktion und Aktivierung von PI3K mit MEK oder ERK als eher unwahrscheinlich erscheinen. Weitere intermediäre Partner sind wahrscheinlich. Ein möglicher, zur Aktivierung von PI3K führender Weg, ist der der autokrinen Sekretion von Wachstumsfaktoren. In Reaktion auf das aktive Raf/MEK/ERK Modul käme es zur Expression von Zytokinen die, nach Sekretion, an membranständige Rezeptoren binden und so PI3K und AKT rekrutieren.

Die Existenz solcher autokrinen Reaktionswege ist für Ras, Raf und MEK transformierte oder exprimierende Zellen beschrieben. V-Raf induziert in Fibroblasten der Ratten TGF $\alpha$  (transforming growth factor) (Heidecker, Cleveland et al. 1989), während eine Östrogen regulierte onkogene Raf Mutante (Raf-1:ER) die Synthese von Heparin bindendem epidermalen Wachstumsfaktor hbEGF (heparin binding epidermal growth factor), über ETS-Phosphorylierung und AP-1, stimuliert (McCarthy, Samuels et al. 1995; McCarthy, Chen et al. 1997). Sezerniertes hbEGF bindet an den autologen EGF Rezeptor und führt so zur Aktivierung der Jun N-terminalen Proteinkinase Kinasen (Kerkhoff and Rapp 1997). Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch C-Raf ist ebenso von einem autokrinen Mechanismus abhängig. Zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B rekrutiert Raf den Stress aktivierten SAPK (stress activated protein kinase) Signalweg. Inhibition des EGF Rezeptors, chemisch oder mit einer dominant negativen Mutante, unterbindet die autokrine Schleife (Troppmair, Hartkamp et al. 1998). Das Raf übergeordnete kleine G-Protein Ras vermag über diesen, wohl aber auch über Raf unabhängige Wege, mittels des SAPK (stress activated protein kinase) Signalweg NF- $\kappa$ B zu aktivieren (Norris and Baldwin 1999). Der weiteren Komplexität solcher autokrinen Signalwege wird Ausdruck verliehen durch die Beobachtung, dass mehrere verschiedene Zytokine den betreffenden Effekt initiieren. Eine jüngere Studie von Vale et al (Vale, Ngo et al. 2001) zeigte, dass auch IL-1 als mögliches, autokrin wirkendes Zytokin zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und Transformation Raf exprimierender Zellen in Betracht kommt.

Auch im Falle von MEK gibt es Hinweise für die Existenz solcher autokrinen Schleifen. Aktivierung von induzierbarem MEK1 resultiert in der Synthese von DNA; MEK allein ist allerdings insuffizient den Eintritt in den Zellzyklus auszulösen. Interessanterweise ist auch hier die Aktivität der PI3-Kinase notwendig. Die verzögerte Aktivierung von PI3K, sowie die Inhibition der Aktivierung mit Suramin spricht für ein parakrines Geschehen (Treinies, Paterson et al. 1999).

Suramin ist ein Naphthyl-Harnstoff-Derivat, das als G Protein Inhibitor fungiert, indem es den limitierenden Aktivierungsschritt der G-alpha Untereinheit, den Austausch von GDP gegen GTP blockiert (Freissmuth, Waldhoer et al. 1999). Es ist somit ein potenter Inhibitor für Rezeptoren von Wachstumsfaktoren (Voogd, Vansterkenburg et al. 1993).

Inkubation von MEK  $\Delta$ StuI-LIDEMANE exprimierenden 32D Zellen mit Suramin, in Konzentrationen von 75 – 100  $\mu$ M, führt über 48 Stunden zu einer annähernd 50-prozentigen Reduktion der Viabilität, im Vergleich zur Kontrollgruppe (unpublizierte Daten). Das Raf und MEK zur Entfaltung ihres anti-apoptotischen Effektes die PI3-Kinase über einen autokrinen Mechanismus rekrutieren ist somit wahrscheinlich. Schulze et al (Schulze, Lehmann et al.

2001) untersuchten mit Hilfe eines Microarray Ansatzes die Genexpression in der epithelialen humanen Brustkrebszelllinie MCF-10A nach Anschalten einer Östrogen induzierbaren C-Raf Mutante und wiesen eine starke Expression der autokrinen EGF ähnlichen Wachstumsfaktoren hbEGF, TGF $\alpha$  und Amphiregulin nach. Verlust der Adhäsion löst in den Epithelien das apoptotische Programm aus (Anoikis), welches durch Raf gehemmt wird. Auch in dieser Zelllinie kommt es zur konsekutiven Aktivierung der PI3-Kinase mit essentieller Bedeutung für die Unterdrückung der Apoptose durch Raf. Intervention am EGF Rezeptor unterbindet die Aktivierung von PI3K. Die Evidenz für einen bedeutungsvollen anti-apoptotischen Signalweg von Raf, der PI3K aktiviert und in verschiedenen Zellen existent ist, verdichtet sich.

Entgegen unserer Beobachtung der Notwendigkeit von PI3K und AKT zur Unterdrückung der Apoptose durch MEK, in zwei verschiedenen haematopoetischen Zelllinien, zeigt eine frühere Studie die Unabhängigkeit von einem PI3K Signalweg (Erhardt, Schremser et al. 1999). B-Raf unterdrückt in Rat-1 Zellen die Apoptose über einen MEK abhängigen Signalweg. In dieser Zelllinie führt weder die Aktivierung von MEK zur Aktivierung von PI3K, noch wirkt sich eine Inhibition der PI3-Kinase negativ auf die protektiven Eigenschaften von B-Raf und MEK aus. Die Expression von B-Raf schützt die Zellen nicht vor Austritt von Cytochrom *c* aus dem Mitochondrium, wohl aber vor der nachfolgenden Aktivierung der Caspasen. MEK  $\Delta$ StuI-LIDEMANE exprimierende 32D Zellen hingegen zeigen selbst 24 Stunden nach Entzug des Wachstumsfaktors keinen Übertritt von Cytochrom *c* aus dem Mitochondrium in das Zytosol. MEK wirkt in diesem Zellsystem also ähnlich wie AKT und Bcl-2 einer Zerstörung der Integrität der Organelle entgegen (unpublizierte Daten).

Die Unterdrückung der Apoptose durch Raf und seine abhängigen Kinasen MEK und ERK ist komplex, wie die bisherige Diskussion gezeigt hat. Raf vermag Zellen durch vielfältige Mechanismen vor dem programmierten Zelltod zu schützen, welche im folgenden zusammenfassend beleuchtet werden sollen. Raf kann dabei unabhängig von MEK/ERK agieren oder die Kinasen zur Entfaltung seines Effektes rekrutieren. Eine zentrale Stellung im apoptotischen Geschehen nimmt das Mitochondrium ein. Es ist also nicht verwunderlich, dass auch Raf an dieser Schaustätte aktiv ist. Schon früh konnte gezeigt werden, dass Raf mit dem mitochondriellen Protein Bcl-2 interagiert und synergistisch mit diesem die Apoptose unterdrückt (Wang, Miyashita et al. 1994). Die Interaktion besteht jedoch nicht in einer Enzym-Substrat Beziehung sondern wird als Mittel zur Translokation von Raf an das Mitochondrium verstanden, wo die Kinase dann ihre anti-apoptotische Wirkung entfaltet. In

diesem Sinne ist auch ein Mutante von Raf, in der die Kinase Domäne mit der transmembranösen Region des Mas70 Protein konjugiert ist, in der Lage Apoptose zu unterdrücken (Wang, Rapp et al. 1996). Die Translokation der aktiven Raf Mutante an das Mitochondrium führt zur Phosphorylierung des pro-apoptotischen Bcl-2 Homologen BAD, während eine Aktivierung von ERK ausbleibt. Allem Anschein nach liegt ein neuartiger Raf Signalweg auf Höhe des Mitochondriums vor, der unabhängig von den Raf Effektoren im Ras Signalweg, MEK und ERK ist. Interessanterweise zeigen mehrere spätere Studien eine Beteiligung des Ras-MAPK Signalweges in der Phosphorylierung von BAD. Scheid et al. (Scheid and Duronio 1998) gewannen erste Hinweise für eine Bedeutung von MEK in der posttranslationalen Kontrolle von BAD durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren. Stimulation der murinen Mastzellen Mc/9 mit IL-3 und GM-CSF führt zur Phosphorylierung von BAD, die durch Inhibition von MEK negativ beeinflusst wird. Fang et al. (Fang, Yu et al. 1999) wiesen später mit aktivierten Ras und Raf Mutanten eine MAPK abhängige und selektive BAD Phosphorylierung an Serin 112 nach. In cerebellären Neuronen (Körnerzellen) der Ratte gelang eine noch detailliertere Aufklärung des potentiell zugrundeliegenden Signalweges. Hier rekrutiert MEK RSK2, der p90<sup>RSK</sup> (p90 ribosomal S6 kinase family), zur Phosphorylierung von BAD an Serin 112 (Bonni, Brunet et al. 1999). Entgegen der Studie von Wang et al. (Wang, Rapp et al. 1996), die eine an die Membran des Mitochondriums gerichtete Mutante von Raf verwendeten, wurde in obengenannten Studien in erster Linie das „zellmembranöse“, Rezeptor induzierte Ras/MAPK Modul untersucht. MEK unabhängige spezifische Aktionen von artifiziell oder durch Bcl-2 an das Mitochondrium gebundenem Raf sind also nicht widerlegt. Die Phosphorylierung von BAD stellt somit weniger einen Scheidepunkt zwischen einem spezifischen Raf Signalweg und dem der klassischen Ras/MAPK Kaskade dar, als eher einen Konvergenzpunkt. In ihm vereinigen sich darüber hinaus weitere zelluläre Signalwege. Mehrere Proteinkinasen sind beschrieben, sich an der Phosphorylierung zu beteiligen. Allen voran AKT, welches BAD an Serin 136 modifiziert (Datta, Dudek et al. 1997; del Peso, Gonzalez-Garcia et al. 1997), aber auch PKA (Harada, Becknell et al. 1999), p90<sup>RSK</sup> (Bonni, Brunet et al. 1999) und Pak1 Kinase (Schurmann, Mooney et al. 2000).

Eine Studie von Salomoni et al. (Salomoni, Wasik et al. 1998) unterstreicht die Bedeutung und Potenz mitochondriellen Rafs in der Unterdrückung der Apoptose. Das Expressionsprodukt des „Philadelphia-Chromosom“, Bcr/Abl induziert in 32D Zellen die Translokation einer Fraktion endogenen C-Rafs an das Mitochondrium, wo dieses, wie auch Mas p70-C-Raf, zur Sequestration von hyperphosphoryliertem BAD in das Zytosol führt. Die

detailliertere Untersuchung des Mechanismus offenbart einen von mitochondrialem C-Raf, aber auch von PI3-Kinase abhängigen Signalweg, für den die Aktivierung von ERK jedoch entbehrlich ist (Neshat, Raitano et al. 2000). Bereits Majewski et al. (Majewski, Nieborowska-Skorska et al. 1999) beobachteten im gleichen Zellsystem eine Verflechtung des PI3K und Raf Signalweges in der Phosphorylierung von BAD. Überexpression von konstitutionell aktivem AKT induziert die Akkumulation und Aktivierung von Raf am Mitochondrium und hierüber die Phosphorylierung von BAD. Erneut ist der anti-apoptotische Effekt unabhängig von MEK. Diese Befunde stehen natürlich in gewissem Widerspruch zu der oben genannten Studie von Scheid et al. (Scheid and Duronio 1998), die in der ebenso IL-3 abhängigen Zelllinie Mc/9 eine PI3K abhängige Phosphorylierung von BAD zeigen, welche jedoch durch Inhibition von MEK negativ beeinflusst wird. Die weitere Dissektion der Signalwege am Mitochondrium und von membranständigen Rezeptoren wird in Zukunft sicherlich mehr Klarheit schaffen. Unbestritten bildet BAD einen Konvergenzpunkt verschiedener antiapoptotischer Signalwege, wie allein schon die Prävalenz der unterschiedlichen Proteinkinasen für die unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen erahnen lässt (s. oben).

