

**Aus dem Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Ulf R. Rapp

Die Rolle von NF- κ B und MEK in der Apoptosesuppression durch Raf

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Wolfgang Tränkenschuh

aus Erlangen

Würzburg, Februar 2009

Referentenblatt:

Referent: Professor Dr. med. Ulf R. Rapp

Koreferent: Professor Dr. med. Gilbert Schönfelder

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 03.07.2009

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis:

1. ÜBERLEBENSKONTROLLE DURCH DIE SERIN-/THREONINKINASE C-RAF	1
1.1. Einführung	1
1.1.1. Definition	1
1.1.2. Historischer Hintergrund	1
1.1.3. Auslöser der Apoptose	2
1.1.4. Morphologische Veränderungen der Zelle	3
1.1.5. Physiologische und pathologische Bedeutung	4
1.2. Regulation der Apoptose	6
1.2.1. Negative Regulation, Exekution	6
1.2.1.1. Todesrezeptoren	6
1.2.1.2. Caspasen	7
1.2.1.3. Apoptotic protease-activating factor 1	9
1.2.1.4. Proapoptotische Bcl-2 Moleküle	10
1.2.1.5. Second mitochondrial protein activating caspases/direct IAP binding protein with low pI	13
1.2.1.6. Neurotrophin receptor-interacting MAGE homologue	13
1.2.2. Positive Regulation	14
1.2.2.1. Inhibitors of apoptosis Proteine (IAPs)	14
1.2.2.2. Antiapoptotische Bcl-2 Moleküle	15
1.2.3. Signalwege	16
1.2.3.1. Die zytoplasmatische (Ras-Raf-MEK-ERK) Kaskade	16
1.2.3.2. Ras-PI3 Kinase-PKB/Akt	19
1.2.3.3. Januskinasen und Signal transducers and activators of transcription	22
1.2.3.4. NF- κ B	23
1.3. Ziel der Arbeit: Die Rolle von NF-κB und MEK in der Apoptosesuppression durch Raf	26
2. MATERIAL UND METHODEN	28
2.1. Material	28
2.1.1. Geräte und Chemikalien	28

2.1.2. Antikörper und Sekundärantikörper	29
2.1.3. Zellkulturmedien und Zelllinien	30
2.2. Methoden	31
2.2.1. Zellkultur	31
2.2.1.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen	31
2.2.1.2. Anreichern lebender Zellen mit Hilfe von Lympholyte-M Medium	32
2.2.1.3. Infektion	32
2.2.1.3.1. Herstellung von Virus-Überstand	33
2.2.1.3.2. Spininfektion	33
2.2.1.3.3. Selektion	34
2.2.1.4. Survival assay	34
2.2.1.5. Kokultur-Experiment	35
2.2.1.6. Trypanblau-Färbung	36
2.2.2. Proteindetektion	36
2.2.2.1. Western Blotting	36
2.2.2.2. Immunoblot	40
2.2.3. Fluorescence-activated cell sorting	41
2.2.3.1. Propidiumiodid-Färbung	42
2.2.3.2. Green fluorescent protein-Markierung	43
2.2.4. Electrophoretic mobility shift assay	43
2.2.5. Riboquant™	44
3. ERGEBNISSE	45
3.1. Apoptosesuppression durch C-Raf: die Rolle von NF-κB	45
3.1.1. Raf-Konstrukte	45
3.1.1.1. Expressionskontrolle	46
3.1.1.2. Untersuchung der NF-κB Aktivitäten in unterschiedlichen 32D Zellpools	48
3.1.2. Bedeutung von aktiviertem NF-κB für das Überleben von Raf-geschützten Zellen	50
3.2. Experimente mit Faktor-unabhängigen Zellen	53
3.2.1. Pharmakologische Inhibition von MEK und PI3-Kinase	53
3.2.2. Ansprechen der FID-Zellen auf IL-3	54

3.2.3. Transkription von Zytokingenen in FID-Zellen	55
3.2.4. Kokultorexperiment von FID- und parental 32D-GFP-Zellen	56
4. DISKUSSION	60
4.1. Raf, NF- κ B und Zellüberleben	60
4.2. MEK-induzierte Faktorunabhängigkeit in 32D-Zellen	63
4.3. Raf/NF- κ B/MEK und die Raf Transformation	63
5. ZUSAMMENFASSUNG	67
6. LITERATURVERZEICHNIS	68
7. ABKÜRZUNGEN	90

1. Überlebenskontrolle durch die Serin-/Threoninkinase C-Raf

1.1. Einführung

1.1.1. Definition

Die Apoptose oder auch programmierter Zelltod ist ein hoch konservierter Prozess, der mehrzelligen Organismen dazu dient, sich überzähliger oder auch gefährlicher Zellen zu entledigen. Im Gegensatz zur Nekrose, die nach einer massiven Schädigung der Zelle als passives Absterben auftritt, ist die Apoptose ein von der Zelle gesteuerter, aktiver Vorgang.

1.1.2. Historischer Hintergrund

Das offenbar planmäßige Absterben einzelner Zellen im Verlauf der Embryonalentwicklung fiel bereits 1842 Carl Vogt auf, der diesen Vorgang in seiner Arbeit „Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*)“ beschreibt. Auch erkannte man früh, dass dieser Prozess in der Verwandlung der Insekten von einem Entwicklungsstadium ins andere, der Metamorphose, eine Rolle spielt. Dies beschrieb Lockshin 1965 als „programmed cell death“ (Lockshin and Williams, 1965). Kerr, Wyllie und Currie diente die ischämische Leber als Modell, an dem sie eine unbekannte, zweite Art des Zelltodes neben der klassischen Nekrose untersuchten. Sie beobachteten eine Umwandlung der Zellen in kleine, runde Zytoplasmakugeln, die teils fleckig gefüllt waren. Für diesen Vorgang etablierten sie den Begriff Apoptose. Studien zur Entwicklung des Fadenwurms *C. elegans* brachten Hinweise auf ein genetisches Programm des Zelltodes und auf die daran beteiligten Gene (Horvitz et al., 1983, Ellis and Horvitz, 1986). Sie wurden im Jahr 2002 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie bedacht. *C. elegans* verliert im Laufe seiner Entwicklung genau 131 seiner 1090 somatischen Zellen. Tiere, die einen Defekt in dem für das Entfernen abgestorbener Zellen notwendigen Gen *ced-1* aufweisen, bildeten die Grundlage für weitere Beobachtungen. Die toten Zellen ließen sich unter dem Normanski Interferenz Mikroskop weiter gut beobachten und ermöglichten die Entdeckung weiterer Mutationen. So waren bei Tieren mit einer Mutation im *ced-3* Gen keine apoptotischen Zellen mehr nachzuweisen, da diese Tieren das Programm zum Zelltod nicht mehr einleiten können (Horvitz et al., 1983). Damit konnte diesem Gen eine Funktion in der beteiligten Signalkaskade zugewiesen werden. Gene, welche

die Apoptose regeln, funktionieren in drei Gruppen, deren Homologe auch in Säugerzellen nachgewiesen werden konnten. Eine Gruppe dient der Regulation, andere fungieren als Adapter und weitere bauen als Effektoren wichtige Zellbestandteile ab. Die Tatsache, dass auch Bestandteile der menschlichen Apoptoseregulation in Zellen des Nematoden *C.elegans* ihre Funktion erfüllen können, stützt die Vermutung, dass es sich bei der Apoptose um einen evolutionär hoch konservierten Vorgang handelt (Vaux et al., 1992, Hengartner and Horvitz, 1994). In Säugerzellen konnte dem Bcl-2 Protein 1988 als erster Komponente von Vaux und Mitarbeitern eine Funktion zugeordnet werden (Vaux et al., 1988). *Bcl-2* fiel als ein durch chromosomale Translokation dereguliertes Gen in Zellen des humanen folliculären B-Zell Lymphoms auf. Im Gegensatz zu den bis dahin bekannten Onkogenen wirkte es jedoch nicht Proliferation-induzierend, sondern verhinderte die Apoptose in den betroffenen Zellen.

1.1.3. Auslöser der Apoptose

Grundsätzlich kann die Apoptose auf zwei verschiedene Arten initiiert werden. So können Veränderungen im Inneren der Zelle, wie nicht mehr behebbare chromosomale Schäden oder fehlende Wachstumsfaktoren, als intrinsische Signale den Zelltod auslösen. Dieser Weg bezieht vor allem die Mitochondrien ein. Andererseits können benachbarte Zellen Signale abgeben, die über Rezeptoren auf der Zelloberfläche, wie CD95 (APO-1/Fas), einem Rezeptor aus der Familie der Todesrezeptoren, das Absterben der Zelle auslösen. In bestimmten Zellen, vom so genannten Typ II (Scaffidi et al., 1998), tritt auch eine Zusammenarbeit von extrinsischem und intrinsischem Weg auf. Das durch den CD95 Rezeptor-vermittelte Signal führt bei den so genannten Typ I Zellen ausschließlich über die Aktivierung der Rezeptor-assoziierten Caspasen und deren Effektoren zum Tode der Zelle. Wird CD95 durch seinen Liganden oder einen agonistisch wirkenden Antikörper aktiviert, formiert sich im Zellinneren ein als death-inducing signaling complex (DISC) bezeichneter Komplex. Dieser besteht aus CD95, Fas-associated death domain protein (FADD, auch MORT-1) und der Procaspase 8. In den Typ I Zellen aktiviert dieser Komplex die Caspase 8 in ausreichendem Maße, um über die Effektorcaspase 3 die Apoptose auszulösen. Die Typ II Zellen exprimieren diese Bestandteile zwar in vergleichbarer Menge, erreichen jedoch keine hinreichende Aktivität der Caspase 8 (Scaffidi et al., 1999). Sie beziehen darüber hinaus den

mitochondrialen Weg der Apoptoseauslösung zur Verstärkung mit ein. Die geringe Caspase 8 Aktivität reicht hier zur Spaltung des ausschließlich die BH3 Domäne enthaltenden Bcl-2 Proteins Bid zum proapoptotischen p15 tBid. An den Mitochondrien bewirkt tBid die Freisetzung proapoptotischer Moleküle wie Cytochrom c, Smac/DIABLO, Endonuklease G (Roy and Nicholson, 2000). In diesen Zellen kann die Apoptose durch Überexpression von Bcl-2 oder Bcl-X_L unterdrückt werden. Es handelt sich dabei um einen evolutionär später entstandenen Weg, der bei *C. elegans* noch nicht vorhanden ist (Green and Evan, 2002). In beiden Fällen kann aber das auf der Ebene des DISC, oberhalb der unterschiedlichen Wege, angreifende c-Flip (Casper) die Apoptose hemmen. Dabei handelt es sich um einen Inhibitor des FAS-Signalweges, der mit der strukturell verwandten Caspase-8 um die Bindungsstelle an FADD konkurriert. Daneben kann das in vielen Splice-Varianten vorliegende Protein die Caspase-8 aber auch aktivieren und ist überwiegend an Proliferation und Funktion von Zellen des Immunsystems beteiligt (Budd et al., 2006).

1.1.4. Morphologische Veränderungen der Zelle

Morphologisch zeigen sich wiederkehrende Veränderungen der absterbenden Zellen, die eine genaue Organisation des gesamten Vorgangs nahe legen, daher die Bezeichnung „programmierter Zelltod“. Der beobachtete Vorgang unterscheidet sich dabei deutlich von der bereits erwähnten Nekrose.

Diese Form des Zelluntergangs beruht auf einer pathologischen, meist gravierenden Verletzung der Zelle. Sie tritt vor allem nach einer massiven Schädigung der Membranen durch mechanische oder thermische Einwirkung, oder das Ausbleiben der Versorgung der Zelle auf. Die Zelle schwillt an und erscheint glasig, später auch mit mottenfraßartigen Aussparungen. Lysosomale Enzyme erreichen das Zytoplasma und führen zur Autolyse der Zelle. Durch die geschädigten Membranen treten Bestandteile der Zelle aus, die in der Umgebung zu Entzündungsreaktionen führen. Der Kern verändert sich in typischer Weise. Die Karyolyse beschreibt das lichtmikroskopisch sichtbare Verblässen des Kerns durch den Verlust der Basophilie. Er kann ebenso wie der Kern der apoptotischen Zelle kondensieren, man spricht hier von Pyknose, fragmentieren und schließlich im Rahmen der Karyorrhesis verschwinden. Reste der Zelle, die nicht vollständig abgebaut werden, können im Laufe der Zeit verkalken (Kumar et al., 2004).

Im Verlauf der Apoptose wandeln sich die Zellen in kleine, runde mit Zytoplasma gefüllte Körperchen um, die häufig auch lichtmikroskopisch sichtbare Flecken enthalten. Unter dem Elektronenmikroskop zeigt sich, dass die Vesikel durch Blasenbildung aus der Zellmembran hervorgehen und kondensiertes Chromatin sowie intakte Organellen enthalten. Als erstes verdichten sich Zytoplasma und Chromatin, das sich dabei unter der Kernhülle ansammelt. Die beschriebenen extrazellulären Körper lassen sich zwar häufig in Gruppen beobachten, die Ausstülpungen selbst erscheinen aber selten, was darauf hindeutet, dass der Prozess sehr schnell abläuft. Dieser wurde als aktiv und auf einer Aktion der Zelle selbst beruhend aufgefasst (Kerr, 1971). Die DNA wird erst zu großen Stücken von etwa 300 kb zerschnitten, anschließend durch Kalzium- und Magnesiumabhängige Endonukleasen weiter internukleosomal zu 50 kb großen Stücken abgebaut, wobei das Chromatin kondensiert (Wyllie, 1980). In den meisten Zellen werden die Stücke noch weiter zerkleinert (Walker et al., 1999). Die abgestorbene Zelle zerfällt zu apoptotischen Körperchen (apoptotic bodies) und Signale auf ihrer Oberfläche veranlassen schließlich die Phagozytose durch umgebende Zellen. Zu diesen Signalen gehört das bei intakten Zellen auf der Membrannenseite lokalisierte Phosphatidylserin (Fadok et al., 2000). An der Phagozytose beteiligen sich außer Makrophagen auch benachbarte epitheliale Zellen (Savill and Fadok, 2000). Histochemisch lassen sich im Gegensatz zur Nekrose kein Austritt lysosomaler Enzyme oder eine Entzündungsreaktion in der Umgebung nachweisen. Die Phagozytose der apoptotic bodies unterdrückt üblicherweise auftretende Entzündungssignale, wie die Sekretion von TGF-1 β . Auch rufen phagozytierende dendritische Zellen, die Peptide einer apoptotischen Zelle präsentieren, keine Immunreaktion der T-Zellen hervor. Der charakteristischen Veränderungen wegen wurde anfangs auch von „shrinking necrosis“ gesprochen (Kerr, 2002).

1.1.5. Physiologische und pathologische Bedeutung

Die Bedeutung der Apoptose für mehrzellige Organismen liegt darin, überzählige oder nicht mehr benötigte Zellen zu eliminieren, ebenso wie solche, die dem gesamten Organismus gefährlich werden könnten. Sie tritt in der Embryonalentwicklung auf, wenn phylogenetisch angelegte Strukturen wieder abgebaut, einzelne Gliedmaßen aus größeren Zellverbänden entstehen oder die Strukturen des neuronalen Systems den funktionellen Erfordernissen angepasst

werden. Die Lumina tubulärer Strukturen können beispielsweise durch den programmierten Tod der innen liegenden Zellen zustande kommen (Glucksmann, 1965). Auch die Räume zwischen den Fingern entstehen auf diese Weise. Im Erwachsenenalter findet eine hormonabhängige Involution verschiedener Gewebe statt. Dazu zählen die Veränderungen des Endometriums im Rahmen des Menstruationszyklus oder die Atresie des Ovars in der Menopause. In proliferierenden Geweben wie den intestinalen Epithelien hält die Apoptose ein Gleichgewicht mit den in den Krypten neu entstehenden Zellen aufrecht. Eine entscheidende Rolle spielt der programmierte Zelltod für das Immunsystem. So gehen Zellen wie neutrophile Granulozyten oder Lymphozyten, die nach einer Immunreaktion ihren Zweck erfüllt haben, kontrolliert zu Grunde. Potentiell schädliche, gegen körpereigene Antigene gerichtete Lymphozyten werden noch vor ihrer vollständigen Ausreifung eliminiert, so wie andererseits die zytotoxische T-Zellen gezielt in virusinfizierten oder neoplastisch veränderten Zellen Apoptose auslösen können.

Gerät die Steuerung eines so fundamentalen Prozesses außer Kontrolle, kann eine Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen die Folge sein. Dabei können sich beide Fälle, Übermaß und Mangel an Apoptose, ungünstig auswirken. So ist der Schaden durch einige virale Infektionen, wie die Hepatitis, durch apoptotisches Absterben der Zellen bedingt und ruft dabei die lichtmikroskopisch sichtbaren Councilman Körper hervor. Ebenso die Atrophie parenchymatöser Organe wie Niere oder Pankreas nach Verschluss ihres abführenden Kanals. Werden Immunzellen, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind, nicht mehr sicher entfernt, treten Autoimmunerkrankungen auf. Dazu gehören die rheumatoide Arthritis, entzündliche Darmerkrankungen, multiple Sklerose, Psoriasis und Asthma bronchiale (Tak and Firestein, 2001). Eine große Anzahl schädigender Reize, wie ionisierende Strahlung, Zytostatika oder Hypoxie, können in niedriger Dosierung zur Apoptose führen, während derselbe Reiz in höherer Dosierung oder bei längerer Einwirkzeit die Zellen nekrotisch werden lässt (Kumar et al., 2004).

Da die Apoptose das Gleichgewicht zwischen neu gebildeten und absterbenden Zellen reguliert und Tumoren als eine Störung dieses Gleichgewichts aufgefasst werden, liegt es nahe, dass eine Unterdrückung der Apoptose eine Rolle in der Onkogenese spielt. Nach Hanahan und Weinberg zeichnen sich maligne Zellen durch sechs verschiedene Veränderungen in ihrer Zellphysiologie aus. Sie sind

unabhängig von Wachstumsfaktoren, überwinden Signale der Wachstumsinhibition, sind apoptoseresistent, haben unbegrenztes replikatives Potential, können neue Gefäße bilden, beherrschen das Einwandern in umgebendes Gewebe und die Bildung von Metastasen (Hanahan and Weinberg, 2000). Die Bedeutung der Apoptosesuppression, hier durch Bcl-2, fiel erstmals als Eigenheit des follikulären B-Zell-Lymphoms auf (Vaux et al., 1988). Zellen, die über einen solchen Schutz verfügen, können im Laufe der Zeit weitere Mutationen erwerben und weitere Merkmale transformierter Zellen entwickeln. Die Unterdrückung der Apoptose bringt malignen Zellen auch teilweise eine Resistenz gegen Zytostatika (Wang et al., 1999).

1.2. Regulation der Apoptose

1.2.1. Negative Regulation, Exekution

Die Apoptose wird durch gegensätzliche Einflüsse bestimmt. Es gibt eine negative Regulation durch Signale, die zur Exekution einer Zelle führen und eine positive, die Zellen vor dem Absterben schützt. Die Signalwege, die zum Zelltod führen enthalten eine Anzahl von Verstärkungsstufen und positiven Feedback Schleifen, die sicherstellen, dass der einmal begonnene Prozess auch zu Ende geführt wird. Sie enthalten aber auch Elemente, die eine überflüssige Aktivierung des Signalweges verhindern. Die einzelnen Bestandteile dieser Wege wurden oft von mehreren Gruppen gleichzeitig beschrieben und unterschiedlich benannt, daher sind hier in Klammern mehrere gängige Namen mit aufgeführt.

1.2.1.1. Todesrezeptoren

An der negativen Regulation sind die Todesrezeptoren aus der TNF-Rezeptor Familie beteiligt. Diese Rezeptoren binden Liganden von umgebenden Zellen und können dann in den betroffenen Zellen die Apoptose starten. Vor allem bei Zellen des Immunsystems sind diese Signalwege verbreitet. Die Rezeptoren wie Fas-Rezeptor (CD 95, FAS oder Apo 1), TNF-Rezeptor 1 (TNFR 1, p55 oder CD 120a), Todesrezeptor 3 (DR3, Apo 3, WSL-1, TRAMP oder LARD), Todesrezeptor 4 (DR4, TRAIL-R1, Apo 2) und Todesrezeptor 5 (DR5, Apo2, TRAIL-R2, TRICK 2 oder KILLER) befinden sich an der Zelloberfläche. Intrazellulär haben die meisten davon eine etwa 80 Aminosäuren umfassende Todesdomäne (DD, death domain), die eine

Verbindung zu Adapterproteinen und intrazellulären Effektoren herstellt und diese auch teilweise aktiviert (Hofmann, 1999). Dazu gehören TRAF (TNF receptor-associated factor), FADD (Fas-associated death domain), FLICE (FADD-like ICE), Caspasen und RIP (receptor-interacting protein). Diese Adapter aktivieren Signalwege über NF- κ B und Mitogen-aktivierte Proteinkinasen wie JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Gaur and Aggarwal, 2003). Auch der Rezeptor für neuronalen Wachstumsfaktor (NGF, nerve growth factor) enthält eine solche Todesdomäne. Die genannten Rezeptoren werden durch Liganden aus der TNF Gensuperfamilie aktiviert. Insgesamt sind 18 verschiedene Mitglieder bekannt, dazu gehören: CD 95 Ligand (Fas), TNF, Lymphotoxin α , Apo3 Ligand (Apo3L, auch TWEAK) sowie Apo2 Ligand (Apo2L, auch TRAIL) (Ashkenazi and Dixit, 1998). Die Signale von Liganden der TNF Familie werden durch Decoy-Rezeptoren moduliert. Solche Rezeptoren wie DcR1 bis DcR3 oder Osteoprotegerin (OPG) binden zwar den Liganden, leiten aber intrazellulär keine Signale weiter (LeBlanc and Ashkenazi, 2003). Die Rezeptoren vermitteln Signale für Zelltod, Proliferation oder Überleben. TNF α beispielsweise vermittelt Todessignale, aber gleichzeitig über eine NF- κ B abhängige Expression antiapoptotischer Gene wie c-IAP1, c-IAP2, TRAF 1, TRAF 2 (Wang et al., 1998) und XIAP (Wu et al., 1998) einen Schutz für die Zelle. Diese stirbt erst dann, wenn der zweite Weg blockiert ist oder nicht ausreichend stark wirkt (Tanaka et al., 1999). Caspase 3-vermittelte Proteolyse von IKK β kann diese antiapoptotische Wirkung von NF- κ B unterbrechen (Tang et al., 2001).

1.2.1.2. Caspasen

Die eigentliche Exekution erfolgt durch die Caspasen (Hengartner, 2000). Dabei handelt es sich um eine evolutionär konservierte Gruppe hochspezifischer Proteasen, von denen beim Menschen derzeit 14 verschiedene bekannt sind. Der Name spielt darauf an, dass ihr katalytisches Zentrum die Aminosäure Cystein enthält und ihre Substrate nach einem Aspartatrest an einem spezifischen Erkennungsmotiv Asp-X-X-X gespalten werden (X, beliebige Aminosäure). Sie verfügen über eine Vielzahl unterschiedlicher Substrate und sind für die meisten sichtbaren Veränderungen im Rahmen der Apoptose verantwortlich. Der Abbau der nukleären Laminine führt zum Schrumpfen und Ausknospen des Kerns. Die Zelle verliert dabei Bestandteile des Zellskeletts, wie Fodrin und Gelsolin (Kothakota et al., 1997). Die p21-aktivierte Kinase PAK2 wird auch durch Caspasen aktiviert und ist an

der Ausknospung der Zellmembran beteiligt (Rudel and Bokoch, 1997). Auch antiapoptotisch wirksame Protein wie Bcl-2 und IKK β (Tang et al., 2001) werden gespalten und verlieren dabei im Sinne eines positiven Feedbacks ihre Aktivität. Bcl-2 verliert nicht nur seine schützende Aktivität, sondern bildet auch noch einen proapoptotischen Rest (Bossy-Wetzel et al., 1998). Die Caspaseabhängige Desoxyribonuklease (CAD, caspase-activated deoxyribonclease) wird aus einem inhibierenden Komplex befreit und spaltet dann ihrerseits die DNA zwischen den Nukleosomen in Stücke von etwa 180 Basenpaaren Länge (Enari et al., 1998). Ob allerdings jedes der in Überexpressionsversuchen gefundenen Substrate auch physiologische Relevanz besitzt ist unklar.

Die Caspasen werden wie die meisten Proteasen als inaktive Vorläufer gebildet und erst bei Bedarf aktiviert. Diese Enzymogene bestehen aus drei Domänen, einer Prodomäne und teilweise noch einem Bindeglied, die beide abgespalten werden sowie einer p20 und einer p10 Domäne, die dann auch im reifen Enzym auftreten. Dieses besteht als Heterotetramer aus zwei p20/p10 Heterodimeren und enthält zwei aktive Zentren (Earnshaw et al., 1999). Es handelt sich bei dieser Aktivierung durch Proteolyse in jedem Fall um eine nicht reversible Modifikation.

Die Caspasen können auf drei verschiedene Arten aktiviert werden. Effektorcaspasen liegen in der Caspasekaskade ganz unten und dienen hauptsächlich dazu, zelluläre Bestandteile zu spalten. Sie werden durch die Initiatorcaspasen proteolytisch gespalten, verlieren ihre Prodomäne und werden dadurch aktiv. Auf diese Weise werden vor allem Caspasen mit kurzen Prodomänen, wie die Caspasen-3, -6, -7 und -9 aktiviert. In der Zelle sind sie in größerer Menge vorhanden und enzymatisch aktiver als Initiatorcaspasen, die dazu beitragen, das Signal zur Apoptose zu verstärken. Die an der Signalweiterleitung der Todesrezeptoren beteiligte Initiatorcaspase 8 wird auf einem anderen Weg aktiviert. Bindet ein Ligand an Rezeptoren wie CD95, lagern sich diese über ihre Todesdomänen (DD) zu einem Homotrimer zusammen (Huang et al., 1996). Das Adapterprotein FADD (Fas-associated death domain, auch MORT 1 genannt) bindet an die zusammen gelagerten Todesdomänen, an seine death effector domain (DED) lagern sich dann mehrere Moleküle der Procaspase 8 (FLICE, MACH) an. Es entsteht ein als „death inducing signaling complex“ (DISC) bekanntes Multimer, das die Procaspasen so in räumliche Nähe bringt, dass ihre geringe proteolytische Aktivität ausreicht sich gegenseitig zu aktivieren (Muzio et al., 1998). Ein ähnlicher

Mechanismus findet sich bei Caspase-9 (Apaf-3) und der Aktivierung durch Apaf-1 am Apoptosom. (Jiang and Wang, 2000). Ein weiteres Element zur Aktivierung der Caspasen ist Smac/Diablo, das auf Apoptose-stimulierende Reize hin aus den Mitochondrien freigesetzt wird. Im Zytosol liegen die Procaspasen an Mitglieder der Familie der IAPs gebunden vor. Diese Proteine unterdrücken die spontane Aktivität der Caspasen über das IAP-Binddemotiv (IBM, IAP binding motif). Smac/Diablo verdrängt XIAP aufgrund struktureller Ähnlichkeit aus der Bindung mit Caspase-9 und beendet auf diese Weise dessen antiapoptotische Funktion (Chai et al., 2000, Liu et al., 2000).