Den Studien gemein ist die Aktivierung und Translokation von Raf an das Mitochondrium. Wenig ist über den zugrundeliegenden Mechanismus bekannt. Die Aktivierung von Raf zieht in der Regel die schnelle erneute Inaktivierung nach sich. Ein mögliches Szenario wäre, dass die Kompartimentierung an das Mitochondrium Raf vor der Inaktivierung schützt. Ein anderes, dass die kontinuierliche Aktivierung von Raf, unter Einwirkung eines Wachstumsfaktors, zu einem steten Austausch mit der mitochondriellen Ebene führt, solange bis die Rezeptorstimulation ausbleibt (Rapp, Rennefahrt et al. 2004). Neben der Aktivierung am Rezeptor muss jedoch auch die auf mitochondrieller Ebene bedacht werden. Ein Kandidat hierfür ist BAG-1. Die Lokalisation am Mitochondrium durch Assoziation mit Bcl-2 und die Bindung und Aktivierung von C-Raf ist beschrieben (Takayama, Sato et al. 1995; Wang, Takayama et al. 1996). Ein trimolekularer Komplex von C-Raf/Bcl-2 und BAG-1 rückt ins Blickfeld. Unterstützt wird die Theorie von Beobachtungen in BAG-1 defizienten Tieren. Die gesteigerte Apoptose in diesen Tieren korreliert mit der ausbleibenden Phosphorylierung von BAD an Serin 136 und Veränderungen in der intrazellulären Lokalisation von Kinasen (Gotz, Wiese et al. 2005). Demgegenüber hat BAG-1 in der bereits erwähnten Studie von Majewski et al. (Majewski, Nieborowska-Skorska et al. 1999) keinen Einfluss auf die Aktivierung von C-Raf. In diesem Fall wird sie von PKC vermittelt, welches ebenso als Regulator von Raf beschrieben ist (Sozeri, Vollmer et al. 1992;

Kolch, Heidecker et al. 1993; Cacace, Ueffing et al. 1996; Ueda, Hirai et al. 1996; Cai, Smola et al. 1997; Schonwasser, Marais et al. 1998). Weitere, abweichende Aktivierungsmechanismen schließen jedoch auch Majewski et al. nicht aus, denn vor dem Hintergrund einer Transformation durch Bcr/Abl ist PKC unbedeutend. Ein anderer Anwärter für den Posten des Raf-Aktivators ist Ras, welches unter bestimmten Bedingungen ebenso, wie C-Raf und BAG-1, von Bcl-2 an das Mitochondrium gebunden wird (Rebollo, Perez-Sala et al. 1999).

Erneut ist Bcl-2 als Protein Bindungspartner von Bedeutung, was seine zentrale Stellung in der Regulation der Apoptose und Integration verschiedener Stoffwechselwege, neben BAD, auf Höhe des Mitochondriums unterstreicht.

Weitere Evidenz für die Kooperation von Raf und Bcl-2 in der Transformation von Zellen erwächst aus einem transgenen Mausmodell für die Induktion Raf abhängiger Lungentumoren (Kerkhoff, Fedorov et al. 2000). Der Verlust von Bcl-2 verzögert deutlich die Entwicklung der Tumoren, ohne jedoch den Phänotyp zu verändern (Fedorov, Tyrsin et al. 2002). Zuzuschreiben ist die protrahierte Entwicklung, der gesteigerten Apoptose des betroffenen Gewebes.

Die Kooperation der beiden Proteine in der Regulation der Apoptose wurde ebenfalls in Zellen transgener Mäuse untersucht. Interessanterweise schützt sowohl die Expression von aktivem mitochondriellen Raf in einem *bcl-2*<sup>-/-</sup> Hintergrund, wie die Expression von Bcl-2 in *raf-1*<sup>-/-</sup> Zellen vor dem apoptotischen Zelluntergang (Zhong, Troppmair et al. 2001). Jedes Protein vermag also unabhängig vom anderen die Apoptose zu unterdrücken, was nahe legt, dass weitere zytoprotektive, Bcl-2 unabhängige Substrate und Signalwege von Raf existieren. Auch Neshat et al (Neshat, Raitano et al. 2000) deuten einen, vom pro-apoptotischen Bcl-2 Verwandten BAD unabhängigen, das Überleben der Zelle sichernden Signalweg an.

Die Suche nach weiteren anti-apoptotischen Signalwegen und Interaktionspartnern von Raf richtete sich zum einen, angesichts der genetischen Evidenz in *Drosophila melanogaster*, auf die „klassischen“ Effektoren der Ras/Raf Kaskade MEK und ERK (s. o.). Zum anderen wurden neue Interaktionspartner insbesondere auf mitochondrieller Ebene ausgemacht.

Im two-hybrid Screen einer HeLa Zell cDNA Fusion Library konnte die Assoziation von Raf Isotypen mit den mitochondriellen Proteinen hTIM und hTOM nachgewiesen werden (Yuryev, Ono et al. 2000). A-Raf assoziiert sowohl mit hTIM als auch hTOM, während C-Raf lediglich mit hTOM interagiert. Die weitere Analyse des mitochondriellen Kompartiments offenbarte, dass lediglich A-Raf durch die genannte Interaktion in den intermembranösen

mitochondriellen Raum findet. hTIM und hTOM sind die humanen Homologen einer Familie phylogenetisch hochkonservierter mitochondrieller Proteine. Sie nehmen eine zentrale Stellung in der Translokation von Matrixproteinen in das Mitochondrium ein. TOM bildet die Translokase der äußeren mitochondrialen Membran (translocase components of the outer mitochondrial membrane) und TIM (translocase components of the inner mitochondrial membrane), die der inneren. Im Verbund bewerkstelligen sie den Transport der zum mitochondrialen Import markierten Proteine. Ihre Bedeutung für den Organismus ist jedoch noch nicht gänzlich geklärt. Störungen der mitochondrialen Transportsysteme und mitochondrialer Proteine gelten als Ätiologie von Myopathien, neurologischen Störungen und Störungen exkretorischer Gewebe. Ein Defekt, der auf einer Mutation von TOM beruht, ist bisher noch nicht beschrieben. Vermutlich sind genetische Aberrationen nicht mit dem Überleben der Zellen und des Organismus vereinbar und führen in einem frühen embryonalen Stadium zum Tod (Hoogenraad, Ward et al. 2002). Das Mitochondrium ist, wie bereits eingangs erwähnt, zentrale Schaltstelle in der Regulation der Apoptose. Darüber hinaus beherbergt es für die Homöostase des Organismus wichtige Stoffwechselforgänge, wie den Citratzyklus und die Atmungskette. Mit der Kontrolle der Transportvorgänge wäre A-Raf in der Lage das subtile Gleichgewicht der, zu einem Großteil extramitochondriell codierten, Akteure dieser Stoffwechselforgänge und damit letztlich das Schicksal der Zelle zu beeinflussen. Entgegen dem theoretisch möglichen ist allerdings bisher noch kein direkter Zusammenhang zwischen der Interaktion von A-Raf mit hTOM/hTIM und der Regulation der Apoptose oder eines anderen zellulären Vorgangs beschrieben (Yuryev, Ono et al. 2000).

Neben den Translokasen TOM und TIM existiert ein weiterer mitochondrialer Proteinkomplex, der den Austausch von Metaboliten zwischen dem Mitochondrium und dem Zytoplasma ermöglicht. VDAC (voltage-dependent anion channel) ist das vorherrschende Protein der äußeren mitochondrialen Membran und dient als Kanal für den Efflux und Influx von Ionen, den Adenosinphosphaten ADP und ATP und anderen Metaboliten, aus und in das Mitochondrium (Benz 1994). Es ist, neben der Adenine Nucleotide Translocase (ANT), Kernkomponente des Permeability Transition Pore (PTP). Alteration der Permeabilität des PTP führt zur Zerstörung des mitochondrialen Membranpotentials  $\Delta\Psi_m$  und Freisetzung von Cytochrom *c*, am wahrscheinlichsten durch VDAC/Bax Kanäle. Bcl-2 stabilisiert in „gesunden“ Zellen die Kanäle, erhält das Membranpotential  $\Delta\Psi_m$  aufrecht, verhindert die Freisetzung von Cytochrom *c* und damit letztlich die Initiation der Apoptose (Zamzami, Susin et al. 1996; Marzo, Brenner et al. 1998; Shimizu, Ide et al. 2000; Shimizu and Tsujimoto 2000; Adams and Cory 2001; Shimizu, Matsuoka et al. 2001; Zamzami and Kroemer 2001).

Le Mellay et al. (Le Mellay, Troppmair et al. 2002) zeigen eine verzögerte Depolarisation der mitochondrialen Membran von Mas-BXB exprimierenden 32D Zellen nach IL-3 Entzug. Die aktive mitochondrielle C-Raf Mutante inhibiert auch die Freisetzung von Cytochrom *c* und damit die Aktivierung der Caspasen. Auf der Suche nach einer Assoziation von C-Raf mit den vermeintlich von Cytochrom *c* passierten Kanälen stoßen Le Mellay et al. auf eine Interaktion von C-Raf mit VDAC. Die zunächst vermutete Assoziation mit dem pro-apoptotischen Bcl-2 Homolog Bax bestätigt sich nicht. Die Interaktion mit VDAC ist unabhängig vom Aktivierungszustand von C-Raf, allerdings unterbindet lediglich aktives C-Raf die Aktivität des Kanals. Interessanterweise finden sich weder *in vitro* noch *in vivo* Hinweise für eine Enzym-Substrat Beziehung. Le Mellay et al. mutmaßen, dass lediglich die negativ geladene, aktive Form von C-Raf in der Lage ist VDAC über die aminoternale  $\alpha$ -Helix zu binden und über eine Konformationsänderung eine Insertion in die mitochondrielle Membran zu unterbinden. Die verminderte Zahl der Kanäle in der äußeren Membran verhindere die Freisetzung von Cytochrom *c* und damit die Apoptose.

C-Raf vermag, wie oben dargelegt, die Liberation von Cytochrom *c* zu unterbinden, allerdings existieren auch Hinweise für eine Intervention von Raf in den apoptotischen Signalweg nach diesem schicksalhaften Ereignis. So demonstrieren Erhardt et al. (Erhardt, Schremser et al. 1999) die Fähigkeit von B-Raf die Aktivierung der Caspase Kaskade nach Freisetzung oder artifiziereller Injektion von Cytochrom *c* zu unterbinden.

Die IAPs, als direkte Inhibitoren der Caspasen, rücken in das Blickfeld der Betrachtung. Das IAP Homolog der Vögel ITA bindet Raf Kinasen sowohl in stabilen PC12 Zelllinien, als auch nach Überexpression in HEK293 und Sf9 Zellen und im sich entwickelnden Hühnergehirn (Digby, Rapp et al. 2005). Die Bindung erfolgt vermutlich über die BIR Domäne (baculovirus IAP repeat). Expression von ITA unterbindet die NGF (neuronal growth factor) induzierte Sprossung des Neuriten und schützt darüber hinaus die Neuronen vor Apoptose durch Einwirkung von TNF $\alpha$  oder Entzug von NGF. Im two-hybrid Screen einer PC-12 cDNA Bibliothek findet sich NRAGE als ITA Bindungspartner (Jordan, Dinev et al. 2001). NRAGE ist ein neuartiges MAGE (melanoma associated antigen) Protein, welches auch das humane XIAP bindet. Die stabile Expression von NRAGE in der IL-3 abhängigen Zelllinie 32D führt, nach Entzug des Wachstumsfaktors, zu einer gesteigerten Apoptose unter erhöhter Bindung von NRAGE an XIAP (Jordan, Dinev et al. 2001). Für die Inhibition von Caspasen ist die BIR Domäne (baculovirus IAP repeat) der IAPs, über die vermutlich auch Raf ITA bindet (Troppmair and Rapp 2003; Digby, Rapp et al. 2005), von Bedeutung. Das RING Motiv der IAPs hingegen spielt eine Rolle in der Degradation der IAPs



und IAP assoziierter Proteine über das Ubiquitin Protease System (Salvesen and Duckett 2002) und dient als Bindungssequenz von NRAGE (Jordan, Dinev et al. 2001). Die dargestellten Interaktionen lassen an ein Szenario denken, in dem die Degradation der IAPs nach Bindung von NRAGE der Kontrolle durch Raf unterliegen. Raf hätte somit einen direkten Einfluss auf die Inhibitoren der Caspasen und damit ein Werkzeug zur Regulation der Apoptose, letztlich sowohl am Todesrezeptor, wie auf mitochondrieller Ebene (Salvesen and Duckett 2002).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation der IAPs durch Raf liegt in der Kontrolle ihrer Transkription. IAP Proteine werden transkriptionell durch NF- $\kappa$ B reguliert (Chu, McKinsey et al. 1997; Ghosh, May et al. 1998; Stehlik, de Martin et al. 1998), dessen Aktivierung durch Raf beschrieben ist (Troppmair, Hartkamp et al. 1998; Norris and Baldwin 1999; Baumann, Weber et al. 2000). Neben IAP unterliegen aber auch anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie der transkriptionellen Kontrolle durch NF- $\kappa$ B und damit einer potentiellen Regulation durch Raf (Grumont, Rourke et al. 1999; Zong, Edelstein et al. 1999; Chen, Edelstein et al. 2000; Catz and Johnson 2001). Eine Bedeutung von NF- $\kappa$ B in der Unterdrückung der Apoptose durch Raf ist dennoch nicht beschrieben.

Die Expression anti-apoptotischer Bcl-2 Homologer in Reaktion auf eine Aktivierung von MEK und ERK hingegen ist bekannt und wurde bereits oben dargelegt. Aktivierung von C-Raf in CC139 Fibroblasten reduziert die Expression des pro-apoptotischen Bim, hebt Veränderungen der Konformation von Bax auf und blockt über einen MEK/ERK abhängigen Signalweg die Apoptose (Weston, Balmanno et al. 2003). Somit sind also nicht nur die anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder Ziele einer anti-apoptotischen Intervention von Raf sondern auch die pro-apoptotischen. Ein weiterer Mechanismus der transkriptionellen Kontrolle der Apoptose, der der Expression autokriner Wachstumsfaktoren, wurde ebenfalls bereits erläutert und soll der Vollständigkeit halber hier nochmals erwähnt werden.

Alle bisher genannten anti-apoptotischen Signalwege von Raf beeinflussen direkt oder indirekt die Akteure der Apoptose. Neuere Betrachtungen des Wachstums von Tumoren und die Bedeutung von Raf in diesem Prozess beziehen die Regulation der metabolischen Homöostase mit ein. Solide Tumoren sind angesichts ihres unphysiologischen Wachstums mit einer unzureichenden Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen konfrontiert. Vermag der Tumor diesen kritischen Zustand nicht zu kompensieren, kommt es zum apoptotischen (teils auch nekrotischen) Zelluntergang. Ist die Rate der apoptotischen Zellen gleich der der mitotischen, stagniert das Tumorstadium (Dang and Semenza 1999). Durch die Induktion

der Neovaskularisierung und Veränderungen im Metabolismus unternimmt der Tumor den Versuch der Kompensation.

Zentraler Bedeutung kommt dem durch Hypoxie induzierbaren Transkriptionsfaktor HIF-1 (hypoxia-inducible transcription factor) zu. Er steigert die Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor), was zur Neovaskularisierung führt und ermöglicht eine Änderung des Zellmetabolismus durch die Expression glycolytischer Enzyme, wie Aldolase A, Enolase 1, Lactatdehydrogenase A, Phosphofruktokinase L, Phosphoglyceratkinase 1 und Pyruvatkinase M (Dang and Semenza 1999). Bereits 1930 demonstrierte Otto Warburg, dass der Großteil der Tumoren, auch unter aeroben Bedingungen, die Glycolyse zur Energiegewinnung nutzt, bekannt als „Warburg Effekt“ (Warburg 1931). Konsekutiv zeigen Tumoren eine gesteigerte Aufnahme von Glucose und eine erhöhte Expression des Glucose Transporters GLUT1 (Gatenby 1995; Younes, Lechago et al. 1996). Pyruvatkinase ist ein entscheidendes Enzym in der Glycolyse. Die stark exergone Hydrolyse von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat ermöglicht den (Netto-) Gewinn von 2 mol ATP pro mol Glucose. In proliferierenden und Tumorzellen wird die embryonale Form M2 der vier gewebsspezifischen Formen der Pyruvatkinase exprimiert (Staal and G. 1991; Brinck, Eigenbrodt et al. 1994; Steinberg, Klingelhoffer et al. 1999). Le Mellay et al. isolierten in einem two-hybrid Screen mit A-Raf die genannte Isoform Pyruvatkinase M2 (Le Mellay, Houben et al. 2002). A-Raf erhöht die Aktivität des Enzyms und damit die Hydrolyse von Phosphoenolpyruvat unter Gewinn von ATP. A-Raf gewinnt damit Einfluss auf den veränderten, glycolytischen Metabolismus von transformierten Zellen. Dementsprechend kooperieren A-Raf und M2-PK auch in der Transformation von Zellen (Le Mellay, Houben et al. 2002).

Eine Vielzahl von Tumoren zeigt die Induktion von *myc* einem Onkogen, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert (Grandori and Eisenman 1997). Ein Zielgen von Myc kodiert für LDH-A (Shim, Dolde et al. 1997). Lactatdehydrogenase (LDH) reduziert Pyruvat zu Lactat und regeneriert das in der Glycolyse eingesetzte NAD<sup>+</sup>. Ein Vorzug dieser anaeroben Glycolyse mag in der Protektion der DNA vor Sauerstoffradikalen liegen, die unter der oxidativen Phosphorylierung entstehen (Brand and Hermfisse 1997). Myc kooperiert mit Raf in der Transformation von Zellen (Blasi, Mathieson et al. 1985). Die Kooperation von Raf und Myc mag sich dabei auch auf die Regulation des Glucose Metabolismus beziehen. Zum einen erhöht A-Raf mit Pyruvat das Substrat von LDH, zum anderen reduziert die Interaktion von C-Raf mit VDAC die mitochondriellen PTPs über die ein Eintritt des Pyruvat und NADH/H<sup>+</sup> in das Mitochondrium zur oxidativen Verstoffwechslung erfolgt. Raf könnte also

die Zellen für eine Energieproduktion durch anaerobe Glycolyse determinieren und damit das Überleben der Zellen im Grenzgebiet der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sichern und ein Schaden durch potentielle oxidative Metabolite unterbinden.

Wie hier zusammenfassend gezeigt wurde, ist die Regulation der Apoptose durch Raf und die Effektoren MEK und ERK komplex und in keinem Fall bereits gänzlich geklärt. Raf beschreitet in der Unterdrückung der Apoptose verschiedenste Signalwege. Die können von MEK/ERK abhängig und unabhängig sein, am Mitochondrium lokalisiert sein und pro-, bzw. anti-apoptotische Akteure beeinflussen oder durch eine Änderung des Zellstoffwechsels eine Protektion vor oxidativer Schädigung, wie auch im Grenzgebiet der Sauerstoffversorgung bieten. Diese Studie unterstreicht die Bedeutung von MEK in der Unterdrückung der Apoptose durch C-Raf, zeigt jedoch auch, über den Einsatz konstitutiv aktiver Mutanten, die hohe anti-apoptotische Potenz von MEK. Der anti-apoptotischen Wirkung lässt sich eine Rekrutierung und Aktivierung von PI3-Kinase und AKT, über einen letztlich nicht eindeutig zu klärenden Mechanismus, zugrunde legen. Die genaue Orchestrierung der unterschiedlichen, teilweise unterschiedlichsten anti-apoptotischen Signalwege von Raf bleibt zu klären und lässt mit Spannung weitere Ergebnisse auf diesem Gebiet erwarten.

## 5 Zusammenfassung/Summary

### 5.1 Zusammenfassung

Unterhalb des Interleukin 3 (Il-3) Rezeptors sind zwei Ras-abhängige Signalwege beschrieben, die entweder zur Aktivierung von C-Raf oder von PI3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (PKB, AKT) führen und Wachstum und Überleben vermitteln.

Frühere Untersuchungen des Mechanismus, über den C-Raf Apoptose unterdrückt, zeigten die Notwendigkeit einer Anwesenheit der zytoplasmatischen Kinase an den Mitochondrien. Diese Translokation konnte entweder durch Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 oder aber durch Fusion der Kinase mit dem mitochondrialen Protein Mas p70 erreicht werden. Aktiviertes mitochondrial gebundenes C-Raf ist nicht in der Lage ERK1 und ERK2 zu aktivieren, vermag aber durch Inaktivierung des proapoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedes BAD Apoptose zu unterdrücken. Ungeachtet dieser Ergebnisse deuteten andere genetische und biochemische Untersuchungen auch auf eine Bedeutung der Raf Effektoren MEK und ERK in der Unterdrückung des programmierten Zelltodes hin. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Bedeutung von MEK und MEK-abhängigen Signalwegen für das zelluläre Überleben untersucht. Wir nutzten für diese Untersuchungen überwiegend die Il-3 abhängige Zelllinie 23D. MEK war essentiell für das zelluläre Überleben und Wachstum nach Stimulation durch Il-3. Eine konstitutiv aktive MEK1 Mutante verzögerte signifikant das Einsetzen der Apoptose nach Entzug des Wachstumsfaktors, während eine dominant negative Mutante den Zelltod akzelerierte. In der Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 unterdrückte eine konstitutiv aktive Mutante von ERK2, ähnlich effektiv wie onkogenes MEK, durch Doxorubicin induzierten Zelltod. Diese Beobachtung lässt auf einen, das Überleben der Zelle vermittelnden, Signalweg von MEK schließen, der zur Aktivierung von ERK führt. Der protektive Effekt von aktiviertem MEK in 32D Zellen wurde durch MEK- und PI3K-abhängige Mechanismen vermittelt. Die dabei beobachtete Aktivierung von PI3K führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von AKT. Die Abhängigkeit von MEK und PI3K Signalwegen konnte auch für den Schutz von 32D Zellen vor Apoptose durch onkogenes C-Raf gezeigt werden. Diese Befunde ließen sich ebenso in der Il-3 abhängigen pro-B Zelllinie BaF3 verifizieren, was darauf schließen lässt, dass die Rekrutierung von MEK/ERK im antiapoptotischen Signalweg von aktiviertem Raf ein allgemeingültiger Mechanismus ist. Dass in diesem antiapoptotischen Signalweg von C-Raf auch der PI3K Effektor AKT notwendig ist zeigten weitere Untersuchungen, in denen eine dominant negative Mutante von AKT den protektiven Effekt von aktiviertem C-Raf

inhibierte, während eine konstitutiv aktive Form von AKT einen synergistischen Effekt mit C-Raf in der Unterdrückung der Apoptose hatte. Diese Daten zeigen einen, zelluläres Überleben vermittelnden Effekt von Raf, der durch MEK und AKT vermittelt wird.

Schlagwörter: Apoptose, Raf, MEK, ERK, PKB, AKT, Interleukin-3, Il-3

## **5.2 Summary**

Two Ras effector pathways leading to the activation of C-Raf and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) have been implicated in the survival signaling by the interleukin 3 (IL-3) receptor. Analysis of apoptosis suppression by C-Raf demonstrated the requirement for mitochondrial translocation of the kinase in this process. This could be achieved either by overexpression of the antiapoptotic protein Bcl-2 or by targeting C-Raf to the mitochondria via fusion to the mitochondrial protein Mas p70. Mitochondrially active C-Raf is unable to activate extracellular signal-related kinase 1 (ERK1) and ERK2 but suppresses cell death by inactivating the proapoptotic Bcl-2 family member BAD. However, genetic and biochemical data also have suggested a role for the C-Raf effector module MEK-ERK in apoptosis suppression. We thus tested for MEK requirement in cell survival signaling using the interleukin 3 (IL-3)-dependent cell line 32D. MEK is essential for survival and growth in the presence of IL-3. Upon growth factor withdrawal the expression of constitutively active MEK1 mutants significantly delays the onset of apoptosis, whereas the presence of a dominant negative mutant accelerates cell death. Survival signaling by MEK most likely results from the activation of ERKs since expression of a constitutively active form of ERK2 was as effective in protecting NIH 3T3 fibroblasts against doxorubicin-induced cell death as oncogenic MEK. The survival effect of activated MEK in 32D cells is achieved by both MEK- and PI3K-dependent mechanisms and results in the activation of PI3K and in the phosphorylation of AKT. MEK and PI3K dependence is also observed in 32D cells protected from apoptosis by oncogenic C-Raf. Additionally, we also could extend these findings to the IL-3-dependent pro-B-cell line BaF3, suggesting that recruitment of MEK is a common mechanism for survival signaling by activated Raf. Requirement for the PI3K effector AKT in this process is further demonstrated by the inhibitory effect of a dominant negative AKT mutant on Raf-1-induced cell survival. Moreover, a constitutively active form of AKT synergizes with Raf-1 in apoptosis suppression. In summary these data strongly suggest a Raf effector pathway for cell survival that is mediated by MEK and AKT.