Knockout Tiere, wie sie für viele Caspasen existieren, deuten auf weitere Funktionen der Caspasen außerhalb der Apoptoseregulation hin. Die Caspase-defizienten Tiere sind oft deutlich kleiner, weisen Defekte in der Entwicklung des Gehirns auf und werden nur ein bis drei Wochen alt (Kuida et al., 1996). Für die Caspasen-1, -4, -5, -11 und -14 ist auch eine Rolle in der Prozessierung proinflammatorischer Cytokine beschrieben, ihre Aktivierung führt nicht notwendigerweise zur Apoptose (Kidd et al., 2000).

1.2.1.3. Apoptotic protease-activating factor 1

Apoptotic protease-activating factor 1 (Apaf-1) ist ein 130 kDa schwerer Bestandteil des insgesamt 700 – 900 kDa schweren Apoptosoms, das die Initiatorcaspase-9 aktivieren kann (Cain et al., 1999). Apaf-1 verfügt über drei funktionstragende Domänen: CARD (caspase-recruitment domain), eine nukleotidbindenden Domäne und etlichen WD-40 repeats. Die WD-repeats finden sich in allen eukaryoten Zellen bei Proteinen unterschiedlichster Funktion. Sie haben keine enzymatische Aktivität und dienen als Binde- oder Struktur motive (Smith et al., 1999). Die Struktur des kompletten Apoptosoms ist nicht abschließend geklärt, aber es gibt Hinweise, dass es sich um ein siebenspeichiges, radförmiges Gebilde handelt. Die den Speichen entsprechenden Strukturen werden dabei aus Apaf-1 Molekülen gebildet (Acehan et al., 2002).

Das Apoptosom ist vor allem am intrinsischen Signalweg der Apoptoseauslösung beteiligt und wird durch verschiedene Formen von Zellstress oder DNA-Schädigung, etwa durch ionisierende Strahlung oder zytotoxische Substanzen, aktiviert. Allerdings kann es auch den extrinsischen Weg über tBid verstärken (Luo et al., 1998). Wird die äußere Mitochondrienmembran im Verlauf der Apoptose durchlässig, entweichen

Proteine wie Cytochrom c und Smac/Diablo. In Ruhe liegt Apaf-1 im Zytoplasma in einer kompakten und sich selbst inhibierenden Form vor. Sobald Cytochrom c bindet, wird die Anlagerung von dATP möglich und das Apoptosom vervollständigt sich. Deshalb entscheidet die in der Zelle vorhandene Konzentration an ATP darüber, ob eine Zelle durch Apoptose oder bei unzureichender ATP-Konzentration durch Nekrose zugrunde geht (Nicotera et al., 1999). Procaspase-9 Moleküle binden über die caspase recruitment domain (CARD), die erhöhte lokale Konzentration der Procaspasen ermöglicht es ihnen zu dimerisieren. Nach der Cofaktor-vermittelten Dimerisierung entstehen die aktiven Caspase-9 Heterotetramere, die nur ein katalytisch aktives Zentrum enthalten. Verglichen mit anderen Caspasen verfügt sie nur über halb so viele Zentren (Renatus et al., 2001). Schrittweise werden in einer Kaskade weitere Caspasen aktiviert, zunächst die Caspasen-3 und -7 (Slee et al., 1999). Die Caspase-3 wiederum kann in einem positiven Feedback-Mechanismus Procaspase-9 aktivieren. Eine negative Regulation ist durch Hitzeschock Proteine möglich, Hsp70 kann sich an Apaf-1 anlagern und die Bindung von Procaspase-9 verhindern (Beere et al., 2000). Auch eine normale intrazelluläre Kaliumkonzentration hemmt den Aufbau des Apoptosoms und muss erst durch eine entsprechend hohe Konzentration an Cytochrom c überwunden werden (Cain et al., 2001).

Das metastasierte Melanom zeigt die Bedeutung von Apaf-1 für den intrinsischen Weg der Apoptoseauslösung. Bei dieser Tumorentität ist Apaf-1 häufig epigenetisch inaktiviert. In diesem Fall sind die Melanozyten fast durchgängig resistent gegen Chemotherapeutika wie Adriamycin (Soengas et al., 2001). Die stärkste Expression von Apaf-1 bei Mäusen findet sich im frühen Fetalstadium im zentralen Nervensystem. Entsprechende Knockout Mäuse weisen eine Hyperplasie des zentralen Nervensystems auf und versterben meist im Verlauf der Geburt in Folge einer mechanischen Schädigung des Gehirns. Die übrigen Organe sind weitgehend unauffällig. Ihre Fibroblasten erweisen sich als besonders resistent gegen Chemotherapeutika, UV- und γ -Bestrahlung (Yoshida et al., 1998).

1.2.1.4. Proapoptotische Bcl-2 Proteine

Die Bcl-2 Proteine bilden eine große Familie pro- oder antiapoptotisch wirkender Mitglieder, die vor allem am intrinsischen Weg der Apoptoseauslösung beteiligt sind. Alle Mitglieder zeichnen sich durch die Homologie in wenigstens einer Domäne, der Bcl-2 homology domain (BH) zum namensgebenden und zuerst entdeckten Bcl-2

aus. Die Familie der Bcl-2 Proteine kennt vier verschiedene homologe Abschnitte BH1 bis BH4, dabei ist wenigstens die BH3 Domäne bei allen vorhanden. Die BH3 Domäne ist für Dimerisierung und Zelltod bedeutend, sie wird durch hydrophobe Wechselwirkungen von den BH1 bis BH3 Domänen der antiapoptotischen Gegenspieler maskiert (Sattler et al., 1997). Untereinander können die einzelnen Mitglieder Homo- und Heterodimere bilden (Mahajan et al., 1998). Die antiapoptotischen Bcl-2 und Bcl-X_L Moleküle können sich auch in Membranen integrieren. Obwohl sie in ihrer Primärstruktur nur geringe Verwandtschaft zu anderen Proteinen haben, bildet ihre dreidimensionale Struktur die der porenbildenden Domänen bakterieller Toxine wie des Diphtherie Toxins nach (Muchmore et al., 1996). In Abwesenheit von Apoptose-induzierenden Signalen finden sich die Bcl-2 Proteine in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle. Während die proapoptotischen im Zytosol gelöst oder an das Zytoskelett gebunden vorkommen, sind die antiapoptotischen an verschiedenen Membranen zu finden (Krajewski et al., 1993).

Anhand der konservierten Domänen lassen sie sich grob in drei Kategorien einteilen. Die antiapoptotischen Mitglieder besitzen alle vier BH Domänen und sind über einen C-terminalen hydrophoben Rest an die Membranen der Mitochondrien oder des endoplasmatischen Retikulums gebunden. Zu ihnen gehören Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W (Gibson et al., 1996) und A1 (Choi et al., 1995). Proapoptotische Proteine wie Bax und Bak ähneln in ihrer Struktur den antiapoptotischen Proteinen, allerdings fehlt ihnen die N-terminale BH4 Domäne. Im Gegensatz zu der anderen Gruppe proapoptotischer Proteine, die ausschließlich über die BH3 Domäne verfügen, werden sie auch als „multidomain“ Proteine bezeichnet. Proteine wie Bid (Wang et al., 1996b), Bad oder Bim weisen als einzige Entsprechung zu den übrigen Familienmitgliedern die BH3 Domäne auf und heißen daher auch BH3-only Proteine. Sie können im Bereich der BH3 Domäne an Bax oder Bcl-2 binden.

Die Funktion der proapoptotischen Bcl-2 Proteine ist eng mit der Freisetzung von Cytochrom c und anderen Proteinen aus den Mitochondrien, wie AIF, Endonuklease G und SMAC verknüpft. Dabei existieren unterschiedliche Vorstellungen darüber, wie diese Freisetzung erfolgt. Nimmt man an, dass die Funktion der Form folgt, so können die Bcl-2 Proteine Poren bilden und so den Inhalt des Raums zwischen den beiden Membranen der Mitochondrien freisetzen (Gross et al., 1998). In künstlichen Membranen konnte gezeigt werden, dass rekombinantes Bcl-X_L, Bcl-2 und Bax in

der Lage sind, Ionenkanäle unterschiedlicher Charakteristik zu formen (Schendel et al., 1998). Die Selektivität und Öffnungscharakteristik solcher Kanäle könnten auch erklären, dass zuerst die mitochondrialen Proteine austreten und eine Schwellung und Ruptur der gesamten Mitochondrien erst später im Verlauf auftritt. Bcl-2 Proteine können auch als Bestandteil einer großen Pore (PTP, permeability transition pore) auftreten. Diese nicht-selektive Pore mit großer Durchlässigkeit bilden viele zusammen gelagerte Komponenten wie Hexokinase, Creatinkinase (CK), der spannungsabhängige Anionenkanal (VDAC, voltage dependent anion channel), der Adenin Nukleotid Austauscher (ANT, adenine nucleotide translocator), der periphere Benzodiazepin Rezeptor (PBR) und das mitochondriale Matrixcyclophilin CycD (Bernardi, 1999). Weiter besteht die Möglichkeit, dass die proapoptotischen Bcl-2 Proteine keine eigenen Poren bilden, sondern bestehende Kanäle regulieren. Die Mitochondrienmembran enthält dazu als Kandidaten VDAC (Shimizu et al., 1999) und ANT (Marzo et al., 1998). Unabhängig davon gibt noch Hinweise auf einen unspezifischen Effekt, den Lipidkanäle auf die Durchlässigkeit der Membran ausüben (Kuwana et al., 2002). Insgesamt ist aber die Vorstellung, dass sich eine Pore bildet, durch die mitochondriale Bestandteile austreten und dann im Zytosol über das Apoptosom die Ausführung der Apoptose bewirken etwas vereinfacht. So liegen im Raum zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran nur etwa 15 % des Cytochrom c frei vor (D'Herde et al., 2000). Der Rest ist fest über Cardiolipin an die innere Mitochondrienmembran gebunden und kann trotzdem schnell abgegeben werden (Ott et al., 2002), wobei aufwändige Umbauvorgänge der Membranen erforderlich sind (Scorrano et al., 2002).

Für die proapoptotischen BH3-only Proteine besteht eine Spezialisierung, sie überwachen die Zelle an unterschiedlichen Stellen auf Schäden. So reagieren Bax und Bad auf metabolischen Stress und auf Wachstumsfaktormangel, während das an die Mikrotubuli gebundene Bim die Funktion des Zytoskeletts überwacht. Bid kann minimale Aktivitäten der Caspase-8 erkennen. Dieses Modell kann erklären, wie unterschiedliche Verletzungen der Zelle zum Zelltod über eine gemeinsame Endstrecke führen können (Gross et al., 1999).

Die funktionelle Bedeutung der proapoptotischen Bcl-2 Moleküle zeigt sich an den für sie existierenden Knockout Mäusen. Bax^{-/-} sind lebensfähig, weisen aber Störungen in Keimzellen und neuronalem Gewebe auf (Perez et al., 1997). Ihre sympathischen Neurone sind unabhängig von NGF und ihre Motoneuronen überleben auch nach

Axotomie (Deckwerth et al., 1996). Der Phänotyp ähnelt dem nach Überexpression von Bcl-2. Bid^{-/-} Mäuse sind ebenfalls lebensfähig und resistent gegen Fas-induzierte Apoptose (Yin et al., 1999). Tiere, denen Bid fehlt, weisen spezifische Defekte in der Hämatopoese und eine Neigung zu Autoimmunerkrankungen auf (Bouillet et al., 1999).

1.2.1.5. Second mitochondrial protein activating caspases/direct IAP binding protein with low pl

Bei Smac/DIABLO handelt es sich um ein proapoptotisches Molekül, das die Aktivierung der Caspasen im Cytochrom *c*/Apaf-1/Caspase-9 Weg fördert. Es wurde von zwei Gruppen gleichzeitig entdeckt und als Smac, second mitochondrial protein activating caspases (Du et al., 2000), beziehungsweise DIABLO, direct IAP binding protein with low pl (Verhagen et al., 2000), benannt. Das etwa 23 kDa schwere Protein entsteht nach Aufnahme in die Mitochondrien durch Spaltung eines größeren inaktiven Vorläufers. Es findet sich ubiquitär, dabei in besonders hohen Konzentrationen in Hoden, Herz und Leber. Die Freisetzung aus den Mitochondrien als entscheidender regulatorischer Schritt bestimmt seine Aktivität. Sie wird wohl durch Proteine der Bcl-2 Familie geregelt und erfolgt mit der gleichen Kinetik wie die Freisetzung von Cytochrom *c*. Im Zytosol kann Smac/DIABLO Caspaseinhibitoren wie c-IAP1, c-IAP2, XIAP und Survivin binden und inaktivieren, indem es sie von den Caspasen trennt. Dieser Mechanismus ist mit Versuchsergebnissen vereinbar, die zeigen, dass Smac/DIABLO alleine den Schutz durch Bcl-2 nicht überwinden kann (Verhagen et al., 2000) und eine Überexpression keine vermehrte Apoptose auslöst, allerdings nach einem zusätzlichen Stimulus die Empfindlichkeit dafür deutlich erhöht. Letztlich entscheidet das Verhältnis zwischen IAP-Proteinen und zytosolischem Smac/DIABLO über das Schicksal der Zelle.

1.2.1.6. Neurotrophin receptor-interacting MAGE homologue

Das Neurotrophin receptor-interacting MAGE homologue (NRAGE) ist ein weiteres proapoptotisches Protein. Es kann den Caspaseinhibitor XIAP binden, nicht aber die verwandten Moleküle c-IAP1, c-IAP2 und NAIP. Auch überexprimiert löst es für sich alleine keinen Zelltod aus, es verstärkt jedoch die bei 32D-Zellen durch IL-3 Entzug auftretende Apoptose deutlich. *In vivo* findet sich NRAGE erst nach einem solchen Signal an XIAP gebunden. XIAP wird im Verlauf der Apoptose zum Substrat der

Caspasen (Johnson et al., 2000), in Gegenwart von NRAGE wird diese Spaltung durch einen noch unklaren Mechanismus verstärkt. NRAGE kann auch den Schutz der Zellen durch Bcl-2 überwinden (Jordan et al., 2001).

1.2.2. Positive Regulation

In der Zelle liegen Komponenten bereit, die geeignet sind die Zelle jederzeit zu vernichten. Es muss daher Gegenspieler geben, die eine irrtümliche Zerstörung der Zelle vermeiden und die proapoptotische Komponenten kontrollieren.

1.2.2.1. Inhibitors of apoptosis Proteine (IAPs)

Ein Teil dieser Apoptosekontrolle ist die Familie der Inhibitors of apoptosis Proteine (IAP). Diese Gruppe von Caspaseinhibitoren verfügt über mindestens eine Baculovirus IAP repeat (BIR)-Domäne. Neben dieser etwa 80 Aminosäuren langen Zink-bindenden Domäne, die zur Interaktion mit den Caspasen dient, verfügen sie noch über eine C-terminale RING Domäne (Fesik and Shi, 2001). Diese RING-Finger Domäne findet sich sonst bei Ubiquitinligasen (Joazeiro and Weissman, 2000). Beim Menschen besteht die Familie aus den 6 bisher bekannten Proteinen NAIP (neuronal apoptosis-inhibitory protein), c-IAP1 (cellular inhibitor of apoptosis), c-IAP2, XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), Survivin und BRUCE (Deveraux and Reed, 1999). Viren können für verwandte Proteine kodieren, wie das CrmA (cytokine response modifier) des Kuhpockenvirus und das p35 des Baculovirus. Das p35 wurde als ein Protein entdeckt, mit dem das Virus die Apoptose als Abwehrmechanismus des Wirts unterlaufen kann (Clem et al., 1991).

Für die Funktion der IAP Proteine sind zwei Mechanismen bekannt, die in der Kaskade unterhalb der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien angreifen und diese nicht mehr verhindern können (Jurgensmeier et al., 1998). Die Caspasen-3, -7 und -9 werden durch direkte Interaktion mit XIAP, cIAP1, cIAP2 und NAIP inhibiert (Deveraux et al., 1997, Roy et al., 1997). Die BIR3 Domäne hemmt die Caspase-9 und verhindert die Cytochrom c induzierte Aktivierung (Deveraux et al., 1998), während die Caspase-3 durch ein Verbindungsstück zwischen BIR1- und BIR2-Domäne inhibiert wird (Sun et al., 2000). Dies erfolgt durch eine enge Anbindung des IAP Moleküls an das aktive Zentrum der Caspase und verhindert damit den Zugang für das Substrat. Weiter fällt auf, dass die katalytisch-aktiven Zentren der Caspasen aus einem Cystein- und einem Hystidinrest aufgebaut und

leicht durch Zinkkationen hemmbar sind. Diese können durch die BIR Domäne zur Verfügung gestellt werden (Perry et al., 1997, Stennicke and Salvesen, 1997). XIAP hat darüber hinaus noch andere antiapoptotische Funktionen, da es als mutiertes Molekül, dem die direkte Bindung an Caspasen nicht mehr möglich ist, diese immer noch hemmen kann (Silke et al., 2002). Eine Erklärung liefert hier die durch das RING Finger Motiv vermittelte Ubiquitinligaseaktivität einiger IAP Moleküle, das die Caspasen zum proteasomalen Abbau bestimmen und damit ihre Aktivität in der Zelle drosseln kann (Huang et al., 2000, Suzuki et al., 2001). Es gibt aber Hinweise auf zahlreiche weitere Caspase-unabhängige antiapoptotische Funktionen der IAP Familie (LeBlanc, 2003).

Die physiologische Bedeutung der IAP Proteine zeigt sich prominent beim Ausfall von NAIP. Dieser findet sich bei Patienten mit einer Form der spinalen Muskelatrophie. Hier ist das Überleben der Vorderhornzellen im Rückenmark vermindert (Roy et al., 1995, Liston et al., 1996).

1.2.2.2. Antiapoptotische Bcl-2 Moleküle

Die Gruppe der antiapoptotisch wirksamen Bcl-2 Proteine besteht aus Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Mcl-1 und A1. Sie verfügen über die Domänen BH1 bis BH4 und sind meist an den Membranen der Mitochondrien lokalisiert. Als erstes Mitglied wurde Bcl-2 in Zellen des humanen folliculären B-Zell Lymphoms beschrieben. Es ist dort durch eine chromosomale Translokation t(14; 18) fehlreguliert (Tsujimoto et al., 1984, Cleary et al., 1986) und ermöglicht den so geschützten Zellen, weitere Mutationen zu erwerben.

Diese Gruppe der Bcl-2 Proteine unterdrückt den Zelltod auf unterschiedliche Weise. Überexprimiertes Bcl-2 verhindert durch einen unklaren Mechanismus die Freisetzung von Proteinen aus den Mitochondrien, die zum Zelltod führen (Susin et al., 1996). Weiterhin ist die BH4 Domäne in der Lage, C-Raf an die Mitochondrien zu binden. Dieses phosphoryliert das proapoptotische Bad, das dadurch an 14-3-3 Proteinen im Zytosol gebunden und damit inaktiviert ist (Wang et al., 1996a). Seine Wirkung kann es direkt an Bcl-X_L oder Bcl-2 gebunden entfalten (Yang et al., 1995, Zha et al., 1997). Als Gegenspieler fungiert die Phosphatase Calcineurin, die Bad Kalziumabhängig dephosphorylieren kann (Shibasaki et al., 1997). Ein weiterer Mechanismus konnte für Bcl-X_L gezeigt werden. Hier besteht eine Bindung zu Apaf-1, einem Bestandteil des Apoptosoms, die durch ersatzweise Bindung verschiedener

proapoptotischer Bcl-2 Mitglieder wieder aufgehoben werden kann (Hu et al., 1998). Dadurch kann die Caspase-9 wieder aktiviert werden. Allerdings konnte diese Bindung zwischen Bcl-2 oder Bcl-X_L nicht immer nachvollzogen werden (Hausmann et al., 2000). Es ist möglich, dass diese Bindung über den Inhibitor Aven vermittelt ist (Chau et al., 2000).

Knockout Mäuse machen die Bedeutung der Bcl-2 Moleküle in der Apoptosesuppression deutlich, wobei die einzelnen Mitglieder einander zum Teil ersetzen können, so dass die meisten Tiere lebensfähig sind. Bcl-2^{-/-} Tiere versterben nach wenigen Monaten an Nierenversagen und verfügen über eine geringere Anzahl an Nephronen. Durch Zelltod der Melanozyten entwickeln sie früh ein graues Fell, ihre B- und T-Zellreihe sind von massivem Zelltod betroffen (Veis et al., 1993). Tiere mit einem Bcl-X_L-Defizit erliegen bereits am 13. Tag der Embryonalentwicklungsphase einem massiven Absterben postmitotischer, unreifer Neuronen in Rückenmark und Gehirn. Die Thymozyten dieser Tiere überleben ebenfalls nur kurze Zeit (Motoyama et al., 1995). Fehlendes Bcl-W führt zu einer defekten Spermatogenese bei progressiver Hodendegeneration (Print et al., 1998).

1.2.3. Signalwege

Das Überleben der Zelle wird durch mehrere, unterschiedlich genau charakterisierte Signalwege kontrolliert. Zwischen den einzelnen Wegen zeigen sich allerdings immer mehr gemeinsame Elemente, wechselseitige Einflüsse und Überschneidungen, so dass man eher von einem Signalnetz, als von einzelnen Signalwegen sprechen sollte.

1.2.3.1. Die zytoplasmatische (Ras-Raf-MEK-ERK) Kaskade

Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Kaskade oder zytoplasmatische Kaskade findet sich in allen eukaryotischen Zellen. Sie ist an der Regulation von Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben beteiligt. Die Kaskade besteht aus mehreren hierarchisch angeordneten Kinasen, die ein Signal von membranständigen Rezeptoren in den Zellkern übertragen und dabei verstärken können. Innerhalb von Minuten beginnt dann die Transkription abhängiger immediate early genes, von denen einige für weitere regulatorische Gene kodieren. Oberhalb der Kinasen arbeitet das kleine G-Protein Ras, die Kaskade selbst besteht aus drei Kinasen, die einander aktivieren. Eine MAPK Kinase Kinase (MAPKKK), hier Raf,

phosphoryliert und aktiviert eine MAPK Kinase (MAPKK), wie die MAPK/ERK Kinase (MEK), und diese wiederum eine MAP Kinase (MAPK), hier die extrazellulär Signal regulierte Kinase (ERK) (Kolch, 2000). Spezifität können diese Kaskaden durch verschiedene Adapter- und Gerüstproteine und die Verteilung der beteiligten Moleküle innerhalb der Zelle erreichen (Chang and Karin, 2001). Die hintereinander geschalteten Kinasen führen zu einer Stimulus/Antwort-Kurve, die sich wie ein Schalter verhält. Damit wechselt die Zelle zwischen zwei unterschiedlichen Zuständen hin und her, was dem Charakter der grundlegenden Entscheidungen, die sie regeln, entspricht (Huang and Ferrell, 1996).

Ras ist ein Protoonkogen, das zur Familie der kleinen G-Proteine gehört und nach posttranslationaler Modifikation an die Plasmamembran gebunden vorliegt (Herrera and Sebolt-Leopold, 2002). Drei Isoformen H-, K- und N-Ras sind bekannt. Die Regulation übernehmen verschiedene GTP Austauschfaktoren (GEF) und GTPase aktivierende Proteine (GAP), die Ras zwischen dem GDP-gebundenen inaktiven und dem GTP-gebundenen aktiven Zustand umschalten können. Die übergeordnete Rezeptortyrosinkinase kann Ras aktivieren, indem sie entweder einen GEF aktiviert oder ein GAP hemmt.

Aktiviertes Ras rekrutiert Raf an die Plasmamembran, wo es dann in weiteren Schritte aktiviert wird (Dhillon and Kolch, 2002). An der Modifikation von C-Raf können auch die kleinen GTPasen der Rho-Familie, Rho, Rac und Cdc42 (Li et al., 2001), die cAMP abhängige Proteinkinase A (Dhillon et al., 2002) und die Proteinkinase C (Morrison et al., 1993) beteiligt sein. Nur für B-Raf ist eine direkte Bindung an Ras zur Aktivierung ausreichend (Mason et al., 1999). Ras wirkt aber noch auf andere Signalwege als die zytoplasmatische Kaskade. Dazu gehören der Phosphoinositol 3-Kinase (PI3-Kinase) Weg (Downward, 1998), die Januskinase (JAK) oder der proapoptischen Nore1-RASSF1-Mst1 Komplex (Feig and Buchsbaum, 2002). Eine Mutation von Ras findet sich bei etwa 30% aller menschlichen Neoplasien (Chong et al., 2003).

Die Familie der Serin-/Threoninkinase Raf besteht aus den drei Isoformen A-Raf, B-Raf und C-Raf, die Ras mit hoher Affinität binden können. Dabei wurde zuerst das verwandte retrovirale Onkogen v-Raf entdeckt (Rapp et al., 1983). Die Kinasen enthalten jeweils drei konservierte Domänen CR1, CR2 und CR3 (Morrison and Cutler, 1997). Dabei besteht die CR1 Domäne aus der Ras binding domain (RBD) und einer Cystein reichen Domäne (CRD), die beide für Bindung an Ras und die

Aktivierung wichtig sind. Die Domäne CR2 enthält zahlreiche Serin- und Threoninreste, die phosphoryliert werden können, der Regulierung dienen und den intrazellulären Aufenthalt bestimmen können. Diese beiden Domänen liegen N-terminal und können die C-terminal gelegene CR3 Domäne hemmen, die das katalytische Zentrum der Kinase enthält. Auch sie wird durch Phosphorylierungen weiter beeinflusst (Chong et al., 2003). Die Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Gewebsverteilung und der Fähigkeit Substrate wie MEK zu aktivieren. So wird nur C-Raf ubiquitär exprimiert und Knockout Tiere für die einzelnen Formen zeigen, dass diese Proteine nicht redundant sind und unterschiedlichen Funktionen dienen (Hagemann and Rapp, 1999). Das inaktive C-Raf ist im Zytosol über zwei phosphorylierte Serinreste an das Adapterprotein 14-3-3 gebunden (Tzivion et al., 1998). Die beiden Domänen RBD und CRD können Raf an aktives, GTP beladenes Ras binden, was aber allein noch nicht zur Aktivierung ausreicht. Die Bindung an Ras verschiebt das 14-3-3 Molekül (Rommel et al., 1996) und ermöglicht eine Dephosphorylierung durch die ebenfalls membrangebundene Phosphatase PP2A (Kubicek et al., 2002). Andere Kinasen wie die p21 aktivierten Kinasen PAK3 und PAK1 (King et al., 1998, Chaudhary et al., 2000) phosphorylieren nun Serin- und Tyrosinreste und heben den Einfluss der beiden inhibitorischen Domänen CR1 und CR2 auf (Cutler et al., 1998). Das Substrat MEK und dessen Substrat ERK sind zusammen an dem Adapterprotein KSR (kinase suppressor of Raf) fixiert, sie binden darüber an das nun aktivierte Raf und können leichter phosphoryliert werden. KSR selbst verfügt über keine Kinaseaktivität, sondern dient als Gerüst für die Aktivierung des KSR-MEK1/2-ERK1/2 Komplexes (Morrison, 2001). Das GTP gebundene Ras hat eine höhere Affinität zu C-Raf als zu den meisten Ras-GTPase aktivierenden Proteinen (Ras-GAP), daher ist es nicht offensichtlich, wie das Signal wieder beendet wird (Warne et al., 1993). Allerdings kann eine weitere Phosphorylierung an Serin 43 diese Affinität wieder herabsetzen. Dies kann sowohl durch die cAMP abhängige Proteinkinase A (PKA) (Wu et al., 1993) erfolgen, als auch durch Wachstumsfaktoren induziert. Damit begrenzen diese möglicherweise ihr eigenes Signal (Abraham et al., 2000).