Keywords: Apoptosis, Raf, MEK, ERK, PKB, AKT, Interleukin-3, Il-3

## 6 Literatur

- Abraham, D., K. Podar, et al. (2000). "Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation." *J Biol Chem* **275**(29): 22300-4.
- Acehan, D., X. Jiang, et al. (2002). "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." *Mol Cell* **9**(2): 423-32.
- Adams, J. M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." *Science* **281**(5381): 1322-6.
- Adams, J. M. and S. Cory (2001). "Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family." *Trends Biochem Sci* **26**(1): 61-6.
- Adams, J. M. and S. Cory (2002). "Apoptosomes: engines for caspase activation." *Curr Opin Cell Biol* **14**(6): 715-20.
- Ahn, N. G., T. S. Nahreini, et al. (2001). "Pharmacologic inhibitors of MKK1 and MKK2." *Methods Enzymol* **332**: 417-31.
- Aitken, A., D. Jones, et al. (1995). "14-3-3 proteins: biological function and domain structure." *Biochem Soc Trans* **23**(3): 605-11.
- Alessi, D. R., Y. Saito, et al. (1994). "Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1." *Embo J* **13**(7): 1610-9.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, et al. (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." *Cell* **87**(2): 171.
- Altomare, D. A., K. Guo, et al. (1995). "Cloning, chromosomal localization and expression analysis of the mouse Akt2 oncogene." *Oncogene* **11**(6): 1055-60.
- Andjelkovic, M., D. R. Alessi, et al. (1997). "Role of translocation in the activation and function of protein kinase B." *J Biol Chem* **272**(50): 31515-24.
- Andjelkovic, M., P. F. Jones, et al. (1995). "Developmental regulation of expression and activity of multiple forms of the Drosophila RAC protein kinase." *J Biol Chem* **270**(8): 4066-75.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." *Science* **281**(5381): 1305-8.
- Avruch, J., X. F. Zhang, et al. (1994). "Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway." *Trends Biochem Sci* **19**(7): 279-83.
- Baek, J. H., J. E. Jang, et al. (2000). "Hypoxia-induced VEGF enhances tumor survivability via suppression of serum deprivation-induced apoptosis." *Oncogene* **19**(40): 4621-31.
- Bakhshi, A., J. P. Jensen, et al. (1985). "Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18." *Cell* **41**(3): 899-906.
- Barnard, D., B. Diaz, et al. (1998). "Oncogenes, growth factors and phorbol esters regulate Raf-1 through common mechanisms." *Oncogene* **17**(12): 1539-47.
- Barnier, J. V., C. Papin, et al. (1995). "The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression." *J Biol Chem* **270**(40): 23381-9.
- Barsyte-Lovejoy, D., A. Galanis, et al. (2002). "Specificity determinants in MAPK signaling to transcription factors." *J Biol Chem* **277**(12): 9896-903.
- Barthel, A., S. T. Okino, et al. (1999). "Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1." *J Biol Chem* **274**(29): 20281-6.
- Baumann, B., C. K. Weber, et al. (2000). "Raf induces NF-kappaB by membrane shuttle kinase MEKK1, a signaling pathway critical for transformation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4615-20.

- Beck, T. W., M. Huleihel, et al. (1987). "The complete coding sequence of the human A-raf-1 oncogene and transforming activity of a human A-raf carrying retrovirus." Nucleic Acids Res **15**(2): 595-609.
- Bellacosa, A., T. F. Franke, et al. (1993). "Structure, expression and chromosomal mapping of c-akt: relationship to v-akt and its implications." Oncogene **8**(3): 745-54.
- Bellacosa, A., J. R. Testa, et al. (1991). "A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region." Science **254**(5029): 274-7.
- Beltman, J., J. R. Erickson, et al. (1999). "C3 toxin activates the stress signaling pathways, JNK and p38, but antagonizes the activation of AP-1 in rat-1 cells." J Biol Chem **274**(6): 3772-80.
- Benz, R. (1994). "Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins." Biochim Biophys Acta **1197**(2): 167-96.
- Bergmann, A., J. Agapite, et al. (1998). "The Drosophila gene hid is a direct molecular target of Ras-dependent survival signaling." Cell **95**(3): 331-41.
- Bergmann, A., J. Agapite, et al. (1998). "Mechanisms and control of programmed cell death in invertebrates." Oncogene **17**(25): 3215-23.
- Biggs, W. H., 3rd, J. Meisenhelder, et al. (1999). "Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7421-6.
- Birnbaum, M. J., R. J. Clem, et al. (1994). "An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs." J Virol **68**(4): 2521-8.
- Blanchard, H., L. Kodandapani, et al. (1999). "The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis." Structure Fold Des **7**(9): 1125-33.
- Blasi, E., B. J. Mathieson, et al. (1985). "Selective immortalization of murine macrophages from fresh bone marrow by a raf/myc recombinant murine retrovirus." Nature **318**(6047): 667-70.
- Bodmer, J. L., N. Holler, et al. (2000). "TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8." Nat Cell Biol **2**(4): 241-3.
- Boldin, M. P., T. M. Goncharov, et al. (1996). "Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death." Cell **85**(6): 803-15.
- Boldin, M. P., I. L. Mett, et al. (1995). "Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects." J Biol Chem **270**(1): 387-91.
- Bonner, T. I., H. Oppermann, et al. (1986). "The complete coding sequence of the human raf oncogene and the corresponding structure of the c-raf-1 gene." Nucleic Acids Res **14**(2): 1009-15.
- Bonni, A., A. Brunet, et al. (1999). "Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms." Science **286**(5443): 1358-62.
- Bos, J. L. (1989). "ras oncogenes in human cancer: a review." Cancer Res **49**(17): 4682-9.
- Boucher, M. J., J. Morisset, et al. (2000). "MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells." J Cell Biochem **79**(3): 355-69.
- Bouillet, P., D. Metcalf, et al. (1999). "Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity." Science **286**(5445): 1735-8.
- Boulton, T. G., S. H. Nye, et al. (1991). "ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF." Cell **65**(4): 663-75.

- Brand, K. A. and U. Hermfisse (1997). "Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species." *Faseb J* **11**(5): 388-95.
- Brazil, D. P. and B. A. Hemmings (2001). "Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow." *Trends Biochem Sci* **26**(11): 657-64.
- Brinck, U., E. Eigenbrodt, et al. (1994). "L- and M2-pyruvate kinase expression in renal cell carcinomas and their metastases." *Virchows Arch* **424**(2): 177-85.
- Brockstedt, E., A. Rickers, et al. (1998). "Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line. Cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by caspase 3." *J Biol Chem* **273**(43): 28057-64.
- Brodbeck, D., P. Cron, et al. (1999). "A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain." *J Biol Chem* **274**(14): 9133-6.
- Bruder, J. T., G. Heidecker, et al. (1992). "Serum-, TPA-, and Ras-induced expression from Ap-1/Ets-driven promoters requires Raf-1 kinase." *Genes Dev* **6**(4): 545-56.
- Brunet, A., A. Bonni, et al. (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." *Cell* **96**(6): 857-68.
- Budihardjo, I., H. Oliver, et al. (1999). "Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis." *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 269-90.
- Cacace, A. M., M. Ueffing, et al. (1996). "PKC epsilon functions as an oncogene by enhancing activation of the Raf kinase." *Oncogene* **13**(12): 2517-26.
- Cai, H., U. Smola, et al. (1997). "Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isotypes in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase." *Mol Cell Biol* **17**(2): 732-41.
- Cain, K., S. B. Bratton, et al. (2000). "Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes." *J Biol Chem* **275**(9): 6067-70.
- Cardone, M. H., N. Roy, et al. (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." *Science* **282**(5392): 1318-21.
- Carroll, M. P., I. Clark-Lewis, et al. (1990). "Interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mediate rapid phosphorylation and activation of cytosolic c-raf." *J Biol Chem* **265**(32): 19812-7.
- Catling, A. D., H. J. Schaeffer, et al. (1995). "A proline-rich sequence unique to MEK1 and MEK2 is required for raf binding and regulates MEK function." *Mol Cell Biol* **15**(10): 5214-25.
- Catz, S. D. and J. L. Johnson (2001). "Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer." *Oncogene* **20**(50): 7342-51.
- Chai, J., C. Du, et al. (2000). "Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO." *Nature* **406**(6798): 855-62.
- Chai, J., E. Shiozaki, et al. (2001). "Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP." *Cell* **104**(5): 769-80.
- Chao, T. S., D. A. Foster, et al. (1994). "Differential Raf requirement for activation of mitogen-activated protein kinase by growth factors, phorbol esters, and calcium." *J Biol Chem* **269**(10): 7337-41.
- Chaudhary, D., K. O'Rourke, et al. (1998). "The death inhibitory molecules CED-9 and CED-4L use a common mechanism to inhibit the CED-3 death protease." *J Biol Chem* **273**(28): 17708-12.
- Chen, C., L. C. Edelstein, et al. (2000). "The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L)." *Mol Cell Biol* **20**(8): 2687-95.
- Chen, R. H., M. C. Chang, et al. (1999). "Interleukin-6 inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and signal transducers and activators of transcription 3 pathways." *J Biol Chem* **274**(33): 23013-9.



- Chen, R. H., Y. H. Su, et al. (1998). "Suppression of transforming growth factor-beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway." Oncogene **17**(15): 1959-68.
- Chen, Z., T. B. Gibson, et al. (2001). "MAP kinases." Chem Rev **101**(8): 2449-76.
- Cheng, E. H., D. G. Kirsch, et al. (1997). "Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases." Science **278**(5345): 1966-8.
- Cheng, E. H., M. C. Wei, et al. (2001). "BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis." Mol Cell **8**(3): 705-11.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, et al. (1997). "Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death." Science **275**(5303): 1122-6.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, et al. (1995). "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." Cell **81**(4): 505-12.
- Chinnaiyan, A. M., C. G. Tepper, et al. (1996). "FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis." J Biol Chem **271**(9): 4961-5.
- Chong, H., J. Lee, et al. (2001). "Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation." Embo J **20**(14): 3716-27.
- Chong, H., H. G. Vikis, et al. (2003). "Mechanisms of regulating the Raf kinase family." Cell Signal **15**(5): 463-9.
- Chu, Z. L., T. A. McKinsey, et al. (1997). "Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(19): 10057-62.
- Cleary, M. L., S. D. Smith, et al. (1986). "Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation." Cell **47**(1): 19-28.
- Clem, R. J., E. H. Cheng, et al. (1998). "Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(2): 554-9.
- Cleveland, J. L., M. Dean, et al. (1988). "Abrogation of IL-3 dependence of myeloid FDC-P1 cells by tyrosine kinase oncogenes is associated with induction of c-myc." Curr Top Microbiol Immunol **141**: 300-9.
- Cleveland, J. L., J. Troppmair, et al. (1994). "v-raf suppresses apoptosis and promotes growth of interleukin-3-dependent myeloid cells." Oncogene **9**(8): 2217-26.
- Cobb, M. H., S. Xu, et al. (1996). "Structural analysis of the MAP kinase ERK2 and studies of MAP kinase regulatory pathways." Adv Pharmacol **36**: 49-65.
- Coffer, P. J., J. Jin, et al. (1998). "Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation." Biochem J **335** (Pt 1): 1-13.
- Coffer, P. J. and J. R. Woodgett (1991). "Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families." Eur J Biochem **201**(2): 475-81.
- Cong, L. N., H. Chen, et al. (1997). "Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells." Mol Endocrinol **11**(13): 1881-90.
- Conradt, B. and H. R. Horvitz (1998). "The C. elegans protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9." Cell **93**(4): 519-29.
- Cory, S. (1995). "Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family." Annu Rev Immunol **13**: 513-43.
- Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." Nat Rev Cancer **2**(9): 647-56.

- Cowley, S., H. Paterson, et al. (1994). "Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells." Cell **77**(6): 841-52.
- Crompton, M. (1999). "The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death." Biochem J **341** (Pt 2): 233-49.
- Crook, N. E., R. J. Clem, et al. (1993). "An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif." J Virol **67**(4): 2168-74.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, et al. (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." Nature **378**(6559): 785-9.
- Cryns, V. L., L. Bergeron, et al. (1996). "Specific cleavage of alpha-fodrin during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by an interleukin-1beta-converting enzyme/Ced-3 protease distinct from the poly(ADP-ribose) polymerase protease." J Biol Chem **271**(49): 31277-82.
- Cutler, R. E., Jr., R. M. Stephens, et al. (1998). "Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9214-9.
- Dang, A., J. A. Frost, et al. (1998). "The MEK1 proline-rich insert is required for efficient activation of the mitogen-activated protein kinases ERK1 and ERK2 in mammalian cells." J Biol Chem **273**(31): 19909-13.
- Dang, C. V. and G. L. Semenza (1999). "Oncogenic alterations of metabolism." Trends Biochem Sci **24**(2): 68-72.
- Datta, S. R., A. Brunet, et al. (1999). "Cellular survival: a play in three Akts." Genes Dev **13**(22): 2905-27.
- Datta, S. R., H. Dudek, et al. (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." Cell **91**(2): 231-41.
- Daum, G., I. Eisenmann-Tappe, et al. (1994). "The ins and outs of Raf kinases." Trends Biochem Sci **19**(11): 474-80.
- de Groot, R. P., P. J. Coffey, et al. (1998). "Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family." Cell Signal **10**(9): 619-28.
- de Jong, D., F. A. Prins, et al. (1994). "Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells." Cancer Res **54**(1): 256-60.
- del Peso, L., M. Gonzalez-Garcia, et al. (1997). "Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt." Science **278**(5338): 687-9.
- Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." Genes Dev **13**(3): 239-52.
- Dhillon, A. S. and W. Kolch (2002). "Untying the regulation of the Raf-1 kinase." Arch Biochem Biophys **404**(1): 3-9.
- Dhillon, A. S., S. Meikle, et al. (2002). "Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation." Embo J **21**(1-2): 64-71.
- Dhillon, A. S., C. Pollock, et al. (2002). "Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259." Mol Cell Biol **22**(10): 3237-46.
- Diaz, B., D. Barnard, et al. (1997). "Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling." Mol Cell Biol **17**(8): 4509-16.
- Digby, M. R., U. Rapp, et al. (2005). "Expression of the IAP homologue ITA suppresses NGF induced differentiation and TNF alpha induced apoptosis in PC12 cells. *Under submission.*"
- Dijkers, P. F., R. H. Medema, et al. (2000). "Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1." Curr Biol **10**(19): 1201-4.
- Du, C., M. Fang, et al. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell **102**(1): 33-42.

- Du, K. and M. Montminy (1998). "CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB." *J Biol Chem* **273**(49): 32377-9.
- Dudek, H., S. R. Datta, et al. (1997). "Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt." *Science* **275**(5300): 661-5.
- Dumaz, N., Y. Light, et al. (2002). "Cyclic AMP blocks cell growth through Raf-1-dependent and Raf-1-independent mechanisms." *Mol Cell Biol* **22**(11): 3717-28.
- Duvall, E. and A. H. Wyllie (1986). "Death an the cell." *Immunol. Today* **7**: 115-119.
- Dziarski, R., Y. P. Jin, et al. (1996). "Differential activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1, ERK2, p38, and c-Jun NH2-terminal kinase mitogen-activated protein kinases by bacterial peptidoglycan." *J Infect Dis* **174**(4): 777-85.
- Earnshaw, W. C., L. M. Martins, et al. (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." *Annu Rev Biochem* **68**: 383-424.
- Ellis, R. E., J. Y. Yuan, et al. (1991). "Mechanisms and functions of cell death." *Annu Rev Cell Biol* **7**: 663-98.
- Erhardt, P., E. J. Schremser, et al. (1999). "B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway." *Mol Cell Biol* **19**(8): 5308-15.
- Eskes, R., S. Desagher, et al. (2000). "Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane." *Mol Cell Biol* **20**(3): 929-35.
- Fabian, J. R., D. K. Morrison, et al. (1993). "Requirement for Raf and MAP kinase function during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes." *J Cell Biol* **122**(3): 645-52.
- Fang, X., S. Yu, et al. (1999). "Regulation of BAD phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway." *Oncogene* **18**(48): 6635-40.
- Fedorov, L. M., O. Y. Tyrsin, et al. (2002). "Bcl-2 determines susceptibility to induction of lung cancer by oncogenic CRaf." *Cancer Res* **62**(21): 6297-303.
- Ferguson, K. M., J. M. Kavran, et al. (2000). "Structural basis for discrimination of 3-phosphoinositides by pleckstrin homology domains." *Mol Cell* **6**(2): 373-84.
- Fesik, S. W. and Y. Shi (2001). "Structural biology. Controlling the caspases." *Science* **294**(5546): 1477-8.
- Flygare, J., R. C. Armstrong, et al. (1998). "Proteolytic cleavage of HsRad51 during apoptosis." *FEBS Lett* **427**(2): 247-51.
- Freissmuth, M., M. Waldhoer, et al. (1999). "G protein antagonists." *Trends Pharmacol Sci* **20**(6): 237-45.
- Frost, J. A., H. Steen, et al. (1997). "Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins." *Embo J* **16**(21): 6426-38.
- Fruman, D. A., F. Mauvais-Jarvis, et al. (2000). "Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha." *Nat Genet* **26**(3): 379-82.
- Fujio, Y., K. Guo, et al. (1999). "Cell cycle withdrawal promotes myogenic induction of Akt, a positive modulator of myocyte survival." *Mol Cell Biol* **19**(7): 5073-82.
- Gardner, A. M., R. R. Vaillancourt, et al. (1994). "MEK-1 phosphorylation by MEK kinase, Raf, and mitogen-activated protein kinase: analysis of phosphopeptides and regulation of activity." *Mol Biol Cell* **5**(2): 193-201.
- Gatenby, R. A. (1995). "The potential role of transformation-induced metabolic changes in tumor-host interaction." *Cancer Res* **55**(18): 4151-6.
- Gervais, F. G., N. A. Thornberry, et al. (1998). "Caspases cleave focal adhesion kinase during apoptosis to generate a FRNK-like polypeptide." *J Biol Chem* **273**(27): 17102-8.
- Ghosh, S., M. J. May, et al. (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." *Annu Rev Immunol* **16**: 225-60.

- Ghosh, S., W. Q. Xie, et al. (1994). "The cysteine-rich region of raf-1 kinase contains zinc, translocates to liposomes, and is adjacent to a segment that binds GTP-ras." J Biol Chem **269**(13): 10000-7.
- Gibson, S., S. Tu, et al. (1999). "Epidermal growth factor protects epithelial cells against Fas-induced apoptosis. Requirement for Akt activation." J Biol Chem **274**(25): 17612-8.
- Gingras, A. C., S. G. Kennedy, et al. (1998). "4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway." Genes Dev **12**(4): 502-13.
- Glücksmann, A. (1950). "Cell deaths in normal vertebrate ontogeny." Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. **26**: 59-86.
- Gold, M. R., V. Duronio, et al. (1994). "Multiple cytokines activate phosphatidylinositol 3-kinase in hemopoietic cells. Association of the enzyme with various tyrosine-phosphorylated proteins." J Biol Chem **269**(7): 5403-12.
- Gotoh, I., M. Fukuda, et al. (1999). "Control of the cell morphology and the S phase entry by mitogen-activated protein kinase kinase. A regulatory role of its n-terminal region." J Biol Chem **274**(17): 11874-80.
- Gotz, R., S. Wiese, et al. (2005). "Bag1 is essential for differentiation and survival of hematopoietic and neuronal cells." Nat Neurosci **8**(9): 1169-78.
- Grandgirard, D., E. Studer, et al. (1998). "Alphaviruses induce apoptosis in Bcl-2-overexpressing cells: evidence for a caspase-mediated, proteolytic inactivation of Bcl-2." Embo J **17**(5): 1268-78.
- Grandori, C. and R. N. Eisenman (1997). "Myc target genes." Trends Biochem Sci **22**(5): 177-81.
- Green, D. R. and J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." Science **281**(5381): 1309-12.
- Greenberger, J. S., M. A. Sakakeeny, et al. (1983). "Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(10): 2931-5.
- Gross, A., J. M. McDonnell, et al. (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." Genes Dev **13**(15): 1899-911.
- Gross, A., X. M. Yin, et al. (1999). "Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death." J Biol Chem **274**(2): 1156-63.
- Grumont, R. J., I. J. Rourke, et al. (1999). "Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis." Genes Dev **13**(4): 400-11.
- Gruss, H. J. and S. K. Dower (1995). "Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas." Blood **85**(12): 3378-404.
- Guan, K. L., C. Figueroa, et al. (2000). "Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt." J Biol Chem **275**(35): 27354-9.
- Guo, S., G. Rena, et al. (1999). "Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence." J Biol Chem **274**(24): 17184-92.
- Hagemann, C. and U. R. Rapp (1999). "Isotype-specific functions of Raf kinases." Exp Cell Res **253**(1): 34-46.
- Hajdуч, E., D. R. Alessi, et al. (1998). "Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells." Diabetes **47**(7): 1006-13.

- Hamburger, V. and R. W. Oppenheim (1982). "Naturally occurring death in vertebrates." Neurosci. Comment **1**: 39-55.
- Han, M., A. Golden, et al. (1993). "C. elegans lin-45 raf gene participates in let-60 ras-stimulated vulval differentiation." Nature **363**(6425): 133-40.
- Han, Z., K. Bhalla, et al. (1999). "Cif (Cytochrome c efflux-inducing factor) activity is regulated by Bcl-2 and caspases and correlates with the activation of Bid." Mol Cell Biol **19**(2): 1381-9.
- Harada, H., B. Becknell, et al. (1999). "Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A." Mol Cell **3**(4): 413-22.
- Hartkamp, J., J. Troppmair, et al. (1999). "The JNK/SAPK activator mixed lineage kinase 3 (MLK3) transforms NIH 3T3 cells in a MEK-dependent fashion." Cancer Res **59**(9): 2195-202.
- Hausmann, G., L. A. O'Reilly, et al. (2000). "Pro-apoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-x(L)." J Cell Biol **149**(3): 623-34.
- Hawkins, C. J., S. J. Yoo, et al. (2000). "The Drosophila caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1, HID, and GRIM." J Biol Chem **275**(35): 27084-93.
- Heidecker, G., J. L. Cleveland, et al. (1989). Role of raf and myc oncogenes in signal transduction. Genes and signal transduction in multistage carcinogenesis. N. Colburn. New York, Marcel Dekker Inc.: 339-375.
- Hemmings, B. A. (1997). "Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions." Science **275**(5300): 628-30.
- Hengartner, M. O. and H. R. Horvitz (1994). "C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2." Cell **76**(4): 665-76.
- Hockenbery, D., G. Nunez, et al. (1990). "Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death." Nature **348**(6299): 334-6.
- Hoogenraad, N. J., L. A. Ward, et al. (2002). "Import and assembly of proteins into mitochondria of mammalian cells." Biochim Biophys Acta **1592**(1): 97-105.
- Howe, L. R., S. J. Leever, et al. (1992). "Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf." Cell **71**(2): 335-42.
- Hsu, H., J. Huang, et al. (1996). "TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex." Immunity **4**(4): 387-96.
- Hsu, H., H. B. Shu, et al. (1996). "TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways." Cell **84**(2): 299-308.
- Hsu, H., J. Xiong, et al. (1995). "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation." Cell **81**(4): 495-504.
- Hu, C. D., K. Kariya, et al. (1995). "Cysteine-rich region of Raf-1 interacts with activator domain of post-translationally modified Ha-Ras." J Biol Chem **270**(51): 30274-7.
- Hu, Y., L. Ding, et al. (1998). "WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation." J Biol Chem **273**(50): 33489-94.
- Huang, D. C. and A. Strasser (2000). "BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death." Cell **103**(6): 839-42.
- Huang, H. M., C. J. Huang, et al. (2000). "Mcl-1 is a common target of stem cell factor and interleukin-5 for apoptosis prevention activity via MEK/MAPK and PI-3K/Akt pathways." Blood **96**(5): 1764-71.
- Huang, W. and R. L. Erikson (1994). "Constitutive activation of Mek1 by mutation of serine phosphorylation sites." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(19): 8960-3.
- Huang, Y., Y. C. Park, et al. (2001). "Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain." Cell **104**(5): 781-90.