Die etablierten Substrate der Raf Proteine sind die beiden MAPKK MEK 1 und 2, die auch an der Suppression der Apoptose beteiligt sind (von Gise et al., 2001). An der Aktivierung des MEK-ERK Weges ist vor allem B-Raf beteiligt, während vorgeschlagen wurde, dass C-Raf seine antiapoptotische Wirkung unabhängig von

seiner Fähigkeit MEK zu phosphorylieren entfalten kann (Huser et al., 2001, Mikula et al., 2001). Bcl-2 kann C-Raf an die Mitochondrienmembran binden. Dort ist eine Aktivierung von MEK nicht mehr möglich, aber die Phosphorylierung und Inaktivierung des proapoptotischen Bcl-2 Moleküls Bad bedeutet einen Schutz der Zelle vor Apoptose (Wang et al., 1996a). Es gibt Hinweise, dass auch die Membranshuttle Kinase MEKK1 ein Ziel der Raf Kinasen ist und diese indirekt den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert (Baumann et al., 2000). Die funktionelle Bedeutung verschiedener Raf-Isoformen bei der Zellüberlebenskontrolle ist durch entsprechende Knockout-Tiere belegt. So führt der Ausfall von B-Raf im Mausmodell zu spezifischen Endothelschäden (Wojnowski et al., 1997) oder *in vitro* zum Absterben sensorischer und motorischer Neurone (Wiese et al., 2001).

MEK-1 und MEK-2 gehören zu den dualspezifischen Kinasen, das heißt sie können sowohl Serin-/Threoninreste, als auch Tyrosin phosphorylieren (Dhanasekaran and Premkumar Reddy, 1998). Sie aktivieren die beiden MAPK ERK-1 und ERK-2 (extracellular regulated kinase, auch p44 und p42 MAPK genannt) durch Phosphorylation der Aktivierungsschleife. Für eine unterschiedliche Funktion der beiden Isoformen gibt es keine Hinweise. Im Gegensatz zum sehr engen Substratspektrum von MEK verfügen die Serin-/Threoninkinasen ERK-1 und ERK-2 über etwa 160 verschiedene Ziele in Zytoplasma und Zellkern (Yoon and Seger, 2006). Zu diesen gehören Transkriptionsfaktoren wie Ets, Elk und Myc, welche Einfluss auf die Expression verschiedener Gene ausüben. Auch die übrigen Substrate sind an Prozessen wie Wachstumsregulation, Proliferation und Transformation beteiligt. Zielgene, wie hbEGF, Amphiregulin und TGF α können über einen autokrinen Weg auch andere Signalwege aktivieren (Schulze et al., 2001). Entscheidend beeinflussen aber auch Dauer und Stärke der ERK Aktivität die Auswirkungen auf die Zelle (Marshall, 1995).

1.2.3.2. Ras-PI3 Kinase-PKB/Akt

Der Signalweg, der Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat Kinase (PI3-Kinase) und die Proteinkinase B (PKB, auch Akt genannt) einschließt, ist an der Regulation von Zellüberleben, Proliferation und Zellwachstum beteiligt. Seine Fehlregulation wird im Zusammenhang mit Neoplasien, Diabetes mellitus und Autoimmunerkrankungen gesehen (Di Cristofano et al., 1999, Vivanco and Sawyers, 2002). Er übermittelt Signale von verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen und Ras.

Die PI3-Kinase kommt in vielen Isoformen und Splicevarianten vor, die in drei Klassen eingeteilt werden. Klasse I A wird von Rezeptortyrosinkinasen aktiviert (Fresno Vara et al., 2004). Die PI3 Lipidkinasen sind Heterodimere aus einer regulatorischen Untereinheit p85 und einer katalytischen Untereinheit p110. Die p85 Untereinheit verfügt über zwei SH2 Domänen (SRC homology 2 domain) und eine Inter-SH2-Domäne, über welche die katalytische Einheit gebunden wird. Dazu kommen eine SH3 Domäne (SRC homology 3 domain) und eine BCR homologe Domäne (breakpoint cluster region), welche beide die p110 Domäne hemmen (Vivanco and Sawyers, 2002). PI3-Kinase bewirkt die Phosphorylierung des Inositolrings von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PI(3,4,5)P3) innerhalb weniger Sekunden nach Rezeptorstimulation (Fruman et al., 1998). Der Second-messenger PI(3,4,5)P3 führt zur Aktivierung von PKB/Akt. Die auf Phospholipide und Phosphoproteine wirkenden Phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10; auch MMAC1, mutated in multiple advanced cancers) beendet das Signal. Sie spaltet das anorganische Phosphat in 3' Position des Inositolrings wieder ab (Maehama and Dixon, 1998). In unstimulierten Zellen findet sich daher so gut wie kein PI(3,4,5)P3 (Vivanco and Sawyers, 2002). Als weitere Phosphatasen treten noch SHIP1 und SHIP2 auf.

Auch wenn meist von dem PI3-Kinase-PKB/Akt Signalweg die Rede ist, so gibt es doch eine ganze Reihe PKB/Akt unabhängiger Funktionen der PI3-Kinase. Neben PKB/Akt werden nämlich noch andere Kinasen der AGC-Familie aktiviert. Dazu gehören die serum and glucocorticoid inducible kinase (SGK), Proteinkinase C (PKC) und 70 kDa ribosomal S6 kinase (p70S6K), die ebenfalls an der Apoptoseregulation beteiligt sind (Wick and Liu, 2001).

Die Proteinkinase B (PKB, AKT) ist eine 57 kDa schwere Serin-/Threoninkinase. Ihr virales Gegenstück v-Akt ist an der Entstehung einer Leukämieform bei Mäusen beteiligt (Staal, 1987). Bei Säugetieren kommen die in unterschiedlicher Gewebsverteilung exprimierten Isoformen PKB α /Akt1, PKB β /Akt2 und PKB γ /Akt3 vor (Datta et al., 1999). Jede dieser Isoformen besitzt eine C-terminale regulatorische Domäne und eine N-terminale PH Domäne. Bei der PH Domäne handelt es sich um eine kugelförmige Domäne, die für die Bindung an PI(3,4,5)P3 sorgt und die Kinase an die Innenseite der Zellmembran bindet (Bottomley et al., 1998, Fruman et al., 1999, Rameh and Cantley, 1999). Dort erfolgt die Aktivierung mit Hilfe der konstitutiv

aktiven Kinase PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase) und einer zweiten weniger genau charakterisierten Kinase PDK2 (Osaki et al., 2004). Die aktivierte PKB/Akt löst sich von der Zellmembran und erreicht ihre Substrate in Zytoplasma und Nukleus (Delcomenne et al., 1998). Eines dieser Substrate ist die Glykogensynthasekinase GSK-3, die eine Verbindung zum Glukosestoffwechsel darstellt (Cross et al., 1995). Das Überleben von Zellen kontrollieren vor allem Substrate wie das proapoptotische Bcl-2 Protein BAD, Caspase-9, die Familie der Forkhead-Transkriptionsfaktoren und die Kinase $IKK\alpha$. Wird Bad durch PKB phosphoryliert, so bindet es an das 14-3-3 Protein und wird dadurch im Zytoplasma gehalten. Es kann dann die antiapoptotische Wirkung anderer Bcl-2 Proteine nicht mehr aufheben (Datta et al., 1997). Die Caspase-9 verliert durch die PKB/Akt-abhängige Phosphorylierung ihre enzymatische Aktivität (Cardone et al., 1998). Die Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Familie werden durch PKB/Akt an der Translokation in den Zellkern und Entfaltung ihrer Aktivität gehindert (Brunet et al., 1999). Diese Familie umfasst FoxO1 (FKHR), FoxO3 (FKHRL1) und FoxO4 (AFX). Zu ihren proapoptotischen Zielgenen gehören Fas Ligand, IGFBP-1 (IGF-binding protein 1) und das proapoptotische Bcl-2 Molekül Bim (Nicholson and Anderson, 2002). Über die Aktivierung der $I\kappa B$ Kinase α ($IKK\alpha$) bewirkt PKB/Akt die nukleäre Translokation und Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κB und der davon abhängigen Gene mit antiapoptotischer Wirkung (Ozes et al., 1999). NF- κB selbst gewinnt durch weitere PKB-abhängige Phosphorylierungen an transkriptioneller Aktivität (Madrid et al., 2001).

Eine Fehlregulation des PI3-Kinase-PKB/Akt Weges tritt am häufigsten in Form eines Ausfalles der inhibitorischen Phosphatase PTEN auf, daneben findet sich bei verschiedenen Tumoren eine Amplifikation der PI3-Kinase oder ihrer Komponenten (Samuels et al., 2004) oder der PKB/Akt (Zhou et al., 2001). Weiters sind Mutationen mit Aktivitätszuwachs der PI3-Kinase überwiegend in ihrer Kinasedomäne p110 α für Mamma- und Ovarialkarzinome beschrieben (Bader et al., 2005). Hereditär tritt eine Mutation von PTEN beim Cowden-Syndrom auf. Diese Mutationen wirken antiapoptotisch und begünstigen die Entstehung von Tumoren (Simpson and Parsons, 2001).

1.2.3.3. Januskinasen und Signal transducers and activators of transcription

Viele Zytokine wie Erythropoietin, Wachstumshormon (GH, growth hormone) oder die Interferone α , β und γ benutzen die Familie der Januskinasen (JAK) und Signal transducers and activators of transcription (STATs) zur Weiterleitung ihrer Signale. Diese sind damit an der Regulation unterschiedlichster zellulärer Reaktionen beteiligt. Die Zytokinrezeptoren, die über keine eigene Tyrosinkinaseaktivität verfügen, bedienen sich der vier Januskinasen JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2 (Aaronson and Horvath, 2002).

Die Januskinasen verdanken ihren Namen ihren beiden C-terminal gelegenen Kinase-Domänen JH1 und JH2, die an die zwei Gesichter des römischen Gottes erinnern. Die JH2 Domäne verfügt allerdings über keine eigene Kinaseaktivität, sie dient vielmehr der negativen Regulation der zweiten Tyrosinkinase Domäne (Rane and Reddy, 2000). In unstimulierten Zellen liegen die Januskinasen in inaktiver Form im Zytoplasma vor und lagern sich dann an Zytokinrezeptoren an, wenn diese durch Bindung ihres Liganden dimerisieren oder oligomerisieren (Watowich et al., 1994). Die JAK bilden daraufhin Homo- oder Heterodimere, die sich durch Autophosphorylierung aktivieren. Auch an den intrazellulären Anteilen der Rezeptoren schaffen sie durch Phosphorylierung Bindungsstellen für Phosphotyrosin-bindende Domänen weiterer Substrate (Briscoe et al., 1996).

Die bekanntesten davon, wenn auch nicht die einzigen, sind die STATs. Diese Transkriptionsfaktoren werden von den 7 Genen *stat1* bis *stat4*, *stat5a*, *stat5b* und *stat6* kodiert (Schindler and Darnell, 1995). Sie verfügen über eine DNA-bindende Domäne, gefolgt von einer SH3-ähnlichen und einer SH2 Domäne am C-terminalen Ende (Darnell, 1997). An diesem Ende befinden sich auch die Transaktivierungsdomäne (TA) sowie zwei konservierte phosphorylierbare Tyrosin- und Serinreste, die für ihre Aktivierung von Bedeutung sind. Dabei wird die Tyrosinseitenkette von JAK oder Src-Kinasen phosphoryliert und ermöglicht die Bildung von STAT Dimeren durch ihre SH2 Domänen und damit ihre Aktivierung (Schindler and Darnell, 1995). Die Phosphorylierung des Serins verstärkt die Transkriptionsaktivität an den entsprechenden responsiven Elementen (Wen and Darnell, 1997). Dieser Weg wird durch eine Vielzahl weiterer Adaptermoleküle moduliert, dazu gehören beispielsweise StIP und die SH2B/Lnk/APS Familie (Rawlings et al., 2004). Die negative Regulation des JAK/STAT Weges und Beendigung seiner Signale erfolgt durch drei Arten von Inhibitoren. Die Familie der

suppressors of cytokine signaling (SOCS) gehört zu den durch STAT aktivierten Zielgenen, sie binden an phosphorylierte Januskinasen sowie ihre Rezeptoren und unterbinden die Signalweiterleitung. Sie stellen damit eine negative Feedback Regulation dar (Alexander, 2002). Proteinphosphatasen (PTP, protein tyrosine phosphatases) wie zum Beispiel SHP-1 sind Tyrosinphosphatasen, die Januskinasen dephosphorylieren und damit deren Aktivität beenden (Greenhalgh and Hilton, 2001). Die Zink-bindenden Proteine mit RING-Finger Domäne der PIAS-Familie (protein inhibitors of activated stats) lagern sich an aktivierte STATs an und verhindern deren Bindung an die DNA. Die PIAS Familie modifiziert die STATs dabei allerdings auch durch Sumoylierung (Jackson, 2001). Das hierbei angehängte Protein SUMO (small ubiquitin related modifier) ist ein Ubiquitin-ähnliches Protein, das anders als Ubiquitin seine Zielproteine nicht nur zum Abbau markieren kann, sondern zu weiteren regulatorischen Funktionen in der Lage ist (Hochstrasser, 2001).

Der zunächst einfach erscheinende Signalweg wird durch Interaktion mit anderen Signalwegen, wie der zytoplasmatischen Kaskade noch deutlich komplexer (Heinrich et al., 2003).

Eine besondere funktionelle Bedeutung hat der JAK/STAT Weg in der angeborenen Immunität. Eine unkontrollierte Aktivität ist mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen verbunden (Ward et al., 2000). Mäuse, denen JAK3 fehlt, weisen erhebliche Defekte der Myelopoiese auf und entwickeln einen schweren kombinierten Immundefekt (SCID, severe combined immunodeficiency) (Nosaka et al., 1995, Thomis et al., 1995).

1.2.3.4. NF- κ B

Der NF- κ B Signalweg und seine abhängigen Transkriptionsfaktoren sind für ihre Beteiligung an Immun- und Entzündungsreaktionen bekannt. Sie spielen jedoch auch eine Rolle in der Apoptoseregulation. Die Rel/NF- κ B Familie besteht bei Vertebraten aus c-Rel, RelA (p65), RelB, p105/NF- κ B1 und p100/NF- κ B2, die in unstimulierten Zellen an inhibitorische Proteine aus der Familie der I κ B gebunden im Zytosol vorliegen. Den strukturell verwandten Rel-Proteinen ist eine N-terminal gelegene Rel homology domain (RHD) gemeinsam. Diese Domäne dient der Bildung von Homo- oder Heterodimeren, der Bindung an die DNA über spezifische NF- κ B Bindemotive und an ihre Inhibitoren aus der Familie der I κ B Proteine. Die Rel-Proteine lassen sich nach ihrer Regulation in zwei Gruppen einteilen. RelA, RelB und c-Rel erfahren eine

negative Regulation durch I κ B Proteine, während bei p105/NF- κ B1 und p100/NF- κ B2 diese Funktion eine große C-terminale Domäne übernimmt. Sie weist strukturelle Ähnlichkeit zu den I κ B Proteinen auf. Ihr C-terminales Ende hält die Dimere im Zytoplasma und wird nach Stimulation in der gleichen Weise wie die I κ B Proteine ubiquitinabhängig abgebaut, so dass die reifen Moleküle p50 und p52 entstehen. Die beiden Moleküle p50 und p52 verfügen im Übrigen über keine Transkriptionsaktivierungsdomäne, wie sie RelA, RelB und c-Rel besitzen. Dadurch wirken Dimere aus p50 und p52 als Transkriptionsrepressoren. Die Aktivität der Rel Proteine auf die Transkription einer Zelle wird durch die I κ B Familie (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , Bcl-3, p105/NF- κ B1 und p100/NF- κ B2) reguliert, indem diese die Verteilung der Rel/I κ B-Komplexe beeinflussen. Es besteht ein kontinuierlicher Transport dieser Komplexe in den Zellkern hinein und wieder heraus. Nur eine der beiden nukleären Translokationsdomänen (NLS/nuclear localization sequence), die im Bereich der Rel Homologie Domäne liegt, wird durch I κ B α im nicht aktivierten Komplex maskiert, damit ist der Transport in den Zellkern weiterhin möglich. I κ B α verfügt aber auch über ein nukleäres Exportsignal (NES/nuclear export signal), das in Verbindung mit dem Exportmechanismus, der deutlich effektiver als der Importmechanismus ist, dafür sorgt, dass der NF- κ B-I κ B α Komplex hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist (Huxford et al., 1998, Birbach et al., 2002). I κ B α ist das am besten untersuchte Mitglied dieser Familie und wird durch die I κ B Kinase (IKK) stimuliert.

IKK ist ein insgesamt 700-900 kDa schwerer Komplex aus zwei katalytischen Untereinheiten, IKK α mit 85 kDa und IKK β mit 87 kDa sowie einer 48 kDa schweren regulatorischen Untereinheit IKK γ . Für deren Aktivierung werden verschiedene übergeordnete Kinasen diskutiert, die zumeist in Überexpressionsexperimenten gefunden wurden. Dazu gehören NF- κ B-inducing Kinase (NIK) (Woronicz et al., 1997), MEK Kinase 1 (MEKK 1) (Lee et al., 1998), TGF- β activating Kinase 1 (TAK1) (Ninomiya-Tsuji et al., 1999) und NF- κ B-activating Kinase (NAK) (Tojima et al., 2000). Aktive IKK führt zur Phosphorylierung der I κ B Proteine an zwei Serinresten und schafft damit das Erkennungsmotiv für die E3RS^{I κ B/ β -TrCP} Ubiquitinligase. Nach Polyubiquitinierung baut das 26S Proteasom I κ B α proteolytisch ab, setzt die Rel Dimere frei und fördert den Transport in den Nukleus (Karin and Ben-Neriah, 2000). Die IKK ist in der Regel nur vorübergehend aktiv und wird zumindest nach TNF- α Stimulation durch Autophosphorylation am C-terminalen Ende wieder inaktiviert

(Delhase et al., 1999). Der kanonische Weg der Aktivierung der Rel Proteine führt über den Abbau der I κ B Proteine und ist vor allem für die unspezifische Immunabwehr bedeutsam (Senftleben et al., 2001b). Ein zweiter, alternativer Weg über die Prozessierung von NF- κ B 1 und 2 spielt in der Entwicklung der lymphatischen Organe und der spezifischen Immunabwehr eine Rolle (Senftleben et al., 2001a).

Im Nukleus erfolgt eine weitere Regulation der Rel Dimere, die über die Festlegung der intrazellulären Lokalisation hinaus geht und durch Phosphorylierung zur vollen Aktivierung der Transkription führt (Zhong et al., 1997). Dies ist für den Signalweg der PI3-Kinase über die von ihr aktivierte Serin-/Threoninkinase PKB/Akt beschrieben (Madrid et al., 2000). Diese bewirkt eine indirekte, IKK β vermittelte Phosphorylierung der C-terminal gelegenen Transaktivierungsdomäne 1 (TAD 1) von RelA. Bei IL-1 β stimulierten Zellen ist an der Modifikation der Aktivität von NF- κ B auch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) p38 beteiligt, die ihrerseits von PKB/Akt aktiviert wird und zusammen mit dem Koaktivator der basalen Transkriptionsmaschine CBP/p300 arbeitet (Madrid et al., 2001). Ein anderer Mechanismus beeinflusst NF- κ B Aktivität über die cAMP-abhängige Proteinkinase A. Typische Induktoren von NF- κ B, wie das bakterielle Lipopolysaccharide, virale Proteine, doppelsträngige RNA und ultraviolettes Licht, bewirken jedoch keine Veränderung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Die Proteinkinase A arbeitet hier auf eine cAMP-unabhängige Weise. Sie liegt als Tetramer aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Domänen im Zytosol vor und wird durch cAMP dadurch aktiviert, dass die beiden regulatorischen Domänen abgespalten werden. Ein Teil der katalytischen Untereinheiten liegt jedoch an I κ B α gebunden vor und kann unabhängig von cAMP reguliert werden. I κ B α und I κ B β unterdrücken die katalytische Aktivität der gebundenen PKA Einheiten. Werden die I κ B Proteine abgebaut, wird die Proteinkinase A aktiv und verstärkt die Transkriptionsaktivität von NF- κ B, indem es RelA an Serin 276 phosphoryliert (Zhong et al., 1997). Diese Phosphorylierung demaskiert die beiden Bindungsstellen für CREB bindendes Protein/p300 (CBP/p300). Eine Assoziation mit CBP/p300 verstärkt die transkriptionelle Aktivität der Rel Dimere (Zhong et al., 1998). Als weitere Modifikation des nukleären NF- κ B findet sich die Acetylierung. Es konnte gezeigt werden, dass CBP und p300, die beide über Histonacetyltransferaseaktivität verfügen, in Lage sind neben den Kern-Histonen auch RelA zu acetylieren. Diese Acetylierung verringert die Affinität zu

I κ B α . HDAC3, ein Vertreter der Histondeacetylasen, die nicht nur die Chromatinstruktur über Deacetylierungen ändern können, sondern auch andere Transkriptionsfaktoren deacetylieren, ist an RelA gebunden. HDAC3 entfernt die Acetylgruppen und erhöht damit wieder die Affinität für I κ B. (Chen et al., 2001).

Das NF- κ B Signal wird durch neu gebildetes I κ B α beendet. I κ B α ist eines der NF- κ B abhängigen Zielgene (Brown et al., 1993) und wirkt damit als negativer Feedback Regulator. Es hat eine höhere Affinität zu dem im Kern an die DNA gebundenen NF- κ B als zu dem im Zytoplasma befindlichen (Turpin et al., 1999). In einem energieabhängigen Prozess werden NF- κ B und das daran gebundene I κ B aus dem Zellkern exportiert.

1.3. Ziel der Arbeit: Die Rolle von NF- κ B und MEK in der Apoptosesuppression durch Raf

Frühere genetische und zellbiologische Experimente haben die Fähigkeit von Raf zur Apoptosesuppression untermauert. Im Einzelnen bleibt jedoch die Frage offen, wie Raf diese Kontrolle ausübt. Neben den direkten Effekten von Raf auf Schlüsselproteine der Zellüberlebenskontrolle, die in der Vergangenheit gezeigt wurden (Wang et al., 1996a), gibt es auch indirekte Effekte über die Aktivierung von PI3-Kinase und PKB/Akt (von Gise et al., 2001). Wir haben beschrieben, dass onkogenes Raf den Transkriptionsfaktor NF- κ B in epithelialen Zellen und Fibroblasten effizient aktiviert (Troppmair et al., 1998, Zhong et al., 2001). Im letzteren Zellsystem war NF- κ B auch für die zelluläre Transformation notwendig. Viele Produkte NF- κ B regulierter Gene sind an der Zellüberlebenskontrolle beteiligt (Pahl, 1999). Wir stellten daher die Frage, ob es in den von uns in der Vergangenheit intensiv studierten 32D-Zellen nach Expression von konstitutiv aktiviertem Raf zur Aktivierung von NF- κ B kommt, und ob diese Aktivierung wesentlich ist für die Fähigkeit von Raf apoptotischen Zelltod – ausgelöst durch den Entzug des Wachstumsfaktors IL-3 – zu unterdrücken.

In einem zweiten Ansatz sollte die Rolle von MEK weiter aufgeklärt werden, das wir bereits in der Vergangenheit als Effektor von Raf in der Zellüberlebenskontrolle charakterisiert haben. So ermöglichte die Expression einer hyperaktiven Mutante von MEK (Δ StuI-LIDEMANE), das Wachstum von 32D-Zellen (FID-Zellen) in der Abwesenheit des essentiellen Faktors IL-3. Die dafür verantwortlichen Mechanismen

sollten untersucht werden. Diese Beobachtung unterstreicht die Rolle von MEK als Effektor von Raf in der Apoptosesuppression, widerspricht jedoch der in der Literatur vorherrschenden Beobachtung, dass die Expression eines einzelnen Onkogens nicht in der Lage ist faktorabhängige Zellen in Abwesenheit dieses Faktors wachsen zu lassen (Blasi et al., 1985).

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte und Chemikalien

Brutschränke	Heraeus (Hanau)
Filmkassetten	Kodak (Rochester)
Feinwaage	Sartorius (Göttingen)
Filme	Amersham (Little Chalfont)
Filmentwickler	Agfa (Leverkusen)
Grobwaage	Sartorius (Göttingen)
Gussform für Polyacrylamidgele	BioRad (München)
Heizblöcke	IKA (Staufen)
Kühlzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Magnetrührer	IKA (Staufen)
Mikroskop	Leitz (Wetzlar)
Netzgeräte	BioRad (München)
pH-Meter	VWR (Wien)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Sterilbank Lamin Air HB 2448	Heraeus (Hanau)
Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Vortex-Gerät	Scientific Industries Inc. (USA)
Westernblot-Kammer	BioRad (München)
Zählkammer	Neolab (Heidelberg)
Zentrifuge	Heraeus (Hanau)
Chemikalien	
Acrylamid (30%), Bisacrylamid (0,8%)	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Dianova (San Diego)
Dimethylsulfat DMSO	Sigma (St. Louis)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)

Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
10 x Phosphat gepufferte Lösung (PBS)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Protein – Größenmarker (vorgefärbt)	Sigma (St. Louis)
TEMED	Calbiochem (Bad Soden)
Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Sigma (St. Louis)

Verbrauchsmaterialien

Nitrozellulose	Schleicher & Schüll (Dassel)
Röntgenfilme	Amersham (Little Chalfont)
Whatman 3 MM Papier	Schleicher & Schüll (Dassel)

2.1.2. Antikörper und Sekundärantikörper

Primärantikörper

VSV	Sigma V5507, 1:1000
c-myc	9E10 MSZ, 1:200
I κ B α	Santa Cruz (sc-371), 1:1000
ERK 1	Santa Cruz (sc-94), 1:1000
Cyclin A	Santa Cruz (sc-596), 1:1000
Cyclin B	Santa Cruz (sc-245), 1:1000
p 21	Santa Cruz (sc-471), 1:1000
CdK 4	Santa Cruz (sc-601), 1:1000
C-Raf	MSZ, 1:1000
IKK β	Santa Cruz (sc-7607), 1:1000
Cyclin D1	Santa Cruz (sc-717), 1:1000
Cyclin D2	Santa Cruz (sc-181), 1 :1000
p 27	Santa Cruz (sc-776), 1 :1000
pI κ B α	Cell Signaling Technology, Inc. #2859, 1:1000
pRb	Cell Signaling Technology, Inc. #9308, 1:1000
pERK	Santa Cruz (sc-7976), 1:1000

Sekundärantikörper

Anti-mouse IgG, HRP coupled Amersham (Little Chalfont)

Anti-rabbit IgG, HRP coupled Amersham (Little Chalfont)

2.1.3. Zellkulturmedien und Zelllinien

Dulbecco´s modified eagle medium (DMEM) Invitrogen (Carlsbad, USA)

Fötales Rinderserum (FBS) PAA (Linz)

L-Glutamin Invitrogen (Carlsbad, USA)

Penicillin/Streptomycin Invitrogen (Carlsbad, USA)

RPMI 1640 Invitrogen (Carlsbad, USA)

Verbrauchsmaterialien

Trypanblau Invitrogen (Carlsbad, USA)

Zellkulturflaschen Sarstedt (Nümbrecht)

32D-Zellen: RPMI 1640, L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin, 10% FCS, 15% Wehi CM, Kultur bei 37 °C, 5% CO₂, 99% Luftfeuchtigkeit.

Wehi CM (Wehi-conditioned medium)

Überstand einer Kultur der Zelllinie Wehi 3B. 5 x 10⁵ Zellen werden in frischem RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin ausgesät. Nach zwei Tagen werden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Das Wehi CM wurde bis zu seiner Verwendung bei –20 °C gelagert.

Zelllinien

32D-Zellen

32D-Zellen sind multipotente, hämatopoetische Vorläuferzellen. Sie stammen aus Kulturen murinen Knochenmarks, die nicht adhärente Zellpopulationen bilden. Sie kann Kolonien von Granulozyten und Mastzellen hervorbringen, ohne erkennbare Differenzierung zu anderen Wegen. Weiters gibt es Subpopulationen mit

unterschiedlicher Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren, so ist der Klon 3 (32D3) abhängig von IL-3, das in WEHI-3 konditioniertem Medium vorkommt (Greenberger et al., 1983).

FID-Zellen

Die FID-Zellen (factor independent) sind Abkömmlinge der 32D-Zellen, die unabhängig von IL-3 wachsen können. Sie entstanden als überlebender Subklon aus 32D-Zellen, die mit der konstitutiv-aktiven MEK-Mutante Δ StuI-MEK-LIDEMANE infiziert wurden und in Wachstumsfaktor freiem Medium kultiviert wurden.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen (Laminair, Heraeus) mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen, mit sterilisierten Kunststoffmaterialien und autoklavierten Glasartikeln durchgeführt. Die Zelllinien wurden bei 37 °C, 5% CO₂ Konzentration und gesättigter Luftfeuchtigkeit gehalten.

2.2.1.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen können durch Einfrieren bei –80 °C im Gefrierschrank, beziehungsweise in flüssigem Stickstoff bei –196 °C, längere Zeit gelagert werden. Dazu gibt man die Zellen in ein spezielles Einfriermedium:

Für 50 ml: 37,5 ml Zellkulturmedium mit 10% FCS
5,0 ml FCS
7,5 ml DMSO

Die Zellsuspension muss 15 Minuten lang bei etwa 230 x g in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge pelletiert werden. Nachdem der Überstand abgegossen wurde, suspendiert man die Zellen erneut in ebenfalls auf 4 °C gekühltem Einfriermedium und gibt sie in beschriftete 1,2 ml Tiefkühlröhrchen. Zum Transport lagert man die Röhrchen auf Eis, bevor sie in die nummerierten Fächer des –80 °C Tiefkühlschranks kommen. Eine längere Lagerung erfolgt in flüssigem Stickstoff. Zur

Rekultivierung werden die Zellen rasch aufgetaut, in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, pelletiert und der DMSO-haltige Überstand entfernt. Anschließend resuspendiert man die Zellen in frischem Kulturmedium.

2.2.1.2. Anreichern lebender Zellen mit Hilfe von Lympholyte-M Medium

Haben sich in einer Kultur suspendierter Zellen viele tote Zellen angesammelt, kann es die Durchführung und Auswertung geplanter Experimente erleichtern, wenn vor Beginn des Experiments abgestorbene Zellen entfernt werden.

Dazu bedient man sich der Tatsache, dass sich lebende und tote Zellen in ihrer Dichte unterscheiden. Lymphozyten und hämatopoetische Vorläuferzellen wie die 32D-Zellen, die in ihrem Medium über Lympholyte-M geschichtet sind, sammeln sich während der Zentrifugation an der Grenzschicht zwischen beiden Medien an, tote Zellen sinken aufgrund ihrer höheren Dichte auf den Boden.

Ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen wird mit 5 ml 18 °C warmem Lympholyte-M Medium gefüllt (Lagerung bei 4 °C). Die Lympholyte-Phase wird mit den in ihrem Kulturmedium suspendierten Zellen überschichtet, die beiden Phasen dürfen sich dabei nicht vermischen. Die Zentrifugation erfolgt bei 800 x g für 20 bis 30 Minuten. Die Bremse der Zentrifuge sollte ausgeschaltet sein, damit sich die aufgetrennten Phasen am Ende durch abrupte Verzögerung nicht wieder vermischen. Die obere Phase wird bis auf wenige mm zur Grenzschicht hin entfernt, die Grenzschicht mit den lebenden Zellen mit einer kleinen Pipette aufgenommen und in 6 ml Kulturmedium gewaschen, die Zellen bei 230 x g pelletiert, bevor sie wieder kultiviert werden.

2.2.1.3. Infektion

Eine Infektion mit Retroviren dient dem Gentransfer von DNA in Säugerzellen. Sie stellt in vielen Fällen die effizienteste Technik dar, funktionale Gene einzuschleusen und zu exprimieren. Neben dem eigentlich interessierenden Gen wird meist auch ein Selektionsmarker, beispielsweise ein Resistenzgen gegen ein bestimmtes Antibiotikum, übertragen. Dies ermöglicht durch Selektion in dem entsprechenden Antibiotikum einen Pool erfolgreich infizierter Zellen herzustellen.

2.2.1.3.1. Herstellung von Virus-Überstand

Als Verpackungszellen für retrovirale Vektoren dienen adhärent wachsende Phoenix Zellen, die auf humanen embryonalen Nierenzellen basieren und dahingehend modifiziert sind, dass sie die Gene für alle viralen Proteine enthalten, die zu der Herstellung funktionierender Viruspartikel benötigt werden. Die Zellen sind daher in der Lage, infektiöse Viren zu produzieren. Die später infizierten Zielzellen können dies nicht, in ihnen können sich die Viren auch nicht mehr replizieren. Die Verpackungszellen werden mit EGZ Vektoren transfiziert, in die das interessierende Gen kloniert wurde. Das EGZ Virus enthält auch ein Resistenzgen gegen ein bestimmtes Antibiotikum. Durch Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum können Zellen angereichert werden, die das Plasmid stabil integriert haben, es entstehen so genannte Zellpools. Diese Zellen produzieren nun infektiöse Viren, die das gewünschte Plasmid enthalten und geben sie in ihr Kulturmedium ab. Nachdem die Zellen konfluent gewachsen sind, wird frisches Kulturmedium zugegeben und nach drei Tagen der Virusüberstand geerntet, in einen 15 ml Röhrchen für 8 Minuten bei 230 x g zentrifugiert. Etwa 8 ml des Überstandes werden, mit einigem Sicherheitsabstand zum Zellpellet am Boden, mit einer Einweg-Kunststoffpipette entnommen und durch ein 0,45 µm Filter in ein neues 15 ml Röhrchen sterilfiltriert. Der Virusüberstand kann entweder sofort verwendet werden oder bei – 80 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

2.2.1.3.2. Spininfektion

Vor Beginn der Infektion wird die Viabilität und die Zelldichte der zu infizierenden Zellen mit Hilfe der später beschriebenen Trypanblau Färbung bestimmt. 5×10^5 32D-Zellen, die am Tag zuvor gesplittet wurden, werden zusammen mit 1 ml Virusüberstand und 750 µl Wehi-Kulturmedium in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vermischt. Nach Zugabe von Polybrene bis zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml (Vorratslösung 5 mg/ml) wird die Zellsuspension für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 bis 4 Stunden lang mit 1180 x g bei 30 °C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt, die Zellen in 4 ml Wehi-Medium resuspendiert und in 6 well Schalen ausgesät. Nach 36 bis 48 Stunden im Brutschrank kann die Selektion der Zellen mit dem entsprechenden Antibiotikum beginnen.

2.2.1.3.3. Selektion

Neben dem eigentlich interessierenden Gen wird ein Selektionsmarker mit in die infizierte Zelle eingeschleust. Damit überlebt eine Zelle, die das Konstrukt aufgenommen hat, auch in einem Kulturmedium, das mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt ist. Zellen die nicht erfolgreich infiziert wurden sterben ab und es entsteht ein Pool von stabil transfizierten Zellen. Die minimal tödliche Konzentration für Zellen ohne Resistenzgen hängt von der Zelllinie und Art des Antibiotikums ab und wird in Vorversuchen ermittelt.

Die 32D-Zellen wurden mit Zeocin in einer Dosierung von 5 µl/ml (Vorratslösung 100 mg/ml, dunkel lagern!) behandelt. Zeocin ist ein interkalierendes Antibiotikum aus der Familie der Bleomycin Antibiotika, das DNA Stränge bricht. Es wirkt am effektivsten bei aerobem Metabolismus der Zellen.

Selektionsmedium: (Ansatz für 50 ml)

RPMI 1640 (Penicillin/Streptomycin, Glutamin, 10% FCS)	42,5 ml
Wehi-Zellkulturüberstand	7,5 ml
Zeocin (tiefgekühlt im 1 ml Cap)	250 µl

Aus den Schalen mit den zu selektionierenden Zellen wird zunächst das alte Kulturmedium vorsichtig von der Oberfläche abgesaugt und das Selektionsmedium zugegeben. Die Inkubation erfolgt für 4 bis 6 Stunden bei 10 °C, da Zellen, die sich nicht teilen, besonders effektiv abgetötet werden. Nach zwei Tagen, wenn das Selektionsmedium durch neues ersetzt wird, zeigt sich die Wirkung auf nicht infizierte Zellen durch einen ansteigenden Anteil von toten Zellen in der Trypanblau-Färbung. Der Erfolg der Selektion kann, ebenso wie die Infektionseffizienz, durchflußzytometrisch kontrolliert werden.

2.2.1.4. Survival assay

Die Überlebensexperimente oder survival assays untersuchen die Auswirkung zusätzlich exprimierter Proteine auf das Überleben der 32D3 Zellen, wenn sie in IL-3 freiem Medium kultiviert werden. Als Kontrolle dienen Zellen die nur mit einem Leervektor infiziert wurden.

Zu Beginn des Versuchs muss das IL-3, das im Kulturmedium der 32 D Zellen enthalten ist, gründlich entfernt werden. Dazu werden die Zellen in dem üblichen Kulturmedium gewaschen, das hier allerdings kein IL-3 enthält.

Die Proben aus dem Selektionsmedium kommen in 15 ml Zentrifugenröhrchen und werden für 8 Minuten bei 230 x g, 18 °C abzentrifugiert, daraufhin wird der Überstand abgesaugt und das Pellet in 8 ml des IL-3 freien Mediums resuspendiert. Der Waschvorgang wiederholt sich dreimal. Anschließend bestimmt man durch Trypanblau-Färbung Zelldichte und Viabilität. Die Viabilität der Zellen sollte vor Beginn des IL-3 Entzugs möglichst hoch sein, um auch eine verwertbare Aussage über den Effekt des Wachstumsfaktorentzugs treffen zu können. Die Zellen werden dann, soweit nicht anders angegeben mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro ml in 24 well Schalen ausgesät. Die berechnete Menge der Zellsuspension wird in die wells pipettiert und mit IL-3 freiem Medium auf 0,5 ml verdünnt. Dabei sind drei wells für die Auszählung in Trypanblau reserviert und für die drei Auswertungszeitpunkte in der Propidiumiodid-Färbung werden vier wells ausgesät, die zu den entsprechenden Zeitpunkten gepoolt werden, um genügend Zellen für FACS Analyse zu erhalten. Der Inhalt der vier wells für den ersten Zeitpunktes zur FACS Kontrolle wird gleich wieder entnommen und zur Durchflußzytometrie vorbereitet. Die Schalen mit den restlichen Proben kommen bis zu den entsprechenden Auswertezeitpunkten in den Brutschrank.

2.2.1.5. Kokultur-Experiment

Die durchgeführten Kokultur-Experimente sollten dazu dienen einen nur im direkten Zell-Zellkontakt wirksamen protektiven Faktor nachzuweisen, mit dem eine Zellpopulation eine andere vor durch Wachstumsfaktor-Entzug ausgelöster Apoptose bewahrt, beziehungsweise ihre Proliferation ermöglicht.

Das Experiment verläuft im Wesentlichen wie der unter 2.2.1.4. dargestellte survival-assay, wobei der Unterschied darin besteht, dass hier zwei unterschiedliche Zellpools in einer Kulturflasche untersucht werden. Neben dem Überleben der gesamten Zellen interessiert noch ein unterschiedliches Überlebensverhalten der beiden Populationen. Dazu wurden die 32D-Zellen mit einem für GFP kodierenden Plasmid transfiziert. In der Durchflußzytometrie sind die beiden Populationen im FL1-H Kanal unterscheidbar, die GFP-positiven Zellen zeigen eine deutliche höhere Signalstärke. Bei Einrichtung eines entsprechenden gates im

Forwardscatter/Sidescatter-Diagramm, lässt sich auch der jeweilige Anteil an den lebenden Zellen zu den jeweils gemessenen Zeitpunkten bestimmen.

2.2.1.6. Trypanblau-Färbung

Die Trypanblau-Färbung ermöglicht es mikroskopisch lebende von toten Zellen zu unterscheiden und die Viabilität der Zellen in einer Suspension zu bestimmen. Die Methode beruht darauf, dass lebende Zellen mit intakter Membran für den Farbstoff impermeabel sind und daher unter dem Lichtmikroskop weiß leuchtend erscheinen, während die toten Zellen die Farbe aufnehmen und blau erscheinen. Zur Analyse wird das Kulturmedium einer Pipette gründlich durchmischt, um die Zellen gleichmäßig zu suspendieren. Eine 20 µl Probe wird mit der gleichen Menge Trypanblaulösung in einer 96 well Platte gemischt und unter dem Mikroskop in einem Hämatozytometer ausgezählt. Die Viabilität ist der Quotient aus lebenden Zellen und der gesamten Zellzahl. Die Zelldichte wird wegen der vorherigen Verdünnung mit zwei multipliziert.

2.2.2. Proteindetektion

Die beiden folgenden Methoden wurden kombiniert angewandt um gesuchte Proteine anhand ihrer Größe und Antikörperreaktivität nachzuweisen.

2.2.2.1. Western Blotting

Western Blotting ist eine Methode zum Nachweis von Proteinen. Dazu trennt man diese nach ihrer Größe in einem Polyacrylamid-Gel im elektrischen Feld auf und detektiert sie anschließend mit spezifischen Antikörpern.

Die Proteine werden durch Erhitzen und durch reduzierende Substanzen im Laemmli-Puffer denaturiert und die Disulfidbindungen gelöst. Das polyanionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich im Sättigungsbereich weitgehend proportional zum Molekulargewicht im Verhältnis 1,4 g SDS zu 1 g Protein an, dabei werden auch Wasserstoffbrückenbindungen in den Polypeptiden gelöst und damit die Sekundär- und Tertiärstruktur aufgehoben. Daher laufen die SDS-Polypeptidkomplexe im Polyacrylamidgel unabhängig von ihrer Sequenz indirekt proportional zu ihrer molekularen Masse. Im Vergleich mit Proteinmarkern bekannter Größe lässt sich, die das Molekulargewicht der untersuchten Proteine abschätzen.

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wird in einem diskontinuierlichen Puffersystem ausgeführt, das heißt die Puffer in Sammelgel und dem eigentlichen Trenngel unterscheiden sich im pH Wert von einander. Im weniger dichten Sammelgel mit niedrigem pH liegt das Glycin des Puffers als Kation oder Zwitterion vor und läuft damit als langsamerer Folgeion hinter dem Chlorid des Puffers, das hier als Leitton dient, zur Anode. Zwischen Leitton und Folgeion kommt es zu einer lokal erhöhten Spannung, durch die auch die Proteine beschleunigt und weitgehend unabhängig von ihrer Größe gleichzeitig an der Grenze zum Trenngel ankommen lässt. Im höheren pH des Trenngelpuffers deprotoniert das Glycin und läuft als Anion zusammen mit dem Chlorid. Die lokale Spannungserhöhung fällt weg und die Proteine werden im feinmaschigeren Trenngel nach ihrer Größe aufgetrennt.

Probenvorbereitung

Die Proteine werden aus intakten Zellen gewonnen. Die Zellsuspension wird mit 230 x g für 10 Minuten bei 18 °C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Danach nimmt man die Zellen wieder in 5 ml PBS auf, zentrifugiert sie nochmals unter gleichen Bedingungen und saugt den Überstand ab. Das Pellet transferiert man in 1 ml PBS in einen Eppendorf Cap. Nach weiteren 10 Minuten Zentrifugation in der Eppendorf Tischzentrifuge mit 300 x g wird der PBS-Puffer sorgfältig abgesaugt, um eine einheitliche Proteinkonzentration in allen Proben zu erhalten. In jedem Cap werden die Proben zusammen mit 200 µl Laemmli-Puffer im Heizblock für 5 Minuten auf 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen können die Proben weiterverarbeitet werden.

Laemmli-Puffer

Bromphenolblau	0,04%
Glycerol	10%
SDS	2%
Tris Base pH 6,8	0,0625 M
β-Mercaptoethanol	5%

Herstellung des Gels

Zu Beginn ist es günstig zu wissen, in welchem Größenbereich das erwartete Molekulargewicht der Proteine liegt, die man analysieren möchte, da die

Konzentration an Acrylamid im Gel den linearen Bereich der Auftrennung bestimmt. Dieser liegt beispielsweise für ein 10%iges Gel im Bereich zwischen 16 und 68 kDa. Zunächst wird die Gussform der Gele nach Beschreibung des Herstellers zusammengesetzt, die Gele werden zwischen zwei gut gereinigten und entfetteten Glasplatten gegossen. Da Acrylamid und N,N'-methylenbisacrylamid neurotoxisch sind, sollten für die Herstellung der Gele und ihre spätere Verwendung Handschuhe getragen werden. Man setzt zunächst das Trenngel der gewünschten Konzentration, hier meist 12,5%, in einem 50 ml Röhrchen an. Für 4 Gele reichen 40 ml.

Trenngel

40% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	13 ml
Trenngelpuffer	12,6 ml
Trisbase 1,5 M pH 8,8	
SDS 0,4%	
Destilliertes Wasser	12,2 ml
Ammoniumpersulfat 10%	400 µl
TEMED	40 µl

Die Polymerisation beginnt nach der Zugabe von TEMED (N,N,N',N'-teramethylethylendiamin), der Ansatz wird noch einmal gemischt und zügig in die Formen gegossen. Das mit Isopropanol überschichtete Trenngel polymerisiert nun in etwa 30 Minuten aus und kann an dem im Röhrchen verbliebenen Rest verfolgt werden. Man lässt nun das Isopropanol von der Oberfläche ablaufen und setzt 20 ml Sammelgel an.

Sammelgel

40% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	2,6 ml
Sammelgel-Puffer	5 ml
Trisbase 0,5 M pH 6,8	
SDS 0,4%	
Destilliertes Wasser	12,2 ml
Ammoniumpersulfat 10%	200 µl
TEMED	20 µl

Jeweils 5 ml des Sammelgels werden auf die Oberfläche des auspolymerisierten Trenngels pipettiert und die passenden Teflonkämme blasenfrei eingesetzt, um später die Taschen für die Proteinproben zu erhalten. Nach dem Auspolymerisieren werden die Kämme entfernt, die Taschen mit deionisiertem Wasser ausgewaschen und die benötigten Gele in die Elektrophoreseapparatur eingebaut. Das obere und untere Reservoir der Apparatur wird mit Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer, dem Laufpuffer, gefüllt. Dabei achtet man darauf, dass sich keine Luftblasen bilden, die lokal als Isolatoren wirken würden und einen gleichmäßigen Lauf verhindern.

Laufpuffer

Trisbase pH 8,3	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1%

Die Taschen können jetzt mit jeweils 15 µl Probe gefüllt und die Spannungsquelle angeschlossen werden. Stromstärke und Zeitschaltuhr werden eingestellt, nach dem Lauf kann das Gel zum Blotten entnommen werden.

Blotten

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine werden im elektrischen Feld auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dort sind sie immobilisiert und für weitere Untersuchungen mit spezifischen Antikörpern zugänglich. Die Elektroblokkammer ist mit Transferpuffer gefüllt.

Transferpuffer

Trisbase pH 8,3	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1%
Methanol	20%

Passend zur Größe des Gels werden die Nitrozellulosemembran und einige Blatt Whatman-Papier zurechtgeschnitten. Beide werden mit Transferpuffer angefeuchtet, die Nitrozellulosemembran blasenfrei auf das Gel gelegt und beide Seiten anschließend mit den Whatman-Papieren bedeckt. Zwischen Schwämmchen auf

beiden Seiten baut man das Ganze in die Halterung ein und setzt es so in die Elektroblokkammer ein, dass die Nitrozellulosemembran auf der Anodenseite und das Gel auf der Kathodenseite liegen. Bei konstantem Strom von 850 mA dauert der Transfer 1h.

2.2.2.2. Immunoblot

Die Proteine auf der Oberfläche einer Nitrozellulosemembran können durch Bindung von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Ein zweiter Antikörper, der gegen den Fc-Teil des ersten, spezifischen Antikörpers gerichtet ist und mit einem Enzym, hier Meerrettichperoxidase, gekoppelt ist zeigt das gesuchte Protein, indem er mit einem geeigneten Substrat reagiert und dabei Licht emittiert, das einen Röntgenfilm an der Stelle des Proteins schwärzt. Das in dem ECL-Reagens (Enhanced Chemoluminescence) enthaltene Phenol verstärkt durch vermehrte Oxidation die Lichtausbeute, die nach etwa 20 Minuten den höchsten Wert erreicht. Um unspezifische Bindungen beider Antikörper an die Membran zu vermeiden, wird diese für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer flachen Schale in Blockierpuffer auf dem Horizontalrotator bewegt.

Blockierpuffer

PBS mit 0,05% Tween-20

Trockenmilchpulver (Carnation™) 5%

Der erste Antikörper wirkt ebenfalls auf dem Rotator eine Stunde bei Raumtemperatur ein, er ist entsprechend der Herstellerangabe in Blockierpuffer verdünnt. Alternativ besteht auch die Möglichkeit den Antikörper über Nacht im Kühlraum bei 4 °C zu inkubieren. Ungebundener Antikörper wird entfernt, indem die Membrane dreimal für 10 Minuten in Puffer gewaschen wird.

Puffer

PBS mit 0,05% Tween-20

Der zweite Antikörper wird entsprechend der Herstellerangabe in einer Mischung aus 2/3 Puffer und 1/3 Blockierpuffer verdünnt, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Er wirkt für eine Stunde ein, hinterher wird wieder dreimal gewaschen.

Das an den zweiten Antikörper gebundene Enzym setzt das mit dem ECL-Reagens um. Das ECL-Reagens enthält Luminol, ein Substrat der Meerrettichperoxidase, das nach seiner Oxidation in einen angeregten Zustand übergeht und Licht emittiert. Die in dem ECL-Kit enthaltenen Lösungen 1 und 2 werden im Verhältnis 1 zu 1 in einem Röhrchen angemischt, man benötigt pro cm^2 Membranfläche 0,125 ml fertige Lösung. Der Waschpuffer soll von der Membran ablaufen, die in einer neuen Schale eine Minute mit der fertigen ECL-Lösung inkubiert wird. Nachdem die Flüssigkeit abgetropft ist, wird die Membran in Folie eingepackt. In einer Filmkassette belichtet sie zunächst für eine Minute ein Blatt ECL-Hyperfilm. Die endgültige Belichtungsdauer richtet sich nach der Stärke der ECL-Reaktion und wird, falls nötig, in mehreren Versuchen ermittelt.

Wiederverwenden von Westernblots auf Nitrozellulosemembranen

Gelegentlich sollen auf einem Westernblot unterschiedliche Proteine mit verschiedenen Primärantikörpern nachgewiesen werden. Dazu ist es nötig, bereits gebundene Antikörper zu entfernen. Die Membran wird nach der Belichtung 5 Minuten in PBS/Tween-20 Puffer gewaschen. In einen Glasbehälter, der in einem 50°C warmen Wasserbad steht, wirkt der Glycin Stripping Puffer 30 Minuten lang ein.

Glycin Stripping Puffer

0,2 M Glycin-HCl, pH 2,5

0,05% Tween-20

100 mM 2-Mercaptoethanol

Anschließend wäscht man die Membran mindestens viermal 5 Minuten lang in PBS/Tween-20 Puffer, bis der 2-Mercaptoethanolgeruch verschwunden ist. Optional kann jetzt mit ECL-Reagens überprüft werden, ob der ursprüngliche Sekundärantikörper vollständig entfernt wurde. Vor der erneuten Verwendung muss die Membran wie oben beschrieben mit Blockierpuffer behandelt werden.

2.2.3. Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Die Durchflußzytometrie ist eine Technik zur schnellen Charakterisierung einzelner Zellen, die in einem Flüssigkeitsstrom an einem Messpunkt vorbeischwimmen und dabei von einem Laserstrahl erfasst werden. Auf der Grundlage von Lichtstreuung

und Fluoreszenz werden von jedem registrierten Partikel mehrere Parameter gemessen und gespeichert. Mit dieser Methode lässt sich, abhängig von der Vorbereitung der Proben eine Vielzahl von Fragestellungen beantworten. Die Geräte können die Werte der einzelnen Partikel entweder nur erfassen oder die Partikel auch nach bestimmten, vorher festgelegten Merkmalen sortieren, daher auch der Name FACS (fluorescence-activated cell sorting). Hier wurden mittels der Propidiumiodid-Färbung der DNA-Gehalt der Zellen in einer Suspension bestimmt und zwei Zellpopulationen, von denen eine das fluoreszierende Molekül GFP exprimiert in einer gemeinsamen Zellsuspension unterschieden. Die Daten wurden mit dem FACS Gerät „FACSCalibur™“ (Becton & Dickinson) erfasst und mit dem Programm „Cell Quest™“ analysiert.

2.2.3.1. Propidiumiodid (PI)-Färbung

Propidiumiodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff der an Nukleinsäuren bindet. Der rote Farbstoff wird nach Anregung mit dem Argon-Ionen-Laser (488 nm) im FL2-Kanal mit einem Emissionsmaximum bei 639 nm erfasst. Nach Fixation und Behandlung der Zellen mit Ribonuklease zum Abbau der in den Zellen vorhandenen RNA, welche die Messung verfälschen würde, wird nur noch der DNA-Gehalt der Zellen bestimmt. Damit lässt sich eine Aussage über den Zellzyklus treffen. Als einer der Endpunkte des apoptotischen Prozesses wird Doppelstrang-DNA zwischen den Nukleosomen geschnitten. Die kleinen Fragmente können in den fixierten Zellen durch die Membran entweichen, der DNA Gehalt dieser apoptotischen Zellen ist damit niedriger als der von Zellen die sich im übrigen Zellzyklus befinden. Man kann solche Zellen daher im DNA-Histogramm als hypoploide Zellen am sub-G1-Peak erkennen. Für die Propidiumiodid-Färbung werden 1×10^6 Zellen pelletiert, zweimal in PBS gewaschen und in 0,5 ml PBS mit 1% FCS resuspendiert. Dazu kommen unter Bewegung auf dem Vortex 5 ml auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten Ethanols. Die Zellen lagern über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, danach pelletiert man die Zellen, resuspendiert sie in 0,75 ml PBS mit 1% FCS gibt 0,01 ml RNase A (10 mg/ml) und 0,25 ml Propidiumiodid Lösung (200 $\mu\text{g/ml}$) hinzu und inkubiert für zwei Stunden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bis zur Analyse im FACS-Gerät lassen sich die Proben bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern.

2.2.3.2. Green fluorescent protein-Markierung

Green fluorescent protein (GFP) ist ein Protein, das in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckt wurde und nach Anregung durch ultraviolettes Licht im sichtbaren Spektrum grün fluoresziert. Durch Mutationen optimierte Varianten dieses Proteins können retroviral infizierten Zellen in Kultur exprimiert werden und diese Zellen für die FACS-Analyse markieren. Die Veränderungen zielten vor allem auf niedrigere Toxizität für die infizierten Zellen und Temperaturunempfindlichkeit im Bereich der üblichen Zellkulturtemperaturen. Im FL1-Kanal des FACS-Geräts wird das vom GFP emittierte Licht erfasst und die Unterscheidung von Zellen nach GFP Expression ermöglicht.