- Huser, M., J. Lockett, et al. (2001). "MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function." Embo J **20**(8): 1940-51.
- Jacobson, M. D., J. F. Burne, et al. (1994). "Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus." Embo J **13**(8): 1899-910.
- Janiak, F., B. Leber, et al. (1994). "Assembly of Bcl-2 into microsomal and outer mitochondrial membranes." J Biol Chem **269**(13): 9842-9.
- Jiang, X. and X. Wang (2000). "Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1." J Biol Chem **275**(40): 31199-203.
- Jones, P. F., T. Jakubowicz, et al. (1991). "Molecular cloning of a second form of rac protein kinase." Cell Regul **2**(12): 1001-9.
- Jones, P. F., T. Jakubowicz, et al. (1991). "Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(10): 4171-5.
- Jordan, B. W., D. Dinev, et al. (2001). "Neurotrophin receptor-interacting mage homologue is an inducible inhibitor of apoptosis protein-interacting protein that augments cell death." J Biol Chem **276**(43): 39985-9.
- Jost, M., T. M. Huggett, et al. (2001). "Epidermal growth factor receptor-dependent control of keratinocyte survival and Bcl-xL expression through a MEK-dependent pathway." J Biol Chem **276**(9): 6320-6.
- Kandel, E. S. and N. Hay (1999). "The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB." Exp Cell Res **253**(1): 210-29.
- Kane, L. P., V. S. Shapiro, et al. (1999). "Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase." Curr Biol **9**(11): 601-4.
- Kauffmann-Zeh, A., P. Rodriguez-Viciana, et al. (1997). "Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB." Nature **385**(6616): 544-8.
- Kelekar, A., B. S. Chang, et al. (1997). "Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL." Mol Cell Biol **17**(12): 7040-6.
- Kelekar, A. and C. B. Thompson (1998). "Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis." Trends Cell Biol **8**(8): 324-30.
- Kennedy, S. G., E. S. Kandel, et al. (1999). "Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria." Mol Cell Biol **19**(8): 5800-10.
- Kennedy, S. G., A. J. Wagner, et al. (1997). "The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal." Genes Dev **11**(6): 701-13.
- Kerkhoff, E., L. M. Fedorov, et al. (2000). "Lung-targeted expression of the c-Raf-1 kinase in transgenic mice exposes a novel oncogenic character of the wild-type protein." Cell Growth Differ **11**(4): 185-90.
- Kerkhoff, E. and U. R. Rapp (1997). "Induction of cell proliferation in quiescent NIH 3T3 cells by oncogenic c-Raf-1." Mol Cell Biol **17**(5): 2576-86.
- Kerkhoff, E. and U. R. Rapp (1998). "Cell cycle targets of Ras/Raf signalling." Oncogene **17**(11 Reviews): 1457-62.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.
- King, A. J., H. Sun, et al. (1998). "The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338." Nature **396**(6707): 180-3.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, et al. (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." Embo J **14**(22): 5579-88.
- Kischkel, F. C., D. A. Lawrence, et al. (2000). "Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5." Immunity **12**(6): 611-20.

- Kischkel, F. C., D. A. Lawrence, et al. (2001). "Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8." *J Biol Chem* **276**(49): 46639-46.
- Kitada, S., I. M. Pedersen, et al. (2002). "Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies." *Oncogene* **21**(21): 3459-74.
- Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzel, et al. (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." *Science* **275**(5303): 1132-6.
- Kohn, A. D., S. A. Summers, et al. (1996). "Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation." *J Biol Chem* **271**(49): 31372-8.
- Kolch, W., G. Heidecker, et al. (1993). "Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation." *Nature* **364**(6434): 249-52.
- Kolch, W., G. Heidecker, et al. (1991). "Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH/3T3 cells." *Nature* **349**(6308): 426-8.
- Konishi, H., H. Matsuzaki, et al. (1996). "Activation of RAC-protein kinase by heat shock and hyperosmolarity stress through a pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(15): 7639-43.
- Krajewski, S., S. Tanaka, et al. (1993). "Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes." *Cancer Res* **53**(19): 4701-14.
- Kulik, G., A. Klippel, et al. (1997). "Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt." *Mol Cell Biol* **17**(3): 1595-606.
- Kurada, P. and K. White (1998). "Ras promotes cell survival in Drosophila by downregulating hid expression." *Cell* **95**(3): 319-29.
- Kuwana, T., M. R. Mackey, et al. (2002). "Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane." *Cell* **111**(3): 331-42.
- Lazebnik, Y. A., A. Takahashi, et al. (1995). "Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20): 9042-6.
- Le Mellay, V., R. Houben, et al. (2002). "Regulation of glycolysis by Raf protein serine/threonine kinases." *Adv Enzyme Regul* **42**: 317-32.
- Le Mellay, V., J. Troppmair, et al. (2002). "Negative regulation of mitochondrial VDAC channels by C-Raf kinase." *BMC Cell Biol* **3**(1): 14.
- Lenormand, P., C. Sardet, et al. (1993). "Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts." *J Cell Biol* **122**(5): 1079-88.
- Leu, C. M., C. Chang, et al. (2000). "Epidermal growth factor (EGF) suppresses staurosporine-induced apoptosis by inducing mcl-1 via the mitogen-activated protein kinase pathway." *Oncogene* **19**(13): 1665-75.
- Levkau, B., B. Herren, et al. (1998). "Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis." *J Exp Med* **187**(4): 579-86.
- Lewis, T. S., P. S. Shapiro, et al. (1998). "Signal transduction through MAP kinase cascades." *Adv Cancer Res* **74**: 49-139.
- Li, H., H. Zhu, et al. (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." *Cell* **94**(4): 491-501.
- Li, W., H. Chong, et al. (2001). "Function of the Rho family GTPases in Ras-stimulated Raf activation." *J Biol Chem* **276**(37): 34728-37.
- Li, W., M. Melnick, et al. (1998). "Dual function of Ras in Raf activation." *Development* **125**(24): 4999-5008.

- Lietzke, S. E., S. Bose, et al. (2000). "Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains." *Mol Cell* **6**(2): 385-94.
- Lindsten, T., A. J. Ross, et al. (2000). "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." *Mol Cell* **6**(6): 1389-99.
- Liu, X., H. Zou, et al. (1997). "DFP, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis." *Cell* **89**(2): 175-84.
- Liu, Y. Z., L. M. Boxer, et al. (1999). "Activation of the Bcl-2 promoter by nerve growth factor is mediated by the p42/p44 MAPK cascade." *Nucleic Acids Res* **27**(10): 2086-90.
- Luo, X., I. Budihardjo, et al. (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." *Cell* **94**(4): 481-90.
- Lutter, M., M. Fang, et al. (2000). "Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria." *Nat Cell Biol* **2**(10): 754-61.
- Majewski, M., M. Nieborowska-Skorska, et al. (1999). "Activation of mitochondrial Raf-1 is involved in the antiapoptotic effects of Akt." *Cancer Res* **59**(12): 2815-9.
- Mansour, S. J., W. T. Matten, et al. (1994). "Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase." *Science* **265**(5174): 966-70.
- Mansour, S. J., K. A. Resing, et al. (1994). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphorylation of MAP kinase kinase: determination of phosphorylation sites by mass spectrometry and site-directed mutagenesis." *J Biochem (Tokyo)* **116**(2): 304-14.
- Marais, R., Y. Light, et al. (1995). "Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation." *Embo J* **14**(13): 3136-45.
- Marais, R., Y. Light, et al. (1997). "Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases." *J Biol Chem* **272**(7): 4378-83.
- Marte, B. M., P. Rodriguez-Viciana, et al. (1997). "R-Ras can activate the phosphoinositide 3-kinase but not the MAP kinase arm of the Ras effector pathways." *Curr Biol* **7**(1): 63-70.
- Marzo, I., C. Brenner, et al. (1998). "Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis." *Science* **281**(5385): 2027-31.
- Marzo, I., C. Brenner, et al. (1998). "The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins." *J Exp Med* **187**(8): 1261-71.
- Mashima, T., M. Naito, et al. (1997). "Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis." *Oncogene* **14**(9): 1007-12.
- Mason, C. S., C. J. Springer, et al. (1999). "Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation." *Embo J* **18**(8): 2137-48.
- McCarthy, S. A., D. Chen, et al. (1997). "Rapid phosphorylation of Ets-2 accompanies mitogen-activated protein kinase activation and the induction of heparin-binding epidermal growth factor gene expression by oncogenic Raf-1." *Mol Cell Biol* **17**(5): 2401-12.
- McCarthy, S. A., M. L. Samuels, et al. (1995). "Rapid induction of heparin-binding epidermal growth factor/diphtheria toxin receptor expression by Raf and Ras oncogenes." *Genes Dev* **9**(16): 1953-64.
- McCormick, F. (1993). "Signal transduction. How receptors turn Ras on." *Nature* **363**(6424): 15-6.
- McDonnell, T. J., N. Deane, et al. (1989). "bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation." *Cell* **57**(1): 79-88.



- Medema, J. P., C. Scaffidi, et al. (1997). "FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC)." *Embo J* **16**(10): 2794-804.
- Meier, R., D. R. Alessi, et al. (1997). "Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta." *J Biol Chem* **272**(48): 30491-7.
- Metzstein, M. M., G. M. Stanfield, et al. (1998). "Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future." *Trends Genet* **14**(10): 410-6.
- Mikula, M., M. Schreiber, et al. (2001). "Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene." *Embo J* **20**(8): 1952-62.
- Mineo, C., R. G. Anderson, et al. (1997). "Physical association with ras enhances activation of membrane-bound raf (RafCAAX)." *J Biol Chem* **272**(16): 10345-8.
- Mischak, H., T. Seitz, et al. (1996). "Negative regulation of Raf-1 by phosphorylation of serine 621." *Mol Cell Biol* **16**(10): 5409-18.
- Mittl, P. R., S. Di Marco, et al. (1997). "Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone." *J Biol Chem* **272**(10): 6539-47.
- Miyashita, T. and J. C. Reed (1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." *Cell* **80**(2): 293-9.
- Moelling, K., K. Schad, et al. (2002). "Regulation of Raf-Akt Cross-talk." *J Biol Chem* **277**(34): 31099-106.
- Morgenstern, J. P. and H. Land (1990). "Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line." *Nucleic Acids Res* **18**(12): 3587-96.
- Moriishi, K., D. C. Huang, et al. (1999). "Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(17): 9683-8.
- Morrison, D. K. and R. E. Cutler (1997). "The complexity of Raf-1 regulation." *Curr Opin Cell Biol* **9**(2): 174-9.
- Motoyama, N., F. Wang, et al. (1995). "Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice." *Science* **267**(5203): 1506-10.
- Muchmore, S. W., M. Sattler, et al. (1996). "X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death." *Nature* **381**(6580): 335-41.
- Mulcahy, L. S., M. R. Smith, et al. (1985). "Requirement for ras proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells." *Nature* **313**(5999): 241-3.
- Muzio, M., B. R. Stockwell, et al. (1998). "An induced proximity model for caspase-8 activation." *J Biol Chem* **273**(5): 2926-30.
- Nakano, K. and K. H. Vousden (2001). "PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53." *Mol Cell* **7**(3): 683-94.
- Nakatani, K., H. Sakaue, et al. (1999). "Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site." *Biochem Biophys Res Commun* **257**(3): 906-10.
- Naumann, U., A. Hoffmeyer, et al. (1996). Raf protein serin/threonine kinases. *Protein Phosphorylation*. Weinheim, VCH.
- Neshat, M. S., A. B. Raitano, et al. (2000). "The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf." *Mol Cell Biol* **20**(4): 1179-86.
- Nicholson, D. W. and N. A. Thornberry (1997). "Caspases: killer proteases." *Trends Biochem Sci* **22**(8): 299-306.
- Nicholson, K. M. and N. G. Anderson (2002). "The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy." *Cell Signal* **14**(5): 381-95.
- Nishida, Y., Y. H. Inoue, et al. (1996). "The Raf/MAP kinase cascade in cell cycle regulation and differentiation in *Drosophila*." *Cell Struct Funct* **21**(5): 437-44.