2.2.4. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Der electrophoretic mobility shift assay ist eine Methode zum Nachweis sequenzspezifischer Bindungen, hier zwischen radioaktiv markierter DNA und einem Protein. Das Prinzip beruht darauf, dass ein kurzes (etwa 25 Basenpaare langes), ungebundenes, radioaktiv markiertes DNA Oligonukleotid sehr schnell durch ein nichtdenaturierendes Polyacrylamidgel läuft, während ein stabil an ein spezifisches Protein gebundenes gebremst wird und in einer für den Komplex typischen Bande erscheint. Dort kann es autoradiographisch sichtbar gemacht werden. Die Intensität einer solchen Bindung erlaubt den Rückschluss auf die Aktivität eines Transkriptionsfaktors in einer Zelle. Dabei kann der Transkriptionsfaktor in der Zelle zuvor auf verschiedene Weise stimuliert worden sein und der Effekt der Stimulation genauer untersucht werden. Für diese Untersuchung ist es wichtig, dass die Proben einen Komplex bilden, der auch unter den Bedingungen stabil ist, wie sie während der Elektrophorese herrschen. Um die Spezifität für ein bestimmtes gesuchtes Protein zu erhöhen, ist es möglich einen Supershift durchzuführen. Dabei wird der Komplex aus Protein und markiertem Oligonukleotid vor dem Auftragen auf das Gel mit einem spezifischen Antikörper gegen ein gesuchtes Protein inkubiert. Handelt es sich um das gesuchte Protein, lagert sich der Antikörper an den Komplex zusätzlich an, es entsteht ein größerer Komplex, der bei der folgenden elektrophoretischen Auftrennung noch langsamer läuft und damit hinter dem ursprünglichen Komplex zurückbleibt.

Endständig durch T4 Polynukleotidkinase mit ^{32}P markierte Oligonukleotide, welche die mutmaßliche Bindungsstelle enthalten, werden entweder mit aufgereinigtem Protein, Kernextrakten oder Zellextrakten inkubiert. Die Spezifität der Bindungen wird

durch verschiedene mitlaufende Kontrollen überprüft. Als Negativkontrolle dient ein Ansatz ohne den aktiven Transkriptionsfaktor oder das Zellextrakt. Zwei weitere Kontrollen werden mit NF- κ B und einem nicht markiertem Konsensusoligonukleotid als spezifischem Kompetitor und NF- κ B sowie nicht markiertem nichtspezifischem Oligonukleotid (beispielsweise SP1 Konsensusoligonukleotid) durchgeführt. Die Reaktionsprodukte werden anschließend auf einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Gele mittels Röntgenfilm oder Phosphoimager ausgewertet.

2.2.5. Riboquant™

Der Ribonuklease-Abbauschutz-Versuch ist ein sensitiver und spezifischer Nachweis bestimmter mRNA Motive. Die Untersuchung beruht auf der Entdeckung DNA-abhängiger RNA-Polymerasen in den Bakteriophagen SP7, T7 und T3, die es ermöglichen von spezifischen, gesuchten DNA-Vorlagen einzelsträngige RNA-Sonden herzustellen. Diese werden entweder radioaktiv mit ^{32}P markiert oder für eine Lumineszenzreaktion mit Biotin versehen. Mehrere von diesen Sonden werden von BD Biosciences Pharmingen, San Diego als Sets zu verschiedenen Fragestellungen angeboten. Hier wurde ein Set mit den Zytokinen IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, LIF und SCF eingesetzt.

Die den zu untersuchenden mRNAs komplementären Sonden werden zusammen mit Sonden gegen ständig transkribierte Haushaltsgene als Kontrolle im Überschuss inkubiert und lagern sich an diese an. Anschließend wird die verbliebene einzelsträngige RNA, das heißt ungebundene Probe und sämtliche RNA, die nicht durch die Sonden erfasst wurde, durch Ribonuklease abgebaut. Die doppelsträngige, geschützte RNA wird isoliert und in denaturierendem Polyacrylamidgel zusammen mit einem Größenmarker elektrophoretisch aufgetrennt und per Autoradiographie oder im Phosphoimager nachgewiesen. Die erhaltenen Signale lassen sich auch quantifizieren.

3. Ergebnisse

3.1. Apoptosesuppression durch C-Raf: die Rolle von NF- κ B

Um den Einfluss von NF- κ B auf die Apoptosesuppression durch C-Raf zu untersuchen wurden Zelllinien mit zwei unterschiedlichen, konstitutiv aktiven Raf-Konstrukten und eine mit Wildtyp Raf verwendet. Jede dieser Zelllinien wurde in vier Gruppen aufgeteilt und retroviral mit Konstrukten infiziert, die mit der Aktivierung von NF- κ B interferieren, wobei ein Leervektor als Kontrolle dient. Neben den Konstrukten wurde auch ein Resistenzgen gegen Zeocin und als Markierung ein Plasmid, das für GFP kodiert, übertragen. Der Erfolg der Infektion und die Effizienz der Selektion der Zellen in Zeocinmedium wurden durchflußzytometrisch kontrolliert. Ein zu niedriger Anteil der Zellen mit dem zu untersuchenden Konstrukt würde die Aussagekraft des Experiments einschränken. Vor den survival assays wies ein Westernblot die Expression der eingefügten Konstrukte nach.

3.1.1. Raf-Konstrukte

Es kamen auf 32D-Zellen basierende Zellpools mit folgenden Raf-Konstrukten zum Einsatz:

- ELneo Leervektor: die Zellen enthalten nur endogenes Raf
- EHneo Gag-v-Raf, konstitutiv aktives Raf: Ein myristyliertes Fusionsprotein aus viralem Gag Protein und der Kinasedomäne von C-Raf (Heidecker et al., 1990), das aus sterischen Gründen nicht in die geschlossene und dabei inaktive Form von Raf übergehen kann. Es ist daher konstitutiv aktiv.
- Mas-BxB: BxB ist ein konstitutiv aktives C-Raf-Konstrukt, dessen N-terminale Domäne fehlt, die sonst der Interaktion mit dem kleinen G Protein Ras dient. Die Mutante kann daher nicht durch Ras beeinflusst werden (Kerkhoff and Rapp, 2001). Es ist mit der Transmembrandomäne eines Proteins der äußeren Mitochondrienmembran, Mas, aus der Hefe fusioniert (Yaffe et al., 1985). Unabhängig von einer durch Bcl-2 vermittelten Translokation ist es so an die Mitochondrien gebunden. Im Gegensatz zu Gag-v-Raf ist es auf Grund seiner Lokalisation nicht in der Lage, ERK 1 oder 2 zu aktivieren (Wang et al., 1996a).

Durch retrovirale Infektion mit Viruspartikeln, die nach Transfektion der Verpackungszelllinie Phoenix AM gewonnen worden waren, erhielten die Zellen noch die folgenden GFP markierten und mit Zeocin-Resistenz versehenen Konstrukte.

1. Leervektor (pEGZ-Zeo)
2. pEGZ-Zeo I κ B α DN: Es handelt sich um ein dominant negatives I κ B α -Konstrukt, das nicht phosphoryliert und abgebaut werden kann. Dieses verhindert die Aktivierung von NF- κ B.
3. pEGZ-Zeo IKK β KD: Dabei handelt es sich um eine IKK β -Mutante die ihre Kinaseaktivität eingebüßt hat, I κ B α nicht mehr phosphorylieren und damit zum Abbau freigeben kann. NF- κ B bleibt damit durch den Inhibitor I κ B α inaktiviert.
4. pEGZ-Zeo IKK β EE: IKK β EE ist eine Mutante, bei der die im Austausch eingefügte Aminosäure Glutamat eine aktivierende Phosphorylierung simuliert und zu dauernder Kinaseaktivität führt. Das NF- κ B inhibierende I κ B wird abgebaut.

3.1.1.1. Expressionskontrolle

Nach 10 bis 14 tägiger Selektion in Zeocin wurden die so generierten Zellpools auf die Expression der transfizierten Konstrukte sowie auf das Vorhandensein von GFP untersucht. Folgende von den parentalen 32D-Zellen abstammenden Zellpools fanden dabei Verwendung: 473, die einen Leervektor tragen, 439 mit dem Mas-BxB Konstrukt sowie EH und 472, die jeweils mit v-Raf transfiziert wurden.

In allen Westernblot-Analysen dienten die endogen vorhandenen Serin-/Threonin-Kinasen ERK 1 und 2 als Positiv- und Beladungskontrolle. Der Antikörper sc-94 erkennt ERK1 besser als ERK2, im Blot stellen sich p42 (ERK2) und p44 (ERK1) als benachbarte Banden dar. Der Nachweis der Raf-Konstrukte erfolgte mit dem polyklonalen Kaninchen Antikörper 599, der gegen die C-terminalen zwölf Aminosäuren des C-Raf Proteins gerichtet ist und sowohl C-Raf, Mas-BxB, wie auch gag-v-Raf erkennt. Im Zellpool 472 fand sich v-Raf mit einem Molekulargewicht von etwa 89 kDa, in den 439-Zellen das kleinere Mas-BxB mit 40 kDa. Die dominant negative I κ B α -Mutante wird mit dem sc-371 Antikörper detektiert, der mit I κ B- α von Mensch, Ratte, Maus sowie der eingesetzten Mutante reagiert. Das inaktive IKK β KD

Konstrukt war zum einfacheren Nachweis durch den monoklonalen Mausantikörper V5507 (Sigma) mit dem viralen VSV Glykoprotein markiert. Die Verwendung viraler Proteine zur Markierung in Säugerzellen hat den Vorteil, dass eine unspezifische Reaktion mit zelleigenen Epitopen unwahrscheinlicher ist und ein Antikörper zum Nachweis vieler Proteine verwendet werden kann, wenn sie das entsprechende Epitop tragen. Eine solche Markierung besaß die konstitutiv-aktive IKK β EE Mutante nicht, sie wurde mit einem gegen IKK β gerichteten polyklonalen Kaninchenantikörper sc-7607 nachgewiesen, der allerdings zum Teil auch mit IKK α reagiert. Die Konstrukte dominant negatives I κ B α und Kinase-inaktives IKK β erschienen im Westernblot jeweils deutlich, die konstitutiv aktive Kinase IKK β war aber nur gerade noch detektierbar. Eine Zusammenstellung aller durchgeführten Untersuchungen findet sich in Tabelle 1, exemplarische Westernblots unter Abbildung 1.

Zellpool	Raf	ERK	I κ B α	IKK β KD (VSV)	IKK β EE
473 (Leervektor)	-	+	+	+	(+)
472 (v-Raf)	+	+	+	+	
439 (Mas-BxB)	+	+	+		
EH (v-Raf)		+	+		

Tabelle 1: Tabellarische Zusammenfassung der Westernblot-Expressionskontrolle. Die konstitutiv-aktive IKK β Mutante zeigt nur eine geringe Expression.

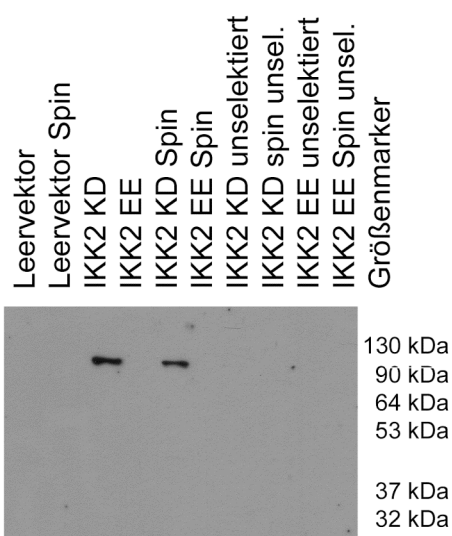


Abb. 1: Westernblot mit dem Primärantikörper Sigma V5507, 1:1000. Die VSV-markierte Kinase-tote IKK β -Mutante erscheint in zwei auf unterschiedliche Weise transfizierten Zellpools. Das nicht markierte endogene IKK β oder die konstitutiv aktive Mutante werden nicht erfasst.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich in der FACS-Kontrolle, zusammengefasst in Tabelle 2, der in Zeocinmedium selektierten Zellen auf GFP-positive, also erfolgreich mit den Konstrukten 1 bis 4 infizierten Zellen. Die Konstrukte 1 und 2 waren jeweils in nahezu allen Zellen nachzuweisen. Konstrukt 3, die inaktive IKK β Form tendenziell etwas niedriger, während die konstitutiv aktive Form IKK β in deutlich weniger Zellen, zum Teil in nur 60% der Zellen, erschien.

Zellpool	Leervektor	I κ B α DN	IKK β KD	IKK β EE
473 (Leervektor)				
439 (Mas-BxB)	69%	99%	74%	90%
472 (v-Raf)	99%	99%	91%	93%
EH (v-Raf)	100%	100%	98%	72%

Tabelle 2: Expressionskontrolle im FACS. Prozentualer Anteil der GFP-positiven Zellen, die damit das Konstrukt exprimieren.

3.1.1.2. Untersuchung der NF- κ B Aktivitäten in unterschiedlichen 32D Zellpools

Nach dem Nachweis der erfolgreichen Expression der unterschiedlichen Raf-Mutanten und der I κ B und IKK Proteine wurde der Effekt der Raf Aktivierung auf die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B in 32D-Zellen getestet. Der in Abbildung 2 gezeigte Shift Assay sollte klären, ob das an die Mitochondrien gebundene Raf der Mas-BxB infizierten Zellen in der Lage ist, NF- κ B zu aktivieren. Der Versuch fand jeweils in Anwesenheit und Abwesenheit von IL-3 statt, als Vergleich diente eine Stimulation mit TNF- α . TNF- α ist als starker Aktivator von NF- κ B bekannt (Baud and Karin, 2001). Als Kontrolle dienten die mit dem Leervektor pcDNA3 infizierten Zellen. In diesen Zellen führte eine Stimulation mit IL-3 kaum zu einer Aktivierung von NF- κ B. Mas-BxB Expression alleine führte zu keiner deutlichen NF- κ B Aktivierung, allerdings erhöhte sich die Stimulierbarkeit durch IL-3 deutlich. Insgesamt blieb die NF- κ B Aktivität damit jedoch immer noch deutlich hinter der durch TNF-Stimulation erreichbaren Aktivität zurück.

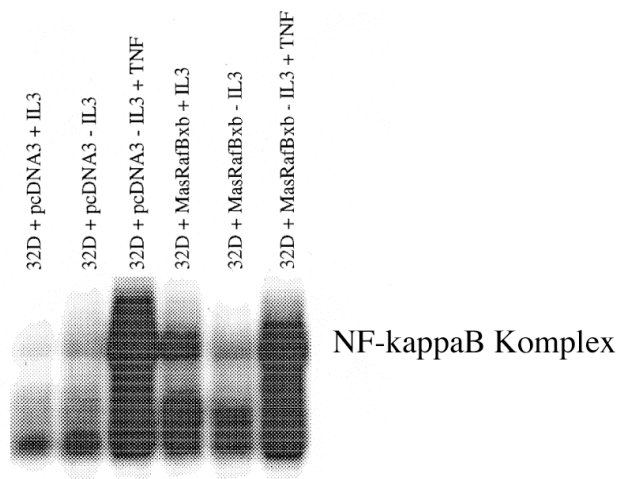


Abb. 2: DNA-Bindeaktivität von NF- κ B nach Transfektion mit konstitutiv aktivem Raf (Mas-BxB).

EMSA von 32D-Zellen nach Transfektion mit konstitutiv aktivem Raf. Mas-BxB alleine bewirkt keine Aktivierung von NF- κ B, verbessert jedoch die Stimulierbarkeit durch IL-3.

Ein zweiter, in Abbildung 3 dargestellter Shift-Assay, erfasste die NF- κ B Aktivität in Gag-v-Raf exprimierenden Zellen. Die Zellen erhielten zusätzlich zu dem konstitutiv aktiven Raf-Konstrukt noch folgende mit der Aktivierung von NF- κ B interferierende Konstrukte: dominant negatives I κ B α , Kinase-inaktives IKK β , konstitutiv aktives IKK β oder einen Leervektor. Wie schon in den Mas-BxB transfizierten Zellen war auch in diesen Zellen keine offensichtliche Aktivierung von NF- κ B als Folge der Expression einer aktivierten Raf-Mutante erkennbar, während die Stimulation mit TNF α zu einer massiven Aktivierung von NF- κ B führte. Wie erwartet, konnte dieser TNF α Effekt durch eine dominant negative Mutante von I κ B α fast vollständig gehemmt werden. Im Gegensatz dazu zeigte weder die konstitutiv aktive noch die Kinase-tote Mutante von IKK β den erwarteten Effekt. IKK β EE verursachte keine konstitutive NF- κ B Aktivierung und die Kinase-tote Mutante von IKK β konnte eine TNF- α induzierte Aktivierung von NF- κ B nicht inhibieren. Eine mögliche Ursache für diesen Befund kann in der zu geringen Expression der Mutanten liegen. Denkbar ist auch, dass die Verwendung eines Zellpools, in dem Zellen die entsprechenden Proteine in stark unterschiedlichen Mengen exprimieren können, keine eindeutige Aussage zulässt. In diesem Fall müssten Einzelzellklone generiert und auf möglichst hohe Expression der IKK β Proteine vorgetestet werden, bevor diese Analysen wiederholt werden.

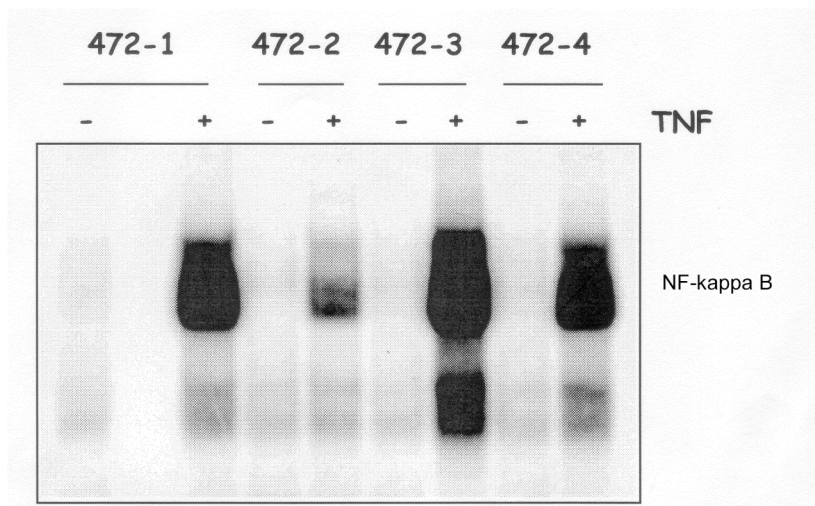


Abb. 3: Auswirkung von mit der NF- κ B Aktivierung interferierenden Konstrukten in Zellen mit konstitutiv aktivem Raf (472).

472-1. Leervektor, 472-2. dn I κ B α , 472-3. kd IKK β , 472-4. IKK β EE. NF- κ B bleibt in allen Zellen durch TNF- α stimulierbar, dominant negatives I κ B α (472-2.) reduziert die NF- κ B Aktivität um 50%.

3.1.2. Bedeutung von aktiviertem NF- κ B für das Überleben von Raf-geschützten Zellen

Nach der Charakterisierung der nun etablierten Zellpools erfolgte die funktionelle Bewertung der Rolle von NF- κ B in der Überlebenskontrolle durch aktiviertes Raf und Raf-BxB. Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse bezüglich des NF- κ B Status waren unsere Erwartungen eingeschränkt. Die Kontrolle des Anteils der lebenden Zellen zu den verschiedenen Ablesezeitpunkten erfolgte jeweils nach zwei Methoden. Zum einen wurden unter dem Mikroskop Triplikate auf ihren Trypanblau-Ausschluss hin ausgezählt, zum anderen wurden Propidiumiodid-gefärbte Zellen per FACS Analyse hinsichtlich ihres DNA-Gehaltes ausgewertet. Beide Methoden stimmten überein, was die Reihenfolge der Konstrukte im Bezug auf den Anteil überlebender Zellen angeht.

Bei den 32D-Zellen ohne aktive Raf-Mutante zeigte die Expression der oben beschriebenen I κ B und IKK Mutanten keinen Effekt auf das Absterben der Zellen. Wie bereits früher beschrieben (Cleveland et al., 1994, von Gise et al., 2001), sinkt die Viabilität dieser Zellen nach einem 24 stündigen IL-3 Entzug auf Werte um oder unter 20%. Die Verläufe mit den von uns getesteten Konstrukten waren nahezu identisch (Abb. 4). Die Expression eines Leervektors (ELneo) führte zu einer Verlangsamung des Absterbens der 32D-Zellen, für die es im Moment keine Erklärung gibt, da sie allen unseren vorausgehenden Experimenten widerspricht. Diese Daten wurden daher nicht in die Darstellung aufgenommen.

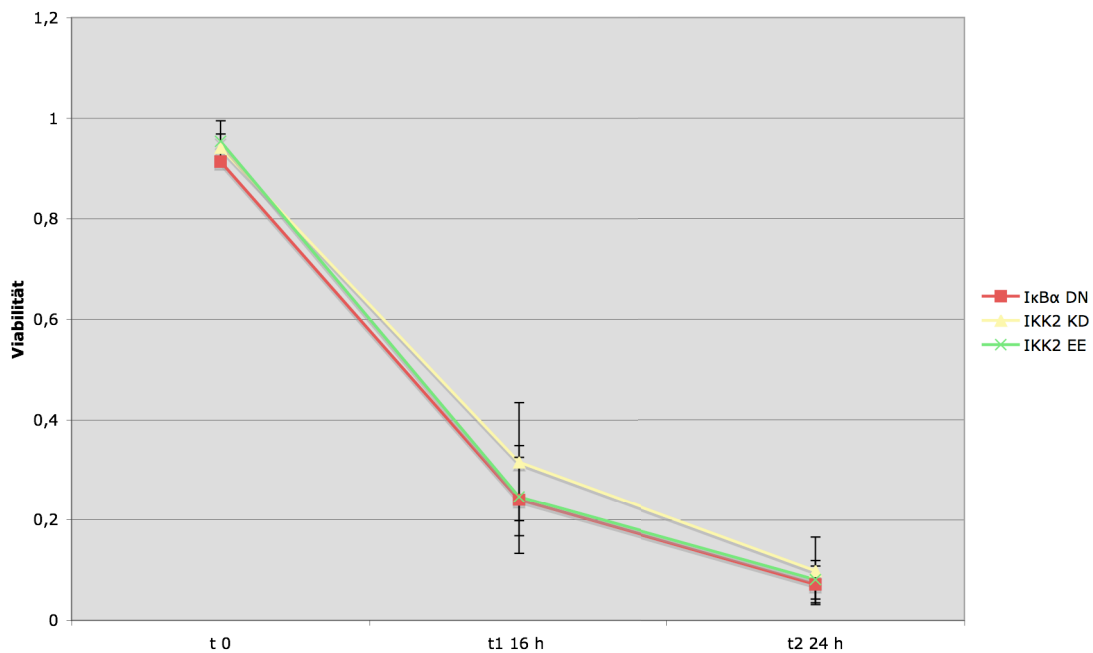


Abb. 4: Survival-assay mit Elneo-Leervektor transfizierten 32D-Zellen. Die Zellen mit den $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ - und $\text{IKK}\beta$ -Konstrukten zeigen ein annähernd gleiches Überlebensverhalten, das dem der parentalen 32D-Zellen entspricht.

Bei den in Abb. 5 dargestellten Zellen mit an der Mitochondrienmembran lokalisierter Raf Mas-BxB ließ sich zwischen den Konstrukten 1 bis 4 kein Unterschied im Überleben feststellen.

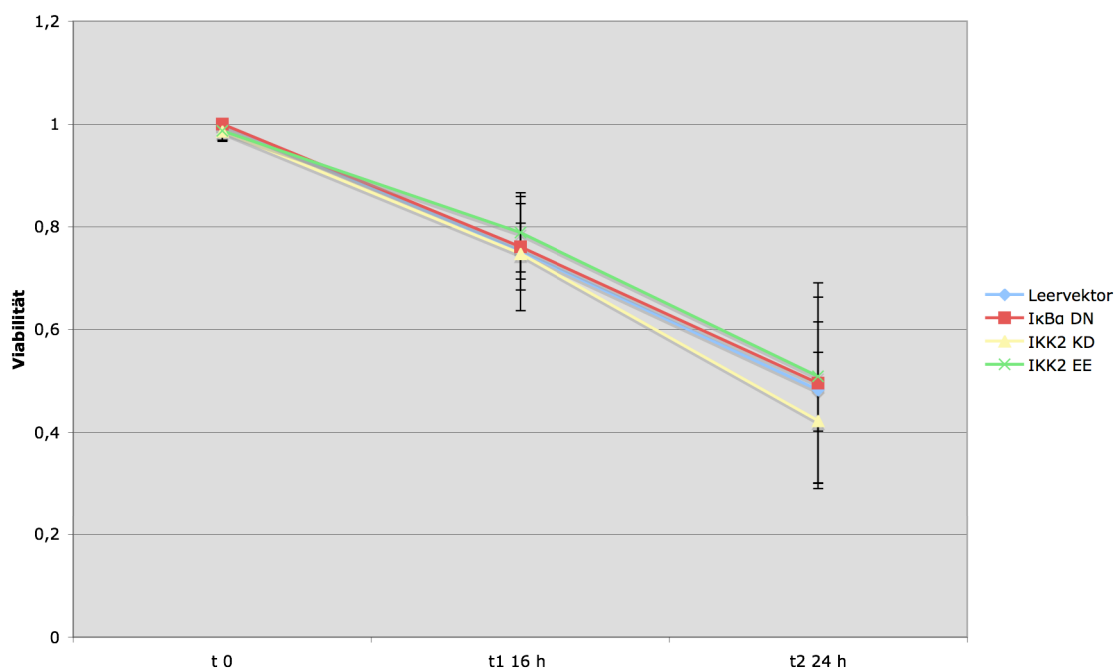


Abb. 5: Survivalassay, die 32D-Zellen tragen mitochondrial lokalisiertem Mas-BxB. Die Konstrukte führen zum gleichen Überlebensverhalten wie der Leervektor.

In Zellen mit aktivem v-Raf Konstrukt (Abb. 6) zeigte sich in mehreren Experimenten folgende Reihenfolge im Überleben: $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ DN infizierte Zellen überlebten am besten, es folgten die IKK β KD Zellen und dann die Kontrollgruppe, die mit dem Leervektor infiziert wurde. Der geringste Anteil lebender Zellen fand sich bei Zellen mit konstitutiv aktiver IKK β .