- Norris, J. L. and A. S. Baldwin, Jr. (1999). "Oncogenic Ras enhances NF-kappaB transcriptional activity through Raf-dependent and Raf-independent mitogen-activated protein kinase signaling pathways." *J Biol Chem* **274**(20): 13841-6.
- Oda, E., R. Ohki, et al. (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." *Science* **288**(5468): 1053-8.
- Ogilvy, S., D. Metcalf, et al. (1999). "Constitutive Bcl-2 expression throughout the hematopoietic compartment affects multiple lineages and enhances progenitor cell survival." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26): 14943-8.
- Orth, K., A. M. Chinnaiyan, et al. (1996). "The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A." *J Biol Chem* **271**(28): 16443-6.
- Otilie, S., J. L. Diaz, et al. (1997). "Dimerization properties of human BAD. Identification of a BH-3 domain and analysis of its binding to mutant BCL-2 and BCL-XL proteins." *J Biol Chem* **272**(49): 30866-72.
- Parry, R., G. Smith, et al. (1997). "Activation of the PI3K effector protein kinase B following ligation of CD28 or Fas." *Biochem Soc Trans* **25**(4): S589.
- Pearson, G., F. Robinson, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." *Endocr Rev* **22**(2): 153-83.
- Pritchard, C. A., L. Bolin, et al. (1996). "Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene." *Curr Biol* **6**(5): 614-7.
- Pugazhenth, S., A. Nesterova, et al. (2000). "Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein." *J Biol Chem* **275**(15): 10761-6.
- Puthalakath, H., D. C. Huang, et al. (1999). "The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex." *Mol Cell* **3**(3): 287-96.
- Puthalakath, H., A. Villunger, et al. (2001). "Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis." *Science* **293**(5536): 1829-32.
- Raingeaud, J., S. Gupta, et al. (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." *J Biol Chem* **270**(13): 7420-6.
- Rao, L., D. Perez, et al. (1996). "Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis." *J Cell Biol* **135**(6 Pt 1): 1441-55.
- Rapp, U. R., J. L. Cleveland, et al. (1985). "Rapid induction of hemopoietic neoplasms in newborn mice by a raf(mil)/myc recombinant murine retrovirus." *J Virol* **55**(1): 23-33.
- Rapp, U. R., M. D. Goldsborough, et al. (1983). "Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(14): 4218-22.
- Rapp, U. R., G. Heidecker, et al. (1988). "raf family serine/threonine protein kinases in mitogen signal transduction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **53 Pt 1**: 173-84.
- Rapp, U. R., U. Rennefahrt, et al. (2004). "Bcl-2 proteins: master switches at the intersection of death signaling and the survival control by Raf kinases." *Biochim Biophys Acta* **1644**(2-3): 149-58.
- Rapp, U. R., J. Troppmair, et al. (1990). "Role of raf-1 protein kinase in IL-3 and GM-CSF-mediated signal transduction." *Curr Top Microbiol Immunol* **166**: 129-39.
- Rebollo, A., D. Perez-Sala, et al. (1999). "Bcl-2 differentially targets K-, N-, and H-Ras to mitochondria in IL-2 supplemented or deprived cells: implications in prevention of apoptosis." *Oncogene* **18**(35): 4930-9.
- Reed, J. C. (1998). "Bcl-2 family proteins." *Oncogene* **17**(25): 3225-36.

- Renatus, M., H. R. Stennicke, et al. (2001). "Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(25): 14250-5.
- Reusch, H. P., S. Zimmermann, et al. (2001). "Regulation of Raf by Akt controls growth and differentiation in vascular smooth muscle cells." *J Biol Chem* **276**(36): 33630-7.
- Rheaume, E., L. Y. Cohen, et al. (1997). "The large subunit of replication factor C is a substrate for caspase-3 in vitro and is cleaved by a caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis." *Embo J* **16**(21): 6346-54.
- Riedl, S. J., M. Renatus, et al. (2001). "Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP." *Cell* **104**(5): 791-800.
- Robinson, M. J., S. A. Stippes, et al. (1998). "A constitutively active and nuclear form of the MAP kinase ERK2 is sufficient for neurite outgrowth and cell transformation." *Curr Biol* **8**(21): 1141-50.
- Romashkova, J. A. and S. S. Makarov (1999). "NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling." *Nature* **401**(6748): 86-90.
- Rommel, C., B. A. Clarke, et al. (1999). "Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt." *Science* **286**(5445): 1738-41.
- Rossomando, A. J., P. Dent, et al. (1994). "Mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MKK1) is negatively regulated by threonine phosphorylation." *Mol Cell Biol* **14**(3): 1594-602.
- Rotonda, J., D. W. Nicholson, et al. (1996). "The three-dimensional structure of apopain/ CPP32, a key mediator of apoptosis." *Nat Struct Biol* **3**(7): 619-25.
- Sakahira, H., M. Enari, et al. (1998). "Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis." *Nature* **391**(6662): 96-9.
- Saleh, A., S. M. Srinivasula, et al. (1999). "Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation." *J Biol Chem* **274**(25): 17941-5.
- Salomoni, P., M. A. Wasik, et al. (1998). "Expression of constitutively active Raf-1 in the mitochondria restores antiapoptotic and leukemogenic potential of a transformation-deficient BCR/ABL mutant." *J Exp Med* **187**(12): 1995-2007.
- Salvesen, G. S. and C. S. Duckett (2002). "IAP proteins: blocking the road to death's door." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(6): 401-10.
- Sattler, M., H. Liang, et al. (1997). "Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis." *Science* **275**(5302): 983-6.
- Schaap, D., J. van der Wal, et al. (1993). "A dominant-negative mutant of raf blocks mitogen-activated protein kinase activation by growth factors and oncogenic p21ras." *J Biol Chem* **268**(27): 20232-6.
- Schaeffer, H. J., A. D. Catling, et al. (1998). "MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade." *Science* **281**(5383): 1668-71.
- Scheid, M. P. and V. Duronio (1998). "Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/akt: involvement of MEK upstream of Bad phosphorylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7439-44.
- Scheid, M. P. and J. R. Woodgett (2003). "Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt." *FEBS Lett* **546**(1): 108-12.
- Schlessinger, J. (1993). "How receptor tyrosine kinases activate Ras." *Trends Biochem Sci* **18**(8): 273-5.
- Schonwasser, D. C., R. M. Marais, et al. (1998). "Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes." *Mol Cell Biol* **18**(2): 790-8.
- Schulze, A., K. Lehmann, et al. (2001). "Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells." *Genes Dev* **15**(8): 981-94.

- Schurmann, A., A. F. Mooney, et al. (2000). "p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis." *Mol Cell Biol* **20**(2): 453-61.
- Schwab, B. L., M. Leist, et al. (1998). "Selective proteolysis of the nuclear replication factor MCM3 in apoptosis." *Exp Cell Res* **238**(2): 415-21.
- Scott, P. H., G. J. Brunn, et al. (1998). "Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7772-7.
- Sentman, C. L., J. R. Shutter, et al. (1991). "bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes." *Cell* **67**(5): 879-88.
- Sherr, C. J. (1994). "G1 phase progression: cycling on cue." *Cell* **79**(4): 551-5.
- Shi, Y. (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." *Mol Cell* **9**(3): 459-70.
- Shim, H., C. Dolde, et al. (1997). "c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(13): 6658-63.
- Shimizu, S., T. Ide, et al. (2000). "Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c." *J Biol Chem* **275**(16): 12321-5.
- Shimizu, S., Y. Matsuoka, et al. (2001). "Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells." *J Cell Biol* **152**(2): 237-50.
- Shimizu, S., M. Narita, et al. (1999). "Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC." *Nature* **399**(6735): 483-7.
- Shimizu, S. and Y. Tsujimoto (2000). "Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2): 577-82.
- Sithanandam, G., W. Kolch, et al. (1990). "Complete coding sequence of a human B-raf cDNA and detection of B-raf protein kinase with isozyme specific antibodies." *Oncogene* **5**(12): 1775-80.
- Skorski, T., A. Bellacosa, et al. (1997). "Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway." *Embo J* **16**(20): 6151-61.
- Slupsky, J. R., C. K. Weber, et al. (1998). Raf-dependent signaling pathways in cell growth and differentiation. *Cell Growth and Oncogenesis*. D. K. P. Bannasch, S. Papa and J.M. Tager. Basel, Birkhäuser Verlag.
- Smith, C. A., T. Farrar, et al. (1994). "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death." *Cell* **76**(6): 959-62.
- Songyang, Z., D. Baltimore, et al. (1997). "Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11345-50.
- Sozeri, O., K. Vollmer, et al. (1992). "Activation of the c-Raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation." *Oncogene* **7**(11): 2259-62.
- Sprick, M. R., M. A. Weigand, et al. (2000). "FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2." *Immunity* **12**(6): 599-609.
- Srinivasula, S. M., P. Datta, et al. (2000). "Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway." *J Biol Chem* **275**(46): 36152-7.
- Srinivasula, S. M., R. Hegde, et al. (2001). "A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis." *Nature* **410**(6824): 112-6.

- Staal, G. and R. G. (1991). Pyruvate kinase in selected human tumors. Biochemical and molecular aspects of selected cancer. P. T. Pretlow TG. San Diego, Academic Press: 313-37.
- Staal, S. P., J. W. Hartley, et al. (1977). "Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(7): 3065-7.
- Stehlik, C., R. de Martin, et al. (1998). "Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis." J Exp Med **188**(1): 211-6.
- Steinberg, P., A. Klingelhoffer, et al. (1999). "Expression of pyruvate kinase M2 in preneoplastic hepatic foci of N-nitrosomorpholine-treated rats." Virchows Arch **434**(3): 213-20.
- Stokoe, D., S. G. Macdonald, et al. (1994). "Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane." Science **264**(5164): 1463-7.
- Storm, S. M., J. L. Cleveland, et al. (1990). "Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues." Oncogene **5**(3): 345-51.
- Strasser, A., A. W. Harris, et al. (1991). "bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship." Cell **67**(5): 889-99.
- Strasser, A., D. C. Huang, et al. (1997). "The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourigenesis and resistance to chemotherapy." Biochim Biophys Acta **1333**(2): F151-78.
- Strasser, A., S. Whittingham, et al. (1991). "Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(19): 8661-5.
- Sun, H., A. J. King, et al. (2000). "Regulation of the protein kinase Raf-1 by oncogenic Ras through phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42/Rac and Pak." Curr Biol **10**(5): 281-4.
- Sutor, S. L., B. T. Vroman, et al. (1999). "A phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway that differentially regulates c-Raf and A-Raf." J Biol Chem **274**(11): 7002-10.
- Suzuki, M., R. J. Youle, et al. (2000). "Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization." Cell **103**(4): 645-54.
- Takayama, S., T. Sato, et al. (1995). "Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity." Cell **80**(2): 279-84.
- Tanti, J. F., S. Grillo, et al. (1997). "Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes." Endocrinology **138**(5): 2005-10.
- Tartaglia, L. A., T. M. Ayres, et al. (1993). "A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death." Cell **74**(5): 845-53.
- Thornberry, N. A., T. A. Rano, et al. (1997). "A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis." J Biol Chem **272**(29): 17907-11.
- Thorson, J. A., L. W. Yu, et al. (1998). "14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity." Mol Cell Biol **18**(9): 5229-38.
- Tolwinski, N. S., P. S. Shapiro, et al. (1999). "Nuclear localization of mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MKK1) is promoted by serum stimulation and G2-M progression. Requirement for phosphorylation at the activation lip and signaling downstream of MKK." J Biol Chem **274**(10): 6168-74.
- Treinius, I., H. F. Paterson, et al. (1999). "Activated MEK stimulates expression of AP-1 components independently of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) but requires a PI3-kinase signal To stimulate DNA synthesis." Mol Cell Biol **19**(1): 321-9.
- Troppmair, J., J. T. Bruder, et al. (1992). "Ras controls coupling of growth factor receptors and protein kinase C in the membrane to Raf-1 and B-Raf protein serine kinases in the cytosol." Oncogene **7**(9): 1867-73.