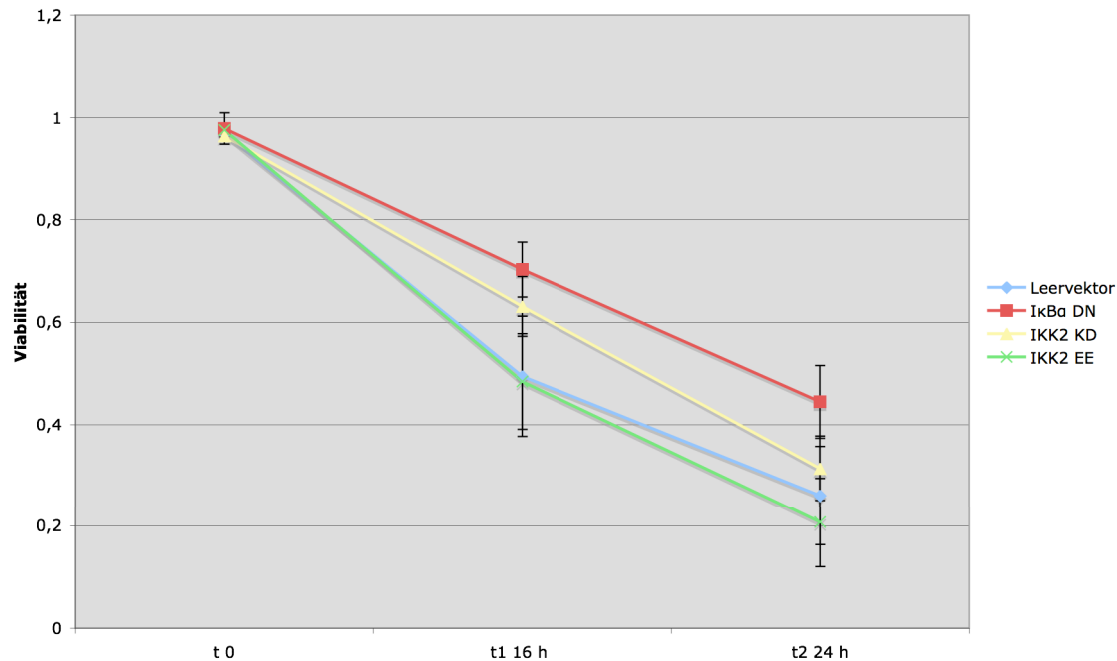


Abb. 6: Survivalassay mit an die Zellmembran gebundenem v-Raf. Die Konstrukte $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und IKK β KD, die eine Aktivierung von NF- κ B unterdrücken bieten einen Überlebensvorteil.

Aus den vorliegenden Daten ergeben sich folgende Aussagen: wie bereits früher gezeigt, verzögern sowohl Mas-BxB wie auch v-Raf das Absterben der Zellen, wobei im direkten Vergleich der Zellpools die Mas-BxB Mutante einen besseren Schutz bot. Die Gründe hierfür können in der Höhe der Expression aber auch im unterschiedlichen Design der Mutanten liegen. Obwohl nie im Detail publiziert, wurde für v-Raf in Immunfärbungen eine kernnahe Lokalisation gezeigt (perinukleärer „rim“, Ulf Rapp). Es ist weiters davon auszugehen, dass das Protein an unterschiedliche zelluläre Membranen lokalisieren kann. Die Expression von Mas-BxB sollte überwiegend bis ausschließlich mitochondrial sein (Wang et al., 1996a). Unterschiedlich waren auch die Effekte der verwendeten NF- κ B Proteine. Während die Mas-BxB exprimierenden 32D-Zellen keine maßgeblichen Effekte zeigten (Abb. 5), entsteht in den v-Raf Zellen (Abb. 6) der Eindruck, dass der Einsatz der inhibitorischen Mutanten zu einer Verbesserung des Überlebens führt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dem von uns untersuchten Zellsystem weder das Zytokin IL-3 noch die aktivierten Mutanten einen Effekt auf die Aktivierung von NF- κ B hatten. Es zeigte sich aber, dass die Expression von Mas-BxB zu einer stark erhöhten NF- κ B Aktivierung nach IL-3 Stimulation führte, was nahe legt, dass Raf, auch wenn es selbst nicht in der Lage ist, NF- κ B zu aktivieren, die Aktivierung durch andere Signale deutlich verstärken kann.

3.2. Experimente mit Faktor-unabhängigen Zellen

Im zweiten Teil meiner Arbeit befasste ich mich mit der weiteren Charakterisierung des Raf-Effektors MEK, von dem wir bereits früher gezeigt hatten, dass über ihn auch von Raf ausgehende Signale vermittelt werden, die das Zellüberleben steuern (von Gise et al., 2001). In diesen Experimenten hatten wir in 32D-Zellen unterschiedliche konstitutiv aktive Mutanten von MEK zur Expression gebracht, eine in der die durch C-Raf phosphorylierten Serine durch saure Aminosäuren ersetzt worden waren (MEK-LIDEMANE) und eine weitere, in der zusätzlich durch Verdau mit dem Restriktionsenzym Stul eine α -Helix entfernt worden war. Diese α -Helix dient der negativen Regulation der Kinaseaktivität. Durch das Entfernen dieser Domäne soll die Kinaseaktivität bis um den Faktor 400 gegenüber der unphosphorylierten Wildtyp Kinase erhöht werden können (Mansour et al., 1994). Der Versuch die IL-3 abhängigen 32D-Zellen mit LIDEMANE Mutante in einem Medium mit 10%-iger FCS-Supplementation IL-3 frei zu kultivieren, führte zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase und anschließender Apoptose. Von 32D-Zellen mit der konstitutiv aktiven MEK Variante Δ Stul-MEK LIDEMANE überlebte jedoch ein faktorunabhängiger Zellklon, die FID-Zellen (factor independent).

3.2.1. Pharmakologische Inhibition von MEK und PI3-Kinase

In einem ersten Experiment testeten wir, ob FID-Zellen immer noch von MEK, wie auch PI3-Kinase und PKB/Akt abhängig waren, um zu überleben. Dazu wurden 500000/ml Zellen in Triplikaten ausgesät und mit pharmakologischen Inhibitoren von MEK oder PI3-Kinase in unterschiedlichen Konzentrationen für 48 h inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgten die Zellzählung und die Bestimmung der Viabilität. Wie aus Abbildung 7 ersichtlich ist, benötigen FID-Zellen auch weiterhin beide Signalmoleküle um zu wachsen und zu überleben.

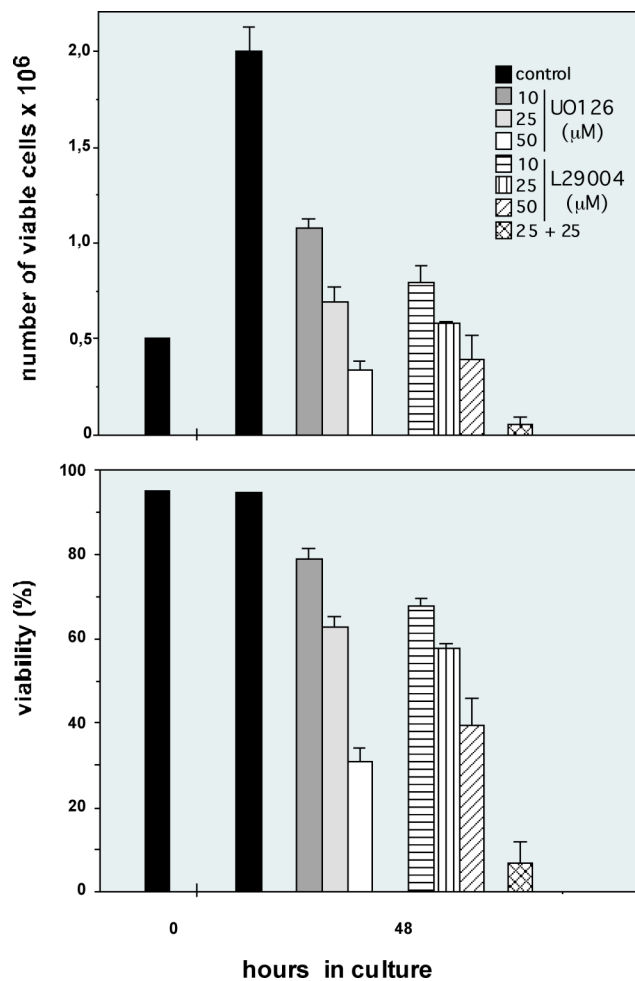


Abb. 7: Kultur der FID-Zellen in IL-3 haltigem Medium unter Einfluss eines MEK-Inhibitors (UO 126) und PI3-Kinase Inhibitors (LY29004) in verschiedenen Konzentrationen. Während die Viabilität ohne die Inhibitoren konstant bleibt (unten) und die Zellen proliferieren (oben), führen beide Inhibitoren dosisabhängig zu Apoptose und deutlich reduzierter Proliferation. Die FID-Zellen sind daher noch auf beide Signalwege angewiesen.

3.2.2. Ansprechen der FID-Zellen auf IL-3

In einem nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die FID-Zellen ihr Faktor-unabhängiges Wachstum Mutationen verdanken, die den von IL-3 abhängigen Signalweg überflüssig machen, oder ob dieser weiterhin funktionsfähig ist. Dazu erfolgte eine Kultur der FID-Zellen, jeweils in Triplikaten und bei unterschiedlichen Zelldichten, in FCS-supplementiertem Medium, entweder in Anwesenheit oder Abwesenheit von IL-3. Die in Abbildung 8 gezeigte, unabhängig von der eingesetzten Zelldichte, deutlich höhere Proliferation unter IL-3 Einfluss spricht für eine immer noch bestehende funktionelle Bedeutung dieses Signalweges in den FID-Zellen. Weiter fiel in den dargestellten Experimenten eine Abhängigkeit des Wachstums von der eingesetzten Zelldichte auf. Die Zellen proliferierten bei einer Zelldichte von

500000/ml stärker als bei niedrigerer Dichte, was an einen wie auch immer gearteten, die Proliferation stimulierenden Faktor denken lässt, den sich die Zellen untereinander zur Verfügung stellen.

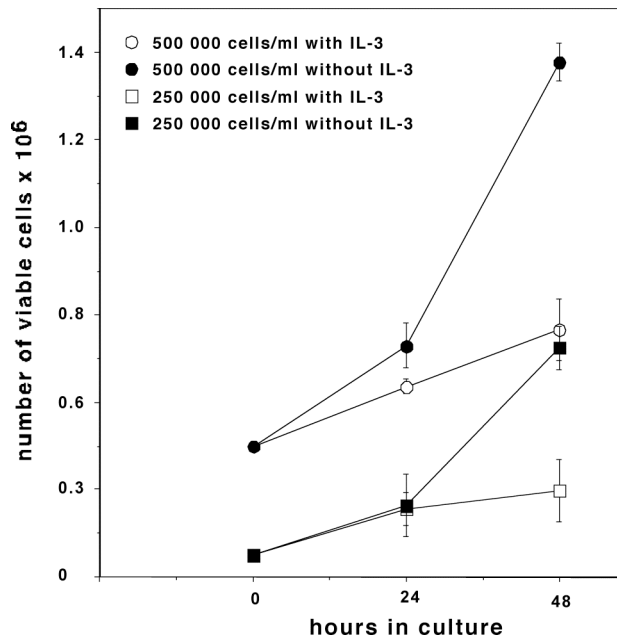


Abb. 8: Proliferation der FID-Zellen in Anwesenheit und Abwesenheit von IL-3 bei unterschiedlicher Ausgangszelldichte. Die Zellen sprechen weiterhin sehr deutlich auf den Wachstumsfaktor an, obwohl auch in Abwesenheit Proliferation stattfindet. Die Proliferation ist bei höherer Zelldichte lebhafter.

3.2.3. Transkription von Zytokinen in FID-Zellen

Ein weiteres Experiment sollte die Frage klären, ob die FID-Zellen die Fähigkeit zur Bildung eigener Wachstumsfaktoren gewonnen haben. Dazu wurden neben den für 32D-Zellen essentiellen Wachstumsfaktoren IL-3 (Ruggiero et al., 1991) und Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor) (Valtieri et al., 1987) auch das im Zusammenhang mit autokrinen Signalwegen beschriebene heparin-binding (hb)-EGF untersucht (Schulze et al., 2001). Im Falle des EGF-Rezeptor-Liganden hb-EGF etablierten wir hb-EGF überexprimierende Zellen, die aber keinen Überlebensvorteil nach IL-3 Entzug gegenüber den parental Zellen hatten (Tränkenschuh und Troppmair, unpublizierte Daten). Weitere kontrollierte Faktoren waren: IL-4, IL-6, IL-7, Granulozyten und Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF, granulocyte and macrophage-colony stimulating factor), Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (M-CSF, macrophage-colony stimulating factor), Leukämie inhibierender Faktor (LIF,

leukemia inhibitory factor) und Stammzellfaktor (SCF, stem cell factor). Dabei dienten 32D-Zellen als Negativkontrolle und Wehi-Zellen als Positivkontrolle. Der unter Abbildung 9 dargestellte Ribonuklease-Schutzversuch zeigt für FID- und 32D-Zellen im Gegensatz zu den Wehi-Zellen keine nachweisbare mRNA für Interleukin-3 und die anderen untersuchten Zytokine mit Ausnahme von GM-CSF. Da die parentalen 32D-Zellen das GM-CSF in vergleichbarem Maße transkribieren, ist nicht davon auszugehen, dass GM-CSF für das Überlebensverhalten der FID-Zellen verantwortlich ist. Auch die übrigen untersuchten Zytokine liefern hier keine Erklärung, da sie ja nicht nachweisbar sind.

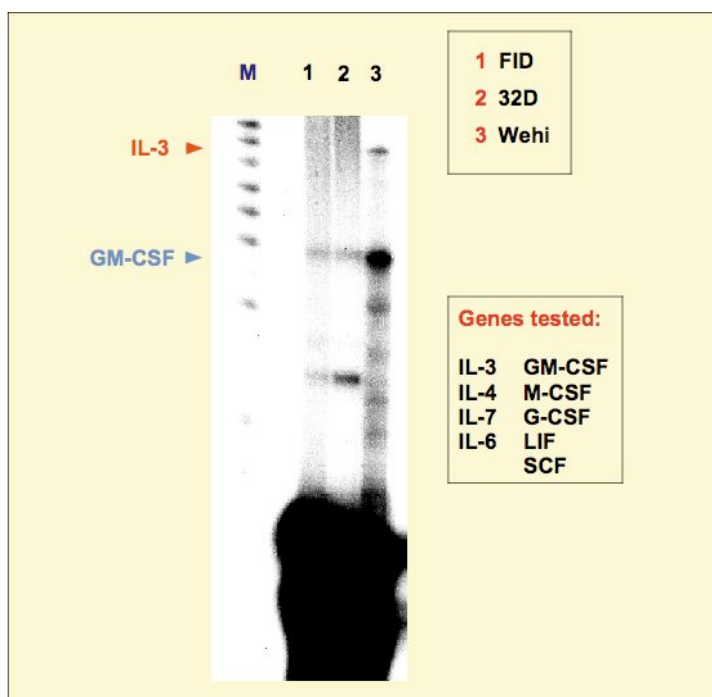
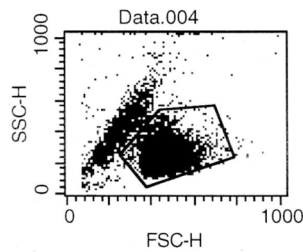


Abb. 9: Riboquant™ -assay der FID-, 32D- und Wehi-Zellen. Die FID-Zellen transkribieren von den untersuchten Zytokinen nur GM-CSF, jedoch nicht mehr als die parentalen 32D-Zellen. Zur Kontrolle lässt sich in den Wehi-Zellen mRNA für IL-3 nachweisen.

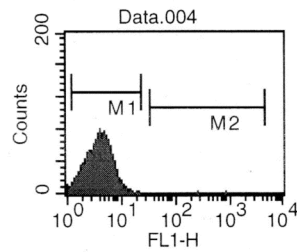
3.2.4. Kokultorexperiment von FID- und parentalen 32D-GFP-Zellen

Das Kokultur-Experiment soll klären, ob die FID-Zellen den parentalen 32D-Zellen im direkten Zell-Zellkontakt einen noch nicht untersuchten Faktor zur Verfügung stellen können, der diese am Leben erhält oder ihnen sogar die Vermehrung ermöglicht. Dazu werden FID- und 32D-Zellen zusammen in IL-3 freiem Medium in einer Zellkulturflasche im Verhältnis 75:25 ausgesät, wobei die 32D-Zellen durch Transfektion mit einem für GFP kodierenden Plasmid markiert sind. Als Kontrolle dienen reine FID- und 32D-Zellpools. Die zu unterschiedlichen Zeitpunkten

entnommenen Proben geben also das Verhältnis der beiden Zellpopulationen zu dem entsprechenden Zeitpunkt wieder. Abbildung 10 zeigt die FACS Diagramme zum Ausgangszeitpunkt. Dabei wurden zu jeder Probe zwei Diagramme erstellt. Das erste zeigt Forwardscatter-Höhe und Sidescatter-Höhe. Forwardscatter kann als Maß für die Größe der erfassten Partikel dienen, die Sidescatter-Höhe stellt die seitliche Lichtstreuung der Zellen, beziehungsweise Zellbruchstücke dar. Bei apoptotischen Zellen mit unregelmäßiger Oberfläche und apoptotischen Vesikeln erhöht sich die seitliche Streuung. In dieser Darstellung ergibt sich ein charakteristisches Muster, das es erlaubt, mit Hilfe von so genannten gates Bereiche abzugrenzen, in denen sich typischerweise lebende Zellen, Bruchstücke abgestorbener Zellen oder solche Zellen finden, die sich gerade im Prozess der Apoptose befinden. Diese Untersuchung dient vor Beginn eines Experiments dazu, den einwandfreien Zustand der eingesetzten Zellen zu überprüfen und im Verlauf die Gesamtviabilität der Zellen der Kultur zu bestimmen. Das zweite Diagramm zeigt die Häufigkeit an, mit der Partikel einer bestimmten Lichtintensität im FL-1 Kanal (530/30 nm) erfasst werden. Das Histogramm stellt die Intensitäten in logarithmischem Maßstab dar. Es lassen sich die Bereiche festlegen, in denen die GFP-positiven und –negativen Zellen erscheinen. Hier entsprechen die niedrigen Werte in dem Bereich M1 der Autofluoreszenz der GFP-negativen FID-Zellen und die höhere Werte in M2 den GFP-positiven Zellen. Dabei fällt aufgrund einer Streuung in der Intensität der Fluoreszenz ein geringer Anteil schwächer GFP-positiver Zellen auch in den Bereich M1 der negativen Zellen. Durch die mitgeführten reinen FID-Zell- und 32D-GFP-Zellpopulationen lässt sich die Größenordnung dieser Überschneidung abschätzen und korrigieren. Insgesamt ist der Abstand zwischen beiden Populationen jedoch so groß, dass sie sich auch ohne aufwändige Korrektur gut unterscheiden lassen. Hier lassen sich 73% der lebenden Zellen dem FID-Bereich und 26% dem 32D-GFP-Bereich zuordnen.

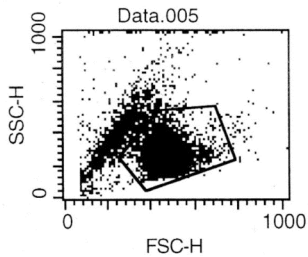


FID-Zellen

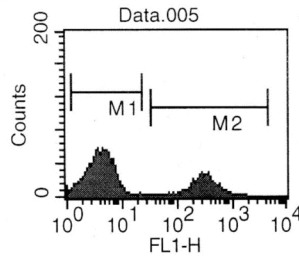


File: Data.004
 Acquisition Date: 18-Dec-01
 Gate: G1
 Gated Events: 8325
 Total Events: 10000
 X Parameter: FL1-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	8325	100.00	83.25
M1	1, 24	8256	99.17	82.56
M2	34, 4698	2	0.02	0.02

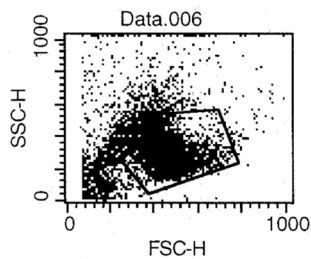


FID/460 Kokultur

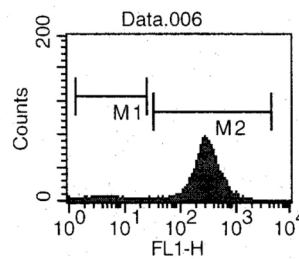


File: Data.005
 Acquisition Date: 18-Dec-01
 Gate: G1
 Gated Events: 8405
 Total Events: 10000
 X Parameter: FL1-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	8405	100.00	84.05
M1	1, 24	6162	73.31	61.62
M2	34, 4698	2180	25.94	21.80



32D-GFP

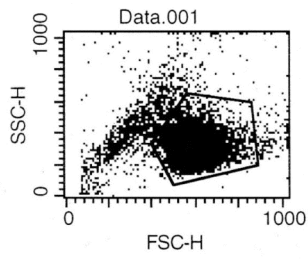


File: Data.006
 Acquisition Date: 18-Dec-01
 Gate: G1
 Gated Events: 7920
 Total Events: 10000
 X Parameter: FL1-H (Log)

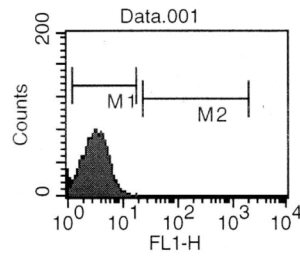
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	7920	100.00	79.20
M1	1, 26	286	3.61	2.86
M2	34, 4698	7599	95.95	75.99

Abb. 10: FACS-Analyse zu Beginn des Kokultur-Experiments. Links das FSC/SSC-Diagramm mit gate, entsprechend den viablen Zellen. Rechts das GFP-Histogramm mit FID-Zellen in M1 und 32D-GFP-Zellen in M2.

Die Kontrolle erfolgte 48 h später, das Ergebnis ist in Abbildung 11 dargestellt. Bereits im Forwardscatter/Sidescatter-Diagramm fällt der geringe Anteil überlebender Zellen in der reinen 32D-GFP Kultur auf. Das den viablen Zellen entsprechende gate erfasst nur noch 4% der Zellen. In der Kokultur findet sich ein höherer Anteil lebender Zellen. Die Analyse der im entsprechenden gate erfassten lebenden Zellen zeigt jedoch, dass es sich dabei praktisch ausschließlich um FID-Zellen handelt (FID 98%, 32D 0,5%). Die reinen FID-Zellen weisen nach 48 h einen Anteil von 86% lebenden Zellen auf. Das Ergebnis legt nahe, dass die FID-Zellen auch im direkten Kontakt nicht in der Lage sind den IL-3 abhängigen 32D-Zellen das Überleben zu sichern und sich die Besonderheit in ihrer Physiologie ausschließlich auf die veränderte Zelle beschränkt.

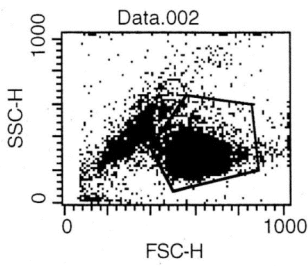


FID 48 h

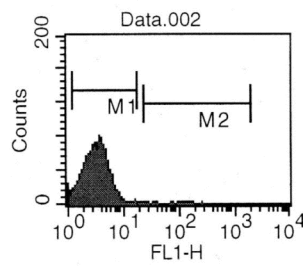


File: Data.001
 Acquisition Date: 20-Dec-01
 Gate: G1
 Gated Events: 8597
 Total Events: 10000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	8597	100.00	85.97
M1	1, 18	8461	98.42	84.61
M2	24, 2035	0	0.00	0.00

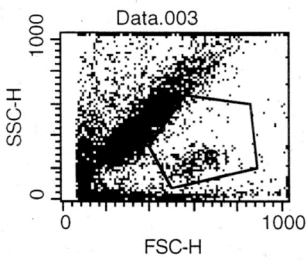


FID/460 Kokultur 48 h

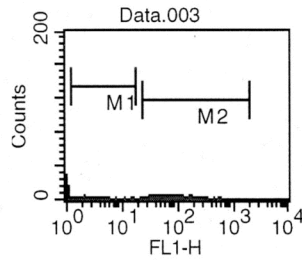


File: Data.002
 Acquisition Date: 20-Dec-01
 Gate: G1
 Gated Events: 7910
 Total Events: 10000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	7910	100.00	79.10
M1	1, 18	7731	97.74	77.31
M2	24, 2035	36	0.46	0.36



32D-GFP



File: Data.003
 Acquisition Date: 20-Dec-01
 Gate: G1
 Gated Events: 418
 Total Events: 10000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	418	100.00	4.18
M1	1, 18	61	14.59	0.61
M2	24, 2035	305	72.97	3.05

Abb. 11: FACS-Analyse nach 48 h Kokultur ohne IL-3 Supplementierung. Bei den 79,10% überlebenden Zellen handelt es sich fast ausschließlich (97,74%) um FID-Zellen.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von NF- κ B in der Überlebenskontrolle durch Raf zum ersten Mal zu untersuchen und 32D-Zellen, die durch Expression einer konstitutiv aktiven Mutante von MEK IL-3 unabhängig geworden waren, weiter zu charakterisieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit lieferten keinen Hinweis darauf, dass NF- κ B in der Apoptosesuppression durch Raf in dem hier untersuchten Zellsystem eine Rolle spielt. Weiters können wir zeigen, dass die MEK Mutante Δ Stul-MEK-LIDEMANE in der Lage ist, Zellen in der Abwesenheit von IL-3 wachsen zu lassen. Diese Zellen antworten jedoch weiterhin auf IL-3, was sich in einer gesteigerten Proliferation in Anwesenheit des Zytokins zeigte.

4.1. Raf, NF- κ B und Zellüberleben

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B kontrolliert die Expression einer Vielzahl von Genen, die für das Zellüberleben wichtig sind. Zu den seit langer Zeit bekannten Vertretern gehören antiapoptotische Bcl-2 Homologe wie Bfl1/A1. In murinen B- und T-Zellen kann die durch verschiedene Mitogene induzierte Expression von Bfl1/A1 in c-rel^{-/-} Zellen durch Einschleusen eines entsprechenden Expressionskonstruktes zumindest teilweise wiederhergestellt werden (Grumont et al., 1999). Bcl-X_L ist ein weiteres Bcl-2 Familienmitglied, dessen erhöhte Expression sich in humanen Zelllinien durch dominant negatives I κ B α unterbinden ließ. In diesen Experimenten war eine Regulation von Bcl-2 selbst jedoch nicht nachzuweisen (Chen et al., 2000). Unter den Caspaseinhibitoren ist eine NF- κ B-Abhängigkeit für XIAP beschrieben, dessen Expression sich durch Überexpression von dominant negativem I κ B α in Endothelzellen hemmen lässt (Stehlik et al., 1998). Ähnliches gilt für Survivin, ein in humanen Neoplasien häufig überexprimiertes Mitglied der IAP-Familie (Kawakami et al., 2005). In humanen T-Zellen betrifft dies auch c-IAP2, nach Stimulation mit TNF- α ist hier ein positiver Feedback Mechanismus gezeigt, der wiederum zur c-IAP2 abhängigen Stimulation von NF- κ B führt (Chu et al., 1997).