- Troppmair, J., J. T. Bruder, et al. (1994). "Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation by oncogenes, serum, and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate requires Raf and is necessary for transformation." J Biol Chem **269**(9): 7030-5.
- Troppmair, J., J. Hartkamp, et al. (1998). "Activation of NF-kappa B by oncogenic Raf in HEK 293 cells occurs through autocrine recruitment of the stress kinase cascade." Oncogene **17**(6): 685-90.
- Troppmair, J. and U. R. Rapp (2003). "Raf and the road to cell survival: a tale of bad spells, ring bearers and detours." Biochem Pharmacol **66**(8): 1341-5.
- Tsujimoto, Y., L. R. Finger, et al. (1984). "Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation." Science **226**(4678): 1097-9.
- Tzivion, G. and J. Avruch (2002). "14-3-3 Proteins: Active Cofactors in Cellular Regulation by Serine/Threonine Phosphorylation." J. Biol. Chem. **277**(5): 3061-3064.
- Tzivion, G., Z. Luo, et al. (1998). "A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity." Nature **394**(6688): 88-92.
- Ubeda, M. and J. F. Habener (1997). "The large subunit of the DNA replication complex C (DSEB/RF-C140) cleaved and inactivated by caspase-3 (CPP32/YAMA) during Fas-induced apoptosis." J Biol Chem **272**(31): 19562-8.
- Ueda, Y., S. Hirai, et al. (1996). "Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf." J Biol Chem **271**(38): 23512-9.
- Vale, T., T. T. Ngo, et al. (2001). "Raf-induced transformation requires an interleukin 1 autocrine loop." Cancer Res **61**(2): 602-7.
- Vander Heiden, M. G. and C. B. Thompson (1999). "Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?" Nat Cell Biol **1**(8): E209-16.
- Vanhaesebroeck, B. and D. R. Alessi (2000). "The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB." Biochem J **346 Pt 3**: 561-76.
- Vaux, D. L., S. Cory, et al. (1988). "Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells." Nature **335**(6189): 440-2.
- Vaux, D. L., I. L. Weissman, et al. (1992). "Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2." Science **258**(5090): 1955-7.
- Veis, D. J., C. M. Sorenson, et al. (1993). "Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair." Cell **75**(2): 229-40.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, et al. (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." Cell **102**(1): 43-53.
- Vlahos, C. J., W. F. Matter, et al. (1994). "A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)." J Biol Chem **269**(7): 5241-8.
- Voogd, T. E., E. L. Vansterkenburg, et al. (1993). "Recent research on the biological activity of suramin." Pharmacol Rev **45**(2): 177-203.
- Walker, K. S., M. Deak, et al. (1998). "Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha." Biochem J **331 (Pt 1)**: 299-308.
- Walker, N. P., R. V. Talanian, et al. (1994). "Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer." Cell **78**(2): 343-52.
- Wang, C. Y., D. C. Guttridge, et al. (1999). "NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis." Mol Cell Biol **19**(9): 5923-9.

- Wang, C. Y., M. W. Mayo, et al. (1998). "NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation." *Science* **281**(5383): 1680-3.
- Wang, H. G., T. Miyashita, et al. (1994). "Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase." *Oncogene* **9**(9): 2751-6.
- Wang, H. G., U. R. Rapp, et al. (1996). "Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria." *Cell* **87**(4): 629-38.
- Wang, H. G., S. Takayama, et al. (1996). "Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(14): 7063-8.
- Wang, J. M., J. R. Chao, et al. (1999). "The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB." *Mol Cell Biol* **19**(9): 6195-206.
- Wang, K., X. M. Yin, et al. (1996). "BID: a novel BH3 domain-only death agonist." *Genes Dev* **10**(22): 2859-69.
- Wang, S., M. Miura, et al. (1998). "Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE." *Cell* **92**(4): 501-9.
- Wang, X. (2001). "The expanding role of mitochondria in apoptosis." *Genes Dev* **15**(22): 2922-33.
- Warburg, O. (1931). *The Metabolism of Tumours*, Richard P. Smith Inc.
- Watt, W., K. A. Koeplinger, et al. (1999). "The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis." *Structure Fold Des* **7**(9): 1135-43.
- Wei, M. C., T. Lindsten, et al. (2000). "tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c." *Genes Dev* **14**(16): 2060-71.
- Wei, M. C., W. X. Zong, et al. (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." *Science* **292**(5517): 727-30.
- Wei, Y., T. Fox, et al. (2000). "The structures of caspases-1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and inhibitor selectivity." *Chem Biol* **7**(6): 423-32.
- Wen, L. P., J. A. Fahrni, et al. (1997). "Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis." *J Biol Chem* **272**(41): 26056-61.
- Weston, C. R., K. Balmanno, et al. (2003). "Activation of ERK1/2 by deltaRaf-1:ER\* represses Bim expression independently of the JNK or PI3K pathways." *Oncogene* **22**(9): 1281-93.
- Widmann, C., S. Gibson, et al. (1998). "Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals." *J Biol Chem* **273**(12): 7141-7.
- Wilson, K. P., J. A. Black, et al. (1994). "Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme." *Nature* **370**(6487): 270-5.
- Winston, L. A. and T. Hunter (1995). "JAK2, Ras, and Raf are required for activation of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase by growth hormone." *J Biol Chem* **270**(52): 30837-40.
- Wittinghofer, A. and N. Nassar (1996). "How Ras-related proteins talk to their effectors." *Trends Biochem Sci* **21**(12): 488-91.
- Wojnowski, L., L. F. Stancato, et al. (1998). "Craf-1 protein kinase is essential for mouse development." *Mech Dev* **76**(1-2): 141-9.
- Wojnowski, L., A. M. Zimmer, et al. (1997). "Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice." *Nat Genet* **16**(3): 293-7.
- Woscholski, R. and P. J. Parker (1997). "Inositol lipid 5-phosphatases--traffic signals and signal traffic." *Trends Biochem Sci* **22**(11): 427-31.
- Wu, J., P. Dent, et al. (1993). "Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate." *Science* **262**(5136): 1065-9.

- Xia, K., N. K. Mukhopadhyay, et al. (1996). "The cytokine-activated tyrosine kinase JAK2 activates Raf-1 in a p21ras-dependent manner." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11681-6.
- Xu, H. and M. Goldfarb (2001). "Multiple effector domains within SNT1 coordinate ERK activation and neuronal differentiation of PC12 cells." J Biol Chem **276**(16): 13049-56.
- Xu, S., D. Robbins, et al. (1995). "MEKK1 phosphorylates MEK1 and MEK2 but does not cause activation of mitogen-activated protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(15): 6808-12.
- Xue, D. and H. R. Horvitz (1997). "Caenorhabditis elegans CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor." Nature **390**(6657): 305-8.
- Yan, M. and D. J. Templeton (1994). "Identification of 2 serine residues of MEK-1 that are differentially phosphorylated during activation by raf and MEK kinase." J Biol Chem **269**(29): 19067-73.
- Yang, E. and S. J. Korsmeyer (1996). "Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death." Blood **88**(2): 386-401.
- Yang, J., P. Cron, et al. (2002). "Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP." Nat Struct Biol **9**(12): 940-4.
- Yang, J., P. Cron, et al. (2002). "Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation." Mol Cell **9**(6): 1227-40.
- Yang, J., X. Liu, et al. (1997). "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked." Science **275**(5303): 1129-32.
- Yeung, K., T. Seitz, et al. (1999). "Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP." Nature **401**(6749): 173-7.
- Yin, X. M., K. Wang, et al. (1999). "Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis." Nature **400**(6747): 886-91.
- Younes, M., L. V. Lechago, et al. (1996). "Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers." Cancer Res **56**(5): 1164-7.
- Yu, J., L. Zhang, et al. (2001). "PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells." Mol Cell **7**(3): 673-82.
- Yuan, J., S. Shaham, et al. (1993). "The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme." Cell **75**(4): 641-52.
- Yuryev, A., M. Ono, et al. (2000). "Isoform-specific localization of A-RAF in mitochondria." Mol Cell Biol **20**(13): 4870-8.
- Zamzami, N. and G. Kroemer (2001). "The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(1): 67-71.
- Zamzami, N., S. A. Susin, et al. (1996). "Mitochondrial control of nuclear apoptosis." J Exp Med **183**(4): 1533-44.
- Zha, J., H. Harada, et al. (1997). "BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity." J Biol Chem **272**(39): 24101-4.
- Zhang, X. F., J. Settleman, et al. (1993). "Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1." Nature **364**(6435): 308-13.
- Zheng, C. F. and K. L. Guan (1994). "Cytoplasmic localization of the mitogen-activated protein kinase activator MEK." J Biol Chem **269**(31): 19947-52.
- Zhong, J., J. Troppmair, et al. (2001). "Independent control of cell survival by Raf-1 and Bcl-2 at the mitochondria." Oncogene **20**(35): 4807-16.
- Zhou, X. Y., Y. Yashiro-Ohtani, et al. (2000). "CD5 costimulation up-regulates the signaling to extracellular signal-regulated kinase activation in CD4+CD8+ thymocytes and supports their differentiation to the CD4 lineage." J Immunol **164**(3): 1260-8.



- Zhu, W., A. Cowie, et al. (1996). "Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types." Embo J **15**(16): 4130-41.
- Zimmermann, K. C., C. Bonzon, et al. (2001). "The machinery of programmed cell death." Pharmacol Ther **92**(1): 57-70.
- Zimmermann, S. and K. Moelling (1999). "Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B)." Science **286**(5445): 1741-4.
- Zong, W. X., L. C. Edelstein, et al. (1999). "The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis." Genes Dev **13**(4): 382-7.
- Zong, W. X., T. Lindsten, et al. (2001). "BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak." Genes Dev **15**(12): 1481-6.
- Zou, H., W. J. Henzel, et al. (1997). "Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3." Cell **90**(3): 405-13.
- Zou, H., Y. Li, et al. (1999). "An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9." J Biol Chem **274**(17): 11549-56.

## Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Ulf R. Rapp, der mir die Möglichkeit gab meine Promotion in seinem Institut durchzuführen. Er eröffnete mir die Chance in einem kreativen und internationalen Umfeld zu arbeiten und zeigte mir wie lebhaft und fruchtbar Wissenschaft an einem solchen Ort ist.

Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Martini danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Ich danke Jörg Hartkamp für die vielen gemeinsamen Stunden an der Bank, die Beantwortung einer jeden Frage, die musikalische Untermalung im Labor, die Kaffeepausen und die Zelebration des Wochenabschlusses am Institutsbrunnen.

Petra Lorenz sei gedankt, dass sie uns allen so viel Arbeit abgenommen hat.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Jakob Troppmair, der mir ein exzellenter Betreuer war. Ich danke ihm für seine unerschöpfliche Geduld – wenn mal wieder etwas „suboptimal“ lief – seine Erklärungen, die inspirierenden Diskussionen, den Glauben und die Zuversicht in meine Arbeit. Er ist für mich mehr als nur der Betreuer meiner Promotion. Er bewies stets Gespür für Sorgen und Nöte jenseits der Grenzen des Labors und stand mir mit Rat und Tat weit über die Zeit der Promotion zur Seite. Er ist für mich Lehrer, Mentor und ein großes Vorbild.

Meinen Eltern möchte ich für ihren Glauben an mich, ihre Geduld, ihre Unterstützung, Kraft und Liebe, die sie mir in einer Zeit gaben, die auch ihnen viel Kraft abverlangte, danken. Gedankt sei auch meiner Schwester Constanze. Meiner kleinen Schwester, die mir, ihrem großen Bruder, durch Vorbild lehrte die Schicksale des Lebens zu akzeptieren und ihnen mit noch größerer Energie, Durchhaltevermögen und Lebensfreude zu begegnen. Du hast mir den Weg in die Pädiatrie gewiesen und mir gezeigt welche wundervoll starke Menschen Kinder sind. Du bist ein Teil von mir und wirst mir ewig in Erinnerung bleiben!

Schließlich möchte ich meiner Freundin Danielle Wenemoser danken. Deine Energie und Dein Schaffensdrang gaben mir die Kraft ruhendes in Angriff zu nehmen, Deine Liebe ermutigt mich mich neuen Herausforderungen zu stellen.