NF- κ B selbst wird durch eine Unzahl verschiedener Stimuli aktiviert, dazu gehören Bakterien, bakterielle Produkte, Viren, virale Produkte, Zytokine, physiologische Stresssituationen, physikalische Stimuli, oxidativer Stress, Medikamente und Rezeptorliganden sowie zahlreiche Chemikalien (Pahl, 1999). Auch Raf kann NF- κ B aktivieren, wobei hier unterschiedliche Aktivierungsszenarien beschrieben sind und die dabei entweder unabhängig von der zytoplasmatischen Kaskade sind (Baumann

et al., 2000), oder eine MEK-Abhängigkeit aufweisen (Troppmair et al., 1998). In Jurkat-Zellen, einer humanen T-Zelllinie, und in HeLa-Zellen erfolgte die Aktivierung von NF- κ B unabhängig von MEK. In diesen Systemen führte die Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)-induzierte Raf-Aktivität zum Anschalten eines NF- κ B responsiven Reportergenkonstruktes, das durch das kleine MEK-Inhibitormolekül PD98059 nicht zu unterbinden war, obwohl sich die Auswirkung auf ERK-2 Phosphorylierung nachweisen ließ. Ebenso bestätigte die Transfektion von zwei unterschiedlichen dominant negativen MEK-Mutanten diesen Befund. Stattdessen war hier die membrane shuttle kinase 1 (MEKK1) an der Signaltransduktion beteiligt. Anders stellte sich die Situation in humanen embryonalen Nierenzellen und murinen Fibroblasten dar, bei denen Raf durch Wachstumsfaktoren, Phorbol-12-myristat-13-acetat oder onkogene Proteintyrosinkinase aktiviert wurde. Das NF- κ B abhängige Luciferasereportergen-Konstrukt ließ sich hier durch eine dominant negative Mutante des MEK-Effektors ERK-2 hemmen. Darüber hinaus fand sich in diesem Szenario ein autokriner Mechanismus, der über einen EGF-Rezeptor zur Aktivierung von Ras führte. Eine Beteiligung von MEK zeigte sich auch bei der Untersuchung der C-Raf abhängigen Gene in einem cDNA Microarray in humanen Mamma- und Ovarialepithelzelllinien (Schulze et al., 2004). Hier wurde die Transkription von etwa 6000 Genen mittels zweier induzierbarer C-Raf Konstrukte untersucht. Dabei war für 135 Gene eine signifikante Transkriptionsänderung durch aktiviertes C-Raf nachweisbar, von den sich die Mehrheit nach Kontrolle mit dem MEK-Inhibitor PD98059 als MEK-vermittelt erwies. Die nachträgliche Analyse von Genen, die als NF- κ B reguliert beschrieben sind, konnte für die 61 auf dem Chip vertretenen Gene für nur sieben in der vorliegenden Konstellation eine C-Raf Abhängigkeit zeigen. Diese war in jedem Fall durch PD98059 hemmbar und erwiesen sich damit als vollständig MEK-vermittelt.

Im Gegensatz zu dem Teil der publizierten Beobachtungen, die eine Aktivierung von NF- κ B durch Raf sehen, liefern unsere Daten unter Verwendung zweier unterschiedlicher, konstitutiv aktiver Mutanten von Raf keine Hinweise für einen solchen Effekt. Nach unseren Expressions- und Überlebensexperimenten gehen wir davon aus, dass Raf in den Zellen tatsächlich vorhanden ist. Daher müssen wir annehmen, dass Proteine, die für die Aktivierung von NF- κ B benötigt werden, in diesen Zellen nicht vorhanden sind. Da die in den oben beschriebenen Aktivierungsszenarien involvierten Signalproteine, die Raf mit NF- κ B verbinden, noch

immer nicht identifiziert sind, kann dieser Punkt auch nicht durch eine einfache Immunoblotanalyse geklärt werden.

Bezüglich der hier getesteten Mutanten aus dem NF- κ B Signalweg konnten wir nur in den Mas-BxB 32D-Zellen einen gewissen, wenn auch von uns eher unerwarteten Effekt beobachten, nämlich ein gesteigertes Überleben nach Hemmung des Transkriptionsfaktors. Trotz der allgemein vorherrschenden Annahme, dass NF- κ B – abhängige Signalwege präferentiell dazu dienen, Zellüberleben sicherzustellen, gibt es in der Literatur auch Beobachtungen, dass Zellen mit hyperaktivem NF- κ B sensitiver auf Apoptosestimuli reagieren. So finden sich unter den Zielgenen von NF- κ B nicht nur die bereits erwähnten antiapoptotischen Gene, sondern auch einzelne proapoptotische wie der Todesrezeptor Fas (CD95) (Chan et al., 1999), die TRAIL Rezeptoren DR4, DR5 (Ravi et al., 2001) und der in Prostatakarzinomen hoch regulierte TRAIL Rezeptor DR6 (Kasof et al., 2001) sowie Fas-Ligand in murinen T-Zellen (Matsui et al., 1998). Auch die basale Expression von TNF α ist NF- κ B reguliert (Collart et al., 1990). Ebenso gehört TRAIL dazu, dessen Expression sich in Jurkat-Zellen durch dominant negatives I κ B α hemmen lässt (Baetu et al., 2001). Der Tumorsuppressor p53 und proapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie wie Bax, welches durch das Homodimer p50/p50 vermehrt exprimiert wird (Grimm et al., 2005) und Bcl-X_S, eine alternative Spliceform von Bcl-X_L, die in kortikalen Neuronen bei erhöhter NF- κ B Aktivität zur Apoptose führt (Tao et al., 2006), sind beschrieben. Ein weiterer proapoptotischer Mechanismus bedient sich der Deubiquitinase CYLD, deren ererbter Verlust mit der Zylindromatose, einer Entwicklungsstörung der Haarfollikel sowie Talg- und Schweißdrüsen, einhergeht (Ikeda and Dikic, 2006). Diese deubiquitiniert den Coaktivator Bcl-3 von p50 und p52 und führt zur Suppression proliferationssteigernder Gene (Massoumi et al., 2006).

Zusammenfassend ergibt sich, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B überwiegend an antiapoptotischen, aber auch an proapoptotischen Signalwegen beteiligt ist. Die Frage, welche genauen Mechanismen den Ausschlag in die eine oder andere Richtung geben, beziehungsweise den leichten protektiven Effekt, den wir in unseren Experimenten mit der Mas-BxB-Mutante sahen, lässt sich hier nicht im Detail beantworten. Letztlich liegen die Unterschiede in den unterschiedlichen eingesetzten Zelllinien und den ungleichen Arten der Stimulation.

4.2. MEK-induzierte Faktorunabhängigkeit in 32D-Zellen

Die IL-3 abhängigen 32D-Zellen aktivieren in Anwesenheit des Zytokins Ras und seine beiden Effektoren C-Raf und PI3-Kinase. Eine pharmakologische Blockade von MEK hebt die protektive Wirkung von IL-3 und onkogenem v-Raf auf (von Gise et al., 2001). Damit ist eine Funktion für MEK in der Apoptoseregulation von 32D-Zellen gezeigt worden. Allgemein gilt für Zytokin-abhängige Zelllinien, dass eine Faktorunabhängigkeit nie durch die Mutation eines einzelnen Onkogens wie Raf, Myc oder Ras erzielt wurde (Blasi et al., 1985). Eine Ausnahme bilden solche Tyrosinkinaseonkogene wie Abl, die wie ein Rezeptor wirken, der mehrere intrazelluläre Signalwege aktiviert. Hier ist es uns aber gelungen mit einer hyperaktiven Mutante von MEK (Δ Stul-MEK-LIDEMANE), nicht aber mit einer normal aktiven Mutante von MEK faktorunabhängige Zellen (FID) zu generieren. Zunächst konnten wir in entsprechenden Experimenten zusätzliche Mutationen, die eine Unabhängigkeit von den intrazellulären Signalmolekülen MEK und PI3-Kinase ausschließen. Die Möglichkeit, das faktorunabhängige Verhalten durch die Produktion von entsprechenden Zytokinen, oder über die Expression von auf der Zelloberfläche gelegenen Signalmolekülen, die anderen 32D-Zellen einen Überlebensvorteil verschaffen, war ebenfalls zu verneinen. Auf welche Weise es den FID-Zellen gelingt, ausschließlich für die Zellen mit der hyperaktiven MEK Mutante, ein faktorunabhängiges Überleben und Wachstum zu sichern geht aus den durchgeführten Experimenten nicht hervor. In dieser Frage sollte ein cDNA Microarray weiterhelfen können, die entscheidenden, MEK-abhängigen Gene zu identifizieren.

4.3. Raf/NF- κ B/MEK und die Raf Transformation

Die untersuchten Signalwege zu Apoptoseregulation durch Raf und die davon abhängigen Signalmoleküle spielen eine entscheidende Rolle in der Biologie bösartiger Neubildungen. Lange Zeit stand vor allem das aus den Mausmodellen bekannte C-Raf im Mittelpunkt des Interesses, allerdings wissen wir heute, dass seine Mutationen sich humanen Karzinomzelllinien außerordentlich selten finden (Emuss et al., 2005). Im Jahr 2006 erfolgte die Erstbeschreibung von C-Raf Mutationen an menschlichen Primärtumoren an zwei Patienten mit Therapie-assoziiertes akuter myeloischer Leukämie (t-AML) (Zebisch et al., 2006). Wesentlich häufiger sind Mutationen von B-Raf, die sich in etwa 8% aller humanen Karzinome

finden, wobei bestimmte Entitäten wie das maligne Melanom (27 bis 70%) und das papilläre Schilddrüsenkarzinom (36 bis 53%) besonders häufig betroffen sind (Garnett and Marais, 2004). Da sich die überwiegende Mehrheit der B-Raf Mutationen auf eine einzige Punktmutation V600E in der Kinasedomäne konzentriert (Davies et al., 2002) und die etablierten Therapieoptionen unbefriedigend sind, weckten B-Raf-Inhibitoren große Hoffnungen. Als Vorbild für den erfolgreichen Einsatz eines niedermolekularen Kinasehemmers kann hier die Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie dienen. Bei dieser hämatologischen Erkrankung führt eine chromosomale Translokation zu konstitutiver Aktivität der mutierten Tyrosinkinase Bcr-Abl. Mit Imatinib liegt ein relativ spezifischer Kinaseinhibitor vor, dessen Einsatz als initiale Therapie bei akzeptablen Nebenwirkungen zu einer Fünfjahresüberlebensrate von 89% führt (Druker et al., 2006). Im Vergleich dazu lag die davor eingesetzte Kombinationstherapie aus Interferon α und Cytarabin bei 68 bis 70% (Guilhot et al., 1997, Baccarani et al., 2002).

Für die Signalmoleküle der zytoplasmatischen Kaskade gibt es in erster Linie kompetitive Inhibitoren, die als kleine Moleküle gegen die ATP-Bindungsstellen der Kinasen gerichtet sind. Da sich diese Bindungsstellen nicht nur unter homologen Kinasen ähneln, hemmen solche Substanzen meist mehr als nur eine Kinase und sind damit in ihrer Spezifität eingeschränkt. Für einige der Kinasen ist darüber hinaus eine von ihrer Kinaseaktivität unabhängige Steigbügelfunktion bekannt, die weitere Signalmoleküle in die für ihre Funktion nötige räumliche Nähe bringt. Ein Beispiel ist C-Raf (Baccarini, 2005). Solche Funktionen entziehen sich dem Einfluss der kompetitiven Kinaseinhibitoren. Ein anderer Ansatz sind kleine Moleküle, die durch Anlagerung an geeigneter Stelle die Konformation eines Enzyms so verändern, dass es in seinem inaktiven Zustand verharrt (Zebisch et al., 2007). Imatinib beispielsweise ist ein solcher so genannter allosterischer Inhibitor (Schindler et al., 2000).

Unter den Inhibitoren für das bei humanen Karzinomen bedeutsame B-Raf liegen die meisten Daten zu Sorafenib vor. Dies ist ein kompetitiver Inhibitor von mutiertem und unmutiertem B-Raf sowie C-Raf mit oraler Bioverfügbarkeit. Als weitere Ziele werden mehrere Rezeptortyrosinkinasen und Rezeptoren ohne eigene Kinaseaktivität beschrieben (Downward, 2003, Beeram et al., 2005, Zebisch and Troppmair, 2006). Im Mausmodell mit xenotransplantierten malignen Melanomen und unterschiedlichen Karzinomen ließ sich eine gute Wachstumsinhibition ohne einschränkende Toxizität

erzielen, die sich in Kombination mit verschiedenen Zytostatika weiter verbessern ließ (Downward, 2003). Mittlerweile liegen die Ergebnisse der TARGET-Studie vor, einer Phase III Studie mit 903 Patienten mit fortgeschrittenem klarzelligem Nierenzellkarzinom. Dabei ergab sich ein Progressionsfreies Überleben in der Sorafenib-Gruppe von 5,5 Monaten im Vergleich zu 2,8 Monaten in der Placebogruppe (Escudier et al., 2007). Damit ließ sich bei fortgeschrittener Erkrankung eine Progressionsverzögerung erreichen, aber die viel versprechenden *in vitro* Ergebnisse waren, wie auch in kleineren Studien mit ähnlichen Substanzen, nicht uneingeschränkt in die Klinik zu übertragen.

Was die hier im Zusammenhang mit den FID-Zellen zu Forschungszwecken eingesetzten MEK-Inhibitoren angeht, so liegt mit CI-1040 eine Substanz mit oraler Bioverfügbarkeit vor, die sich in vorklinischen Studien im Mausmodell zur Entwicklung eines Lungenadenoms dem Sorafenib überlegen zeigte. Dies lässt sich mit der innerhalb der Signalkaskade weiter distal angesiedelten Position von MEK erklären, das einer weniger komplexen Gegenregulation unterliegt (Kramer et al., 2004). In einer klinischen Phase II Studie brachte die Substanz bei guter Verträglichkeit zwar keine vollständige oder teilweise Remission, aber ein Progressionsfreies Intervall von median 4,4 Monaten bei 67 Patienten mit verschiedenen fortgeschrittenen Karzinomen (Rinehart et al., 2004). Gerade hier deutet sich aber an, dass eine B-Raf Mutation, zumindest in der Zellkultur, ein verbessertes Ansprechen auf eine MEK-Inhibition bedeutet (Solit et al., 2006) und sich bei auf diese Mutation hin untersuchten Patienten möglicherweise günstigere Ergebnisse erwarten lassen.

Ein weiterer Aspekt unserer Arbeit ist, dass es viele Untersuchungen zur zellulären Transformation durch mutiertes Raf gibt, die Effekte auf Zellüberleben und Zellzyklusprogression in *in vitro* und *in vivo* Studien gezeigt haben. Im Fall der Apoptosesuppression durch Raf ist aber nach wie vor in großen Teilen unbekannt, wie diese erreicht wird. Vor allem die Frage der direkten Effekte versus der Aktivierung zusätzlicher antiapoptotischer Signalwege ist noch weitgehend offen. Trotzdem bietet aber gerade das fortschreitende Verständnis der hier untersuchten Zusammenhänge auch neue Möglichkeiten bei Tumoren mit Mutationen in Raf therapeutisch einzugreifen. MEK und PI3-Kinase stellen Targets dar, die offensichtlich wichtig sind für das Überleben und höchstwahrscheinlich auch das Wachstum Raf-transformierter Zellen. Die Verwendung von Inhibitoren für diese

Signalmoleküle bietet daher neue therapeutische Optionen in der Behandlung dieser Tumoren. Auch wenn das von uns untersuchte System keine Hinweise auf eine Rolle von NF- κ B lieferte, so wurde in malignen Melanomen mit B-Raf Mutation bereits eine Beteiligung dieses Signalweges gezeigt (Amiri and Richmond, 2005), und zukünftige Untersuchungen werden weitere Aufschlüsse über die Bedeutung dieses Signalweges bei der Melanomentstehung liefern.

Bei den in diesen und auch in unseren Studien verwendeten Raf-Konstrukten handelte es sich ausnahmslos um artifizielle Mutanten der Kinasen und erst die Beschreibung der natürlich vorkommenden mutierten B-Raf und C-Raf Varianten in menschlichen Neoplasien ermöglicht es nun, ihren Betrag zum Transformationsprozess zu untersuchen. Für die Fortführung der hier beschriebenen Untersuchungen wird es daher essentiell notwendig sein, diese auf primäre wie etablierte Tumorzellen auszudehnen, die diese Mutationen tragen. Nur dadurch wird es möglich sein, ihre Beteiligung an der Entstehung, aber auch an Wachstum und Überleben dieser Tumoren richtig zu bewerten.

5. Zusammenfassung

Aus früheren genetischen und zellbiologischen Untersuchungen ist bekannt, dass Raf die Fähigkeit besitzt, die Apoptose zu unterdrücken (Cleveland et al., 1994). Dabei ist jedoch nicht im Detail bekannt, welche Effektoren für diese Regulation eine Rolle spielen.

Am Modell der IL-3 abhängigen Zelllinie 32D wurde hier die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Apoptosesuppression durch aktiviertes Raf untersucht. In unseren Experimenten ließ sich eine solche Funktion unter Verwendung von zwei verschiedenen aktivierten Raf-Mutanten nicht nachweisen. Vielmehr ergaben sich in der von uns untersuchten Stimulation und dem zellulären Kontext Hinweise auf eine proapoptotische Wirkung. Eine solche Funktion ist vereinbar mit den NF- κ B zugeschriebenen proapoptotischen Zielgenen (Pahl, 1999). Für den Raf-Effektor MEK hingegen ist eine Rolle in der Apoptosesuppression bekannt (von Gise et al., 2001). Hier ist es gelungen mit einer hyperaktiven MEK-Mutante (Δ Stu-MEK-LIDEMANE) aus IL-3 abhängigen 32D-Zellen einen faktorunabhängigen Zellpool (FID) zu generieren. Das von den bekannten Vorstellungen über Zytokin-abhängige Zelllinien abweichende Verhalten, nach dem erst die Mutation von mehr als einem Onkogen zu einer Faktorunabhängigkeit führt (Blasi et al., 1985), wurde genauer charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass die FID-Zellen weiterhin von den Signalmolekülen MEK und PI3-Kinase abhängig waren und ein autokriner Mechanismus ebenso wie die Expression von auf der Zelloberfläche gelegenen Signalmolekülen ausgeschlossen werden konnten.

6. Literaturverzeichnis

- Aaronson, D. S. and Horvath, C. M., 2002. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science*. 296, 1653-1655.
- Abraham, D., Podar, K., Pacher, M., Kubicek, M., Welzel, N., Hemmings, B. A., Dilworth, S. M., Mischak, H., Kolch, W. and Baccarini, M., 2000. Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation. *J Biol Chem*. 275, 22300-22304.
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X. and Akey, C. W., 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*. 9, 423-432.
- Alexander, W. S., 2002. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2, 410-416.
- Amiri, K. I. and Richmond, A., 2005. Role of nuclear factor-kappa B in melanoma. *Cancer Metastasis Rev*. 24, 301-313.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M., 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 281, 1305-1308.
- Baccarani, M., Rosti, G., de Vivo, A., Bonifazi, F., Russo, D., Martinelli, G., Testoni, N., Amabile, M., Fiacchini, M., Montefusco, E., Saglio, G. and Tura, S., 2002. A randomized study of interferon-alpha versus interferon-alpha and low-dose arabinosyl cytosine in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 99, 1527-1535.
- Baccarini, M., 2005. Second nature: biological functions of the Raf-1 "kinase". *FEBS Lett*. 579, 3271-3277.
- Bader, A. G., Kang, S., Zhao, L. and Vogt, P. K., 2005. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer*. 5, 921-929.
- Baetu, T. M., Kwon, H., Sharma, S., Grandvaux, N. and Hiscott, J., 2001. Disruption of NF-kappaB signaling reveals a novel role for NF-kappaB in the regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand expression. *J Immunol*. 167, 3164-3173.
- Baud, V. and Karin, M., 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*. 11, 372-377.
- Baumann, B., Weber, C. K., Troppmair, J., Whiteside, S., Israel, A., Rapp, U. R. and Wirth, T., 2000. Raf induces NF-kappaB by membrane shuttle kinase MEKK1,

- a signaling pathway critical for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 4615-4620.
- Beeram, M., Patnaik, A. and Rowinsky, E. K., 2005. Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer. *J Clin Oncol.* 23, 6771-6790.
- Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., Mosser, D. D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P., Morimoto, R. I., Cohen, G. M. and Green, D. R., 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol.* 2, 469-475.
- Bernardi, P., 1999. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev.* 79, 1127-1155.
- Birbach, A., Gold, P., Binder, B. R., Hofer, E., de Martin, R. and Schmid, J. A., 2002. Signaling molecules of the NF-kappa B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem.* 277, 10842-10851.
- Blasi, E., Mathieson, B. J., Varesio, L., Cleveland, J. L., Borchert, P. A. and Rapp, U. R., 1985. Selective immortalization of murine macrophages from fresh bone marrow by a raf/myc recombinant murine retrovirus. *Nature.* 318, 667-670.
- Bossy-Wetzell, E., Newmeyer, D. D. and Green, D. R., 1998. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J.* 17, 37-49.
- Bottomley, M. J., Salim, K. and Panayotou, G., 1998. Phospholipid-binding protein domains. *Biochim Biophys Acta.* 1436, 165-183.
- Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D. C., Tarlinton, D. M., Kay, T. W., Kontgen, F., Adams, J. M. and Strasser, A., 1999. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science.* 286, 1735-1738.
- Briscoe, J., Kohlhuber, F. and Muller, M., 1996. JAKs and STATs branch out. *Trends Cell Biol.* 6, 336-340.
- Brown, K., Park, S., Kanno, T., Franzoso, G. and Siebenlist, U., 1993. Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 2532-2536.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. and Greenberg, M. E., 1999. Akt promotes cell survival

- by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 96, 857-868.
- Budd, R. C., Yeh, W. C. and Tschopp, J., 2006. cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nat Rev Immunol*. 6, 196-204.
- Cain, K., Brown, D. G., Langlais, C. and Cohen, G. M., 1999. Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem*. 274, 22686-22692.
- Cain, K., Langlais, C., Sun, X. M., Brown, D. G. and Cohen, G. M., 2001. Physiological concentrations of K⁺ inhibit cytochrome c-dependent formation of the apoptosome. *J Biol Chem*. 276, 41985-41990.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S. and Reed, J. C., 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 282, 1318-1321.
- Chai, J., Du, C., Wu, J. W., Kyin, S., Wang, X. and Shi, Y., 2000. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*. 406, 855-862.
- Chan, H., Bartos, D. P. and Owen-Schaub, L. B., 1999. Activation-dependent transcriptional regulation of the human Fas promoter requires NF-kappaB p50-p65 recruitment. *Mol Cell Biol*. 19, 2098-2108.
- Chang, L. and Karin, M., 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 410, 37-40.
- Chau, B. N., Cheng, E. H., Kerr, D. A. and Hardwick, J. M., 2000. Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-xL and Apaf-1. *Mol Cell*. 6, 31-40.
- Chaudhary, A., King, W. G., Mattaliano, M. D., Frost, J. A., Diaz, B., Morrison, D. K., Cobb, M. H., Marshall, M. S. and Brugge, J. S., 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338. *Curr Biol*. 10, 551-554.
- Chen, C., Edelstein, L. C. and Gelinas, C., 2000. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol*. 20, 2687-2695.
- Chen, L., Fischle, W., Verdin, E. and Greene, W. C., 2001. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science*. 293, 1653-1657.

- Choi, S. S., Park, I. C., Yun, J. W., Sung, Y. C., Hong, S. I. and Shin, H. S., 1995. A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene*. 11, 1693-1698.
- Chong, H., Vikis, H. G. and Guan, K. L., 2003. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal*. 15, 463-469.
- Chu, Z. L., McKinsey, T. A., Liu, L., Gentry, J. J., Malim, M. H. and Ballard, D. W., 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, 10057-10062.
- Cleary, M. L., Smith, S. D. and Sklar, J., 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, 19-28.
- Clem, R. J., Fechheimer, M. and Miller, L. K., 1991. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science*. 254, 1388-1390.
- Cleveland, J. L., Troppmair, J., Packham, G., Askew, D. S., Lloyd, P., Gonzalez-Garcia, M., Nunez, G., Ihle, J. N. and Rapp, U. R., 1994. v-raf suppresses apoptosis and promotes growth of interleukin-3-dependent myeloid cells. *Oncogene*. 9, 2217-2226.
- Collart, M. A., Baeuerle, P. and Vassalli, P., 1990. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol*. 10, 1498-1506.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. and Hemmings, B. A., 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 378, 785-789.
- Cutler, R. E., Jr., Stephens, R. M., Saracino, M. R. and Morrison, D. K., 1998. Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 9214-9219.
- D'Herde, K., De Prest, B., Mussche, S., Schotte, P., Beyaert, R., Coster, R. V. and Roels, F., 2000. Ultrastructural localization of cytochrome c in apoptosis demonstrates mitochondrial heterogeneity. *Cell Death Differ*. 7, 331-337.
- Darnell, J. E., Jr., 1997. STATs and gene regulation. *Science*. 277, 1630-1635.
- Datta, S. R., Brunet, A. and Greenberg, M. E., 1999. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev*. 13, 2905-2927.

- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M. E., 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 91, 231-241.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B. A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J. W., Leung, S. Y., Yuen, S. T., Weber, B. L., Seigler, H. F., Darrow, T. L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C. J., Wooster, R., Stratton, M. R. and Futreal, P. A., 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 417, 949-954.
- Deckwerth, T. L., Elliott, J. L., Knudson, C. M., Johnson, E. M., Jr., Snider, W. D. and Korsmeyer, S. J., 1996. BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron*. 17, 401-411.
- Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J. and Dedhar, S., 1998. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 11211-11216.
- Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y. and Karin, M., 1999. Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science*. 284, 309-313.
- Deveraux, Q. L. and Reed, J. C., 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*. 13, 239-252.
- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S. and Reed, J. C., 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J*. 17, 2215-2223.
- Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. and Reed, J. C., 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*. 388, 300-304.
- Dhanasekaran, N. and Premkumar Reddy, E., 1998. Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene*. 17, 1447-1455.

- Dhillon, A. S. and Kolch, W., 2002. Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch Biochem Biophys.* 404, 3-9.
- Dhillon, A. S., Pollock, C., Steen, H., Shaw, P. E., Mischak, H. and Kolch, W., 2002. Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259. *Mol Cell Biol.* 22, 3237-3246.
- Di Cristofano, A., Kotsi, P., Peng, Y. F., Cordon-Cardo, C., Elkon, K. B. and Pandolfi, P. P., 1999. Impaired Fas response and autoimmunity in Pten^{+/-} mice. *Science.* 285, 2122-2125.
- Downward, J., 1998. Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev.* 8, 49-54.
- Downward, J., 2003. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 3, 11-22.
- Druker, B. J., Guilhot, F., O'Brien, S. G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M. W., Silver, R. T., Goldman, J. M., Stone, R. M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B. L., Gabilove, J. L., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J. J., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., Verhoef, G., Shepherd, J., Saglio, G., Gratwohl, A., Nielsen, J. L., Radich, J. P., Simonsson, B., Taylor, K., Baccarani, M., So, C., Letvak, L. and Larson, R. A., 2006. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 355, 2408-2417.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X., 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 102, 33-42.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M. and Kaufmann, S. H., 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 68, 383-424.
- Ellis, H. M. and Horvitz, H. R., 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell.* 44, 817-829.
- Emuss, V., Garnett, M., Mason, C. and Marais, R., 2005. Mutations of C-RAF are rare in human cancer because C-RAF has a low basal kinase activity compared with B-RAF. *Cancer Res.* 65, 9719-9726.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S., 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 391, 43-50.

- Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W. M., Szczylik, C., Oudard, S., Siebels, M., Negrier, S., Chevreau, C., Solska, E., Desai, A. A., Rolland, F., Demkow, T., Hutson, T. E., Gore, M., Freeman, S., Schwartz, B., Shan, M., Simantov, R. and Bukowski, R. M., 2007. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 356, 125-134.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A. and Henson, P. M., 2000. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature.* 405, 85-90.
- Feig, L. A. and Buchsbaum, R. J., 2002. Cell signaling: life or death decisions of ras proteins. *Curr Biol.* 12, R259-261.
- Fesik, S. W. and Shi, Y., 2001. Structural biology. Controlling the caspases. *Science.* 294, 1477-1478.
- Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C. and Gonzalez-Baron, M., 2004. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev.* 30, 193-204.
- Fruman, D. A., Meyers, R. E. and Cantley, L. C., 1998. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem.* 67, 481-507.
- Fruman, D. A., Rameh, L. E. and Cantley, L. C., 1999. Phosphoinositide binding domains: embracing 3-phosphate. *Cell.* 97, 817-820.
- Garnett, M. J. and Marais, R., 2004. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell.* 6, 313-319.
- Gaur, U. and Aggarwal, B. B., 2003. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol.* 66, 1403-1408.
- Gibson, L., Holmgreen, S. P., Huang, D. C., Bernard, O., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Sutherland, G. R., Baker, E., Adams, J. M. and Cory, S., 1996. bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene.* 13, 665-675.
- Glucksmann, A., 1965. Cell death in normal development. *Arch Biol (Liege).* 76, 419-437.
- Green, D. R. and Evan, G. I., 2002. A matter of life and death. *Cancer Cell.* 1, 19-30.
- Greenberger, J. S., Sakakeeny, M. A., Humphries, R. K., Eaves, C. J. and Eckner, R. J., 1983. Demonstration of permanent factor-dependent multipotential

- (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80, 2931-2935.
- Greenhalgh, C. J. and Hilton, D. J., 2001. Negative regulation of cytokine signaling. *J Leukoc Biol.* 70, 348-356.
- Grimm, T., Schneider, S., Naschberger, E., Huber, J., Guenzi, E., Kieser, A., Reitmeir, P., Schulz, T. F., Morris, C. A. and Sturzl, M., 2005. EBV latent membrane protein-1 protects B cells from apoptosis by inhibition of BAX. *Blood.* 105, 3263-3269.
- Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C. and Korsmeyer, S. J., 1998. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo J.* 17, 3878-3885.
- Gross, A., McDonnell, J. M. and Korsmeyer, S. J., 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13, 1899-1911.
- Grumont, R. J., Rourke, I. J. and Gerondakis, S., 1999. Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes Dev.* 13, 400-411.
- Guilhot, F., Chastang, C., Michallet, M., Guerci, A., Harousseau, J. L., Maloisel, F., Bouabdallah, R., Guyotat, D., Cheron, N., Nicolini, F., Abgrall, J. F. and Tanzer, J., 1997. Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group. *N Engl J Med.* 337, 223-229.
- Hagemann, C. and Rapp, U. R., 1999. Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res.* 253, 34-46.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100, 57-70.
- Hausmann, G., O'Reilly, L. A., van Driel, R., Beaumont, J. G., Strasser, A., Adams, J. M. and Huang, D. C., 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, 623-634.
- Heidecker, G., Huleihel, M., Cleveland, J. L., Kolch, W., Beck, T. W., Lloyd, P., Pawson, T. and Rapp, U. R., 1990. Mutational activation of c-raf-1 and definition of the minimal transforming sequence. *Mol Cell Biol.* 10, 2503-2512.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G. and Schaper, F., 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 374, 1-20.

- Hengartner, M. O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407, 770-776.
- Hengartner, M. O. and Horvitz, H. R., 1994. Activation of *C. elegans* cell death protein CED-9 by an amino-acid substitution in a domain conserved in Bcl-2. *Nature*. 369, 318-320.
- Herrera, R. and Sebolt-Leopold, J. S., 2002. Unraveling the complexities of the Raf/MAP kinase pathway for pharmacological intervention. *Trends Mol Med*. 8, S27-31.
- Hochstrasser, M., 2001. SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell*. 107, 5-8.
- Hofmann, K., 1999. The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell Mol Life Sci*. 55, 1113-1128.
- Horvitz, H. R., Sternberg, P. W., Greenwald, I. S., Fixsen, W. and Ellis, H. M., 1983. Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 48 Pt 2, 453-463.
- Hu, Y., Benedict, M. A., Wu, D., Inohara, N. and Nunez, G., 1998. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 4386-4391.
- Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P. and Fesik, S. W., 1996. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature*. 384, 638-641.
- Huang, C. Y. and Ferrell, J. E., Jr., 1996. Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93, 10078-10083.
- Huang, H., Joazeiro, C. A., Bonfoco, E., Kamada, S., Levenson, J. D. and Hunter, T., 2000. The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J Biol Chem*. 275, 26661-26664.
- Huser, M., Lockett, J., Chiloehes, A., Mercer, K., Iwobi, M., Giblett, S., Sun, X. M., Brown, J., Marais, R. and Pritchard, C., 2001. MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *Embo J*. 20, 1940-1951.
- Huxford, T., Huang, D. B., Malek, S. and Ghosh, G., 1998. The crystal structure of the I κ B α /NF- κ B complex reveals mechanisms of NF- κ B inactivation. *Cell*. 95, 759-770.

- Ikeda, F. and Dikic, I., 2006. CYLD in ubiquitin signaling and tumor pathogenesis. *Cell*. 125, 643-645.
- Jackson, P. K., 2001. A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev*. 15, 3053-3058.
- Jiang, X. and Wang, X., 2000. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem*. 275, 31199-31203.
- Joazeiro, C. A. and Weissman, A. M., 2000. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*. 102, 549-552.
- Johnson, D. E., Gastman, B. R., Wieckowski, E., Wang, G. Q., Amoscato, A., Delach, S. M. and Rabinowich, H., 2000. Inhibitor of apoptosis protein hIAP undergoes caspase-mediated cleavage during T lymphocyte apoptosis. *Cancer Res*. 60, 1818-1823.
- Jordan, B. W., Dinev, D., LeMellay, V., Troppmair, J., Gotz, R., Wixler, L., Sendtner, M., Ludwig, S. and Rapp, U. R., 2001. Neurotrophin receptor-interacting mage homologue is an inducible inhibitor of apoptosis protein-interacting protein that augments cell death. *J Biol Chem*. 276, 39985-39989.
- Jurgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. and Reed, J. C., 1998. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 4997-5002.
- Karin, M. and Ben-Neriah, Y., 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol*. 18, 621-663.
- Kasof, G. M., Lu, J. J., Liu, D., Speer, B., Mongan, K. N., Gomes, B. C. and Lorenzi, M. V., 2001. Tumor necrosis factor- α induces the expression of DR6, a member of the TNF receptor family, through activation of NF- κ B. *Oncogene*. 20, 7965-7975.
- Kawakami, H., Tomita, M., Matsuda, T., Ohta, T., Tanaka, Y., Fujii, M., Hatano, M., Tokuhisa, T. and Mori, N., 2005. Transcriptional activation of survivin through the NF- κ B pathway by human T-cell leukemia virus type I tax. *Int J Cancer*. 115, 967-974.
- Kerkhoff, E. and Rapp, U. R., 2001. The Ras-Raf relationship: an unfinished puzzle. *Adv Enzyme Regul*. 41, 261-267.
- Kerr, J. F., 1971. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol*. 105, 13-20.

- Kerr, J. F., 2002. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*. 181-182, 471-474.
- Kidd, V. J., Lahti, J. M. and Teitz, T., 2000. Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin Cell Dev Biol*. 11, 191-201.
- King, A. J., Sun, H., Diaz, B., Barnard, D., Miao, W., Bagrodia, S. and Marshall, M. S., 1998. The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature*. 396, 180-183.
- Kolch, W., 2000. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*. 351 Pt 2, 289-305.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T. J., Kirschner, M. W., Kohts, K., Kwiatkowski, D. J. and Williams, L. T., 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*. 278, 294-298.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M. J., Fenton, W. and Reed, J. C., 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, 4701-4714.
- Kramer, B. W., Gotz, R. and Rapp, U. R., 2004. Use of mitogenic cascade blockers for treatment of C-Raf induced lung adenoma in vivo: CI-1040 strongly reduces growth and improves lung structure. *BMC Cancer*. 4, 24.
- Kubicek, M., Pacher, M., Abraham, D., Podar, K., Eulitz, M. and Baccarini, M., 2002. Dephosphorylation of Ser-259 regulates Raf-1 membrane association. *J Biol Chem*. 277, 7913-7919.
- Kuida, K., Zheng, T. S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P. and Flavell, R. A., 1996. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*. 384, 368-372.
- Kumar, V., Abbas, A. and Fausto, N., 2004. *Pathologic Basis of Disease*. Saunders.
- Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D. R. and Newmeyer, D. D., 2002. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*. 111, 331-342.
- LeBlanc, A. C., 2003. Natural cellular inhibitors of caspases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 27, 215-229.

- LeBlanc, H. N. and Ashkenazi, A., 2003. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ.* 10, 66-75.
- Lee, F. S., Peters, R. T., Dang, L. C. and Maniatis, T., 1998. MEKK1 activates both I κ B kinase alpha and I κ B kinase beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 9319-9324.
- Li, W., Chong, H. and Guan, K. L., 2001. Function of the Rho family GTPases in Ras-stimulated Raf activation. *J Biol Chem.* 276, 34728-34737.
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J. E., MacKenzie, A. and Korneluk, R. G., 1996. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature.* 379, 349-353.
- Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Betz, S. F., Oost, T., Herrmann, J., Wu, J. C. and Fesik, S. W., 2000. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature.* 408, 1004-1008.
- Lockshin, R. A. and Williams, C. M., 1965. Programmed Cell Death--I. Cytology Of Degeneration In The Intersegmental Muscles Of The Pernyi Silkmoth. *J Insect Physiol.* 11, 123-133.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X., 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 94, 481-490.
- Madrid, L. V., Mayo, M. W., Reuther, J. Y. and Baldwin, A. S., Jr., 2001. Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the I κ B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J Biol Chem.* 276, 18934-18940.
- Madrid, L. V., Wang, C. Y., Guttridge, D. C., Schottelius, A. J., Baldwin, A. S., Jr. and Mayo, M. W., 2000. Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. *Mol Cell Biol.* 20, 1626-1638.
- Maehama, T. and Dixon, J. E., 1998. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem.* 273, 13375-13378.
- Mahajan, N. P., Linder, K., Berry, G., Gordon, G. W., Heim, R. and Herman, B., 1998. Bcl-2 and Bax interactions in mitochondria probed with green

- fluorescent protein and fluorescence resonance energy transfer. *Nat Biotechnol.* 16, 547-552.
- Mansour, S. J., Matten, W. T., Hermann, A. S., Candia, J. M., Rong, S., Fukasawa, K., Vande Woude, G. F. and Ahn, N. G., 1994. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science.* 265, 966-970.
- Marshall, C. J., 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell.* 80, 179-185.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J. M., Susin, S. A., Vieira, H. L., Prevost, M. C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J. C. and Kroemer, G., 1998. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science.* 281, 2027-2031.
- Mason, C. S., Springer, C. J., Cooper, R. G., Superti-Furga, G., Marshall, C. J. and Marais, R., 1999. Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *Embo J.* 18, 2137-2148.
- Massoumi, R., Podda, M., Fassler, R. and Paus, R., 2006. Cylindroma as tumor of hair follicle origin. *J Invest Dermatol.* 126, 1182-1184.
- Matsui, K., Fine, A., Zhu, B., Marshak-Rothstein, A. and Ju, S. T., 1998. Identification of two NF-kappa B sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: functional analysis in T cell hybridoma. *J Immunol.* 161, 3469-3473.
- Mikula, M., Schreiber, M., Husak, Z., Kucerova, L., Ruth, J., Wieser, R., Zatloukal, K., Beug, H., Wagner, E. F. and Baccarini, M., 2001. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *Embo J.* 20, 1952-1962.
- Morrison, D. K., 2001. KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? *J Cell Sci.* 114, 1609-1612.
- Morrison, D. K. and Cutler, R. E., 1997. The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 9, 174-179.
- Morrison, D. K., Heidecker, G., Rapp, U. R. and Copeland, T. D., 1993. Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J Biol Chem.* 268, 17309-17316.
- Motoyama, N., Wang, F., Roth, K. A., Sawa, H., Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S. and et al., 1995. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science.* 267, 1506-1510.

- Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettlesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. L. and Fesik, S. W., 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*. 381, 335-341.
- Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S. and Dixit, V. M., 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem*. 273, 2926-2930.
- Nicholson, K. M. and Anderson, N. G., 2002. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*. 14, 381-395.
- Nicotera, P., Leist, M. and Ferrando-May, E., 1999. Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. *Biochem Soc Symp*. 66, 69-73.
- Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z. and Matsumoto, K., 1999. The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*. 398, 252-256.
- Nosaka, T., van Deursen, J. M., Tripp, R. A., Thierfelder, W. E., Witthuhn, B. A., McMickle, A. P., Doherty, P. C., Grosveld, G. C. and Ihle, J. N., 1995. Defective lymphoid development in mice lacking Jak3. *Science*. 270, 800-802.
- Osaki, M., Oshimura, M. and Ito, H., 2004. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*. 9, 667-676.
- Ott, M., Robertson, J. D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B. and Orrenius, S., 2002. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 1259-1263.
- Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M. and Donner, D. B., 1999. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*. 401, 82-85.
- Pahl, H. L., 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 18, 6853-6866.
- Perez, G. I., Knudson, C. M., Leykin, L., Korsmeyer, S. J. and Tilly, J. L., 1997. Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. *Nat Med*. 3, 1228-1232.
- Perry, D. K., Smyth, M. J., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Duriez, P., Poirier, G. G. and Hannun, Y. A., 1997. Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *J Biol Chem*. 272, 18530-18533.

- Print, C. G., Loveland, K. L., Gibson, L., Meehan, T., Stylianou, A., Wreford, N., de Kretser, D., Metcalf, D., Kontgen, F., Adams, J. M. and Cory, S., 1998. Apoptosis regulator *bcl-w* is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 12424-12431.
- Rameh, L. E. and Cantley, L. C., 1999. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem.* 274, 8347-8350.
- Rane, S. G. and Reddy, E. P., 2000. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene.* 19, 5662-5679.
- Rapp, U. R., Goldsborough, M. D., Mark, G. E., Bonner, T. I., Groffen, J., Reynolds, F. H., Jr. and Stephenson, J. R., 1983. Structure and biological activity of *v-raf*, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80, 4218-4222.
- Ravi, R., Bedi, G. C., Engstrom, L. W., Zeng, Q., Mookerjee, B., Gelinas, C., Fuchs, E. J. and Bedi, A., 2001. Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat Cell Biol.* 3, 409-416.
- Rawlings, J. S., Rosler, K. M. and Harrison, D. A., 2004. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci.* 117, 1281-1283.
- Renatus, M., Stennicke, H. R., Scott, F. L., Liddington, R. C. and Salvesen, G. S., 2001. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 14250-14255.
- Rinehart, J., Adjei, A. A., Lorusso, P. M., Waterhouse, D., Hecht, J. R., Natale, R. B., Hamid, O., Varterasian, M., Asbury, P., Kaldjian, E. P., Gulyas, S., Mitchell, D. Y., Herrera, R., Sebolt-Leopold, J. S. and Meyer, M. B., 2004. Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon, and pancreatic cancer. *J Clin Oncol.* 22, 4456-4462.
- Rommel, C., Radziwill, G., Lovric, J., Noeldeke, J., Heinicke, T., Jones, D., Aitken, A. and Moelling, K., 1996. Activated Ras displaces 14-3-3 protein from the amino terminus of c-Raf-1. *Oncogene.* 12, 609-619.
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. and Reed, J. C., 1997. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J.* 16, 6914-6925.
- Roy, N., Mahadevan, M. S., McLean, M., Shutler, G., Yaraghi, Z., Farahani, R., Baird, S., Besner-Johnston, A., Lefebvre, C., Kang, X. and et al., 1995. The

- gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell*. 80, 167-178.
- Roy, S. and Nicholson, D. W., 2000. Cross-talk in cell death signaling. *J Exp Med*. 192, 21-26.
- Rudel, T. and Bokoch, G. M., 1997. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science*. 276, 1571-1574.
- Ruggiero, M., Wang, L. M. and Pierce, J. H., 1991. Mitogenic signal transduction in normal and transformed 32D hematopoietic cells. *FEBS Lett*. 291, 203-207.
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S. M., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. and Velculescu, V. E., 2004. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 304, 554.
- Sattler, M., Liang, H., Nettlesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., Thompson, C. B. and Fesik, S. W., 1997. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*. 275, 983-986.
- Savill, J. and Fadok, V., 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. 407, 784-788.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H. and Peter, M. E., 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J*. 17, 1675-1687.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S. J., Krammer, P. H. and Peter, M. E., 1999. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem*. 274, 22532-22538.
- Schendel, S. L., Montal, M. and Reed, J. C., 1998. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ*. 5, 372-380.
- Schindler, C. and Darnell, J. E., Jr., 1995. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem*. 64, 621-651.
- Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W. T., Clarkson, B. and Kuriyan, J., 2000. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science*. 289, 1938-1942.

- Schulze, A., Lehmann, K., Jefferies, H. B., McMahon, M. and Downward, J., 2001. Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. *Genes Dev.* 15, 981-994.
- Schulze, A., Nicke, B., Warne, P. H., Tomlinson, S. and Downward, J., 2004. The transcriptional response to Raf activation is almost completely dependent on Mitogen-activated Protein Kinase Kinase activity and shows a major autocrine component. *Mol Biol Cell.* 15, 3450-3463.
- Scorrano, L., Ashiya, M., Buttler, K., Weiler, S., Oakes, S. A., Mannella, C. A. and Korsmeyer, S. J., 2002. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell.* 2, 55-67.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C. and Karin, M., 2001a. Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science.* 293, 1495-1499.
- Senftleben, U., Li, Z. W., Baud, V. and Karin, M., 2001b. IKK β is essential for protecting T cells from TNF α -induced apoptosis. *Immunity.* 14, 217-230.
- Shibasaki, F., Kondo, E., Akagi, T. and McKeon, F., 1997. Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. *Nature.* 386, 728-731.
- Shimizu, S., Narita, M. and Tsujimoto, Y., 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature.* 399, 483-487.
- Silke, J., Hawkins, C. J., Ekert, P. G., Chew, J., Day, C. L., Pakusch, M., Verhagen, A. M. and Vaux, D. L., 2002. The anti-apoptotic activity of XIAP is retained upon mutation of both the caspase 3- and caspase 9-interacting sites. *J Cell Biol.* 157, 115-124.
- Simpson, L. and Parsons, R., 2001. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res.* 264, 29-41.
- Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H. G., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S., Green, D. R. and Martin, S. J., 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.* 144, 281-292.

- Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K. and Neer, E. J., 1999. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci.* 24, 181-185.
- Soengas, M. S., Capodici, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J. G., Gerald, W. L., Lazebnik, Y. A., Cordon-Cardo, C. and Lowe, S. W., 2001. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature.* 409, 207-211.
- Solit, D. B., Garraway, L. A., Pratilas, C. A., Sawai, A., Getz, G., Basso, A., Ye, Q., Lobo, J. M., She, Y., Osman, I., Golub, T. R., Sebolt-Leopold, J., Sellers, W. R. and Rosen, N., 2006. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature.* 439, 358-362.
- Staal, S. P., 1987. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84, 5034-5037.
- Stehlik, C., de Martin, R., Kumabashiri, I., Schmid, J. A., Binder, B. R. and Lipp, J., 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, 211-216.
- Stennicke, H. R. and Salvesen, G. S., 1997. Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J Biol Chem.* 272, 25719-25723.
- Sun, C., Cai, M., Meadows, R. P., Xu, N., Gunasekera, A. H., Herrmann, J., Wu, J. C. and Fesik, S. W., 2000. NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J Biol Chem.* 275, 33777-33781.
- Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M. and Kroemer, G., 1996. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med.* 184, 1331-1341.
- Suzuki, Y., Nakabayashi, Y. and Takahashi, R., 2001. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 8662-8667.
- Tak, P. P. and Firestein, G. S., 2001. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest.* 107, 7-11.
- Tanaka, M., Fuentes, M. E., Yamaguchi, K., Durnin, M. H., Dalrymple, S. A., Hardy, K. L. and Goeddel, D. V., 1999. Embryonic lethality, liver degeneration, and

- impaired NF-kappa B activation in IKK-beta-deficient mice. *Immunity*. 10, 421-429.
- Tang, G., Yang, J., Minemoto, Y. and Lin, A., 2001. Blocking caspase-3-mediated proteolysis of IKKbeta suppresses TNF-alpha-induced apoptosis. *Mol Cell*. 8, 1005-1016.
- Tao, Y., Yan, D., Yang, Q., Zeng, R. and Wang, Y., 2006. Low K⁺ promotes NF-kappaB/DNA binding in neuronal apoptosis induced by K⁺ loss. *Mol Cell Biol*. 26, 1038-1050.
- Thomis, D. C., Gurniak, C. B., Tivol, E., Sharpe, A. H. and Berg, L. J., 1995. Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3. *Science*. 270, 794-797.
- Tojima, Y., Fujimoto, A., Delhase, M., Chen, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kaneko, Y., Nimura, Y., Motoyama, N., Ikeda, K., Karin, M. and Nakanishi, M., 2000. NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature*. 404, 778-782.
- Troppmair, J., Hartkamp, J. and Rapp, U. R., 1998. Activation of NF-kappa B by oncogenic Raf in HEK 293 cells occurs through autocrine recruitment of the stress kinase cascade. *Oncogene*. 17, 685-690.
- Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C. and Croce, C. M., 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*. 226, 1097-1099.
- Turpin, P., Hay, R. T. and Dargemont, C., 1999. Characterization of IkappaBalpha nuclear import pathway. *J Biol Chem*. 274, 6804-6812.
- Tzivion, G., Luo, Z. and Avruch, J., 1998. A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature*. 394, 88-92.
- Valtieri, M., Tweardy, D. J., Caracciolo, D., Johnson, K., Mavilio, F., Altmann, S., Santoli, D. and Rovera, G., 1987. Cytokine-dependent granulocytic differentiation. Regulation of proliferative and differentiative responses in a murine progenitor cell line. *J Immunol*. 138, 3829-3835.
- Vaux, D. L., Cory, S. and Adams, J. M., 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. 335, 440-442.
- Vaux, D. L., Weissman, I. L. and Kim, S. K., 1992. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science*. 258, 1955-1957.

- Veis, D. J., Sorenson, C. M., Shutter, J. R. and Korsmeyer, S. J., 1993. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*. 75, 229-240.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J. and Vaux, D. L., 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 102, 43-53.
- Vivanco, I. and Sawyers, C. L., 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2, 489-501.
- von Gise, A., Lorenz, P., Wellbrock, C., Hemmings, B., Berberich-Siebelt, F., Rapp, U. R. and Troppmair, J., 2001. Apoptosis suppression by Raf-1 and MEK1 requires MEK- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signals. *Mol Cell Biol*. 21, 2324-2336.
- Walker, P. R., Leblanc, J., Smith, B., Pandey, S. and Sikorska, M., 1999. Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. *Methods*. 17, 329-338.
- Wang, C. Y., Cusack, J. C., Jr., Liu, R. and Baldwin, A. S., Jr., 1999. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med*. 5, 412-417.
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V. and Baldwin, A. S., Jr., 1998. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*. 281, 1680-1683.
- Wang, H. G., Rapp, U. R. and Reed, J. C., 1996a. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell*. 87, 629-638.
- Wang, K., Yin, X. M., Chao, D. T., Milliman, C. L. and Korsmeyer, S. J., 1996b. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev*. 10, 2859-2869.
- Ward, A. C., Touw, I. and Yoshimura, A., 2000. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood*. 95, 19-29.
- Warne, P. H., Viciano, P. R. and Downward, J., 1993. Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature*. 364, 352-355.
- Watowich, S. S., Hilton, D. J. and Lodish, H. F., 1994. Activation and inhibition of erythropoietin receptor function: role of receptor dimerization. *Mol Cell Biol*. 14, 3535-3549.
- Wen, Z. and Darnell, J. E., Jr., 1997. Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no

- influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Res.* 25, 2062-2067.
- Wick, K. L. and Liu, F., 2001. A new molecular target of insulin action: regulating the pivotal PDK1. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 1, 209-221.
- Wiese, S., Pei, G., Karch, C., Troppmair, J., Holtmann, B., Rapp, U. R. and Sendtner, M., 2001. Specific function of B-Raf in mediating survival of embryonic motoneurons and sensory neurons. *Nat Neurosci.* 4, 137-142.
- Wojnowski, L., Zimmer, A. M., Beck, T. W., Hahn, H., Bernal, R., Rapp, U. R. and Zimmer, A., 1997. Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat Genet.* 16, 293-297.
- Woronicz, J. D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M. and Goeddel, D. V., 1997. I κ B kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with I κ B kinase-alpha and NIK. *Science.* 278, 866-869.
- Wu, J., Dent, P., Jelinek, T., Wolfman, A., Weber, M. J. and Sturgill, T. W., 1993. Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science.* 262, 1065-1069.
- Wu, M. X., Ao, Z., Prasad, K. V., Wu, R. and Schlossman, S. F., 1998. IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival. *Science.* 281, 998-1001.
- Wyllie, A. H., 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 284, 555-556.
- Yaffe, M. P., Ohta, S. and Schatz, G., 1985. A yeast mutant temperature-sensitive for mitochondrial assembly is deficient in a mitochondrial protease activity that cleaves imported precursor polypeptides. *Embo J.* 4, 2069-2074.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B. and Korsmeyer, S. J., 1995. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell.* 80, 285-291.
- Yin, X. M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K. A. and Korsmeyer, S. J., 1999. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature.* 400, 886-891.
- Yoon, S. and Seger, R., 2006. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors.* 24, 21-44.

- Yoshida, H., Kong, Y. Y., Yoshida, R., Elia, A. J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J. M. and Mak, T. W., 1998. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell*. 94, 739-750.
- Zebisch, A., Czernilofsky, A. P., Keri, G., Smigelskaite, J., Sill, H. and Troppmair, J., 2007. Signaling through RAS-RAF-MEK-ERK: from basics to bedside. *Curr Med Chem*. 14, 601-623.
- Zebisch, A., Staber, P. B., Delavar, A., Bodner, C., Hiden, K., Fischereeder, K., Janakiraman, M., Linkesch, W., Auner, H. W., Emberger, W., Windpassinger, C., Schimek, M. G., Hoefler, G., Troppmair, J. and Sill, H., 2006. Two transforming C-RAF germ-line mutations identified in patients with therapy-related acute myeloid leukemia. *Cancer Res*. 66, 3401-3408.
- Zebisch, A. and Troppmair, J., 2006. Back to the roots: the remarkable RAF oncogene story. *Cell Mol Life Sci*. 63, 1314-1330.
- Zha, J., Harada, H., Osipov, K., Jockel, J., Waksman, G. and Korsmeyer, S. J., 1997. BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J Biol Chem*. 272, 24101-24104.
- Zhong, H., SuYang, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Ghosh, S., 1997. The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell*. 89, 413-424.
- Zhong, H., Voll, R. E. and Ghosh, S., 1998. Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell*. 1, 661-671.
- Zhong, J., Troppmair, J. and Rapp, U. R., 2001. Independent control of cell survival by Raf-1 and Bcl-2 at the mitochondria. *Oncogene*. 20, 4807-4816.
- Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M. H. and Hung, M. C., 2001. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol*. 3, 245-252.

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
BSA	Rinderserumalbumin
C	Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
C-terminal	carboxyterminal
cDNA	Copy DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EGF	epidermal growth factor
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
ERK	extracellular signal regulated kinase
FBS	fötales Rinderserum
g	Gramm; Erdbeschleunigung
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor, granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	Granulozyten und Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor, granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
I κ B	Inhibitor of κ B
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilo Dalton
kb	Kilo Basen
l	Liter
LIF	Leukämie inhibierender Faktor, leukemia inhibitory factor

M	Mol/Liter
m	milli
μ	mikro-
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor, macrophage colony stimulating factor
MEK	MAP/ERK Kinase
MEKK	MEK Kinase
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Botenribonukleinsäure
MSZ	Institut für medizinische Strahlenkunde und Zellforschung
NF-κB	nuclear factor kappa B
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N',N',N',N'-tetramethylendiamin
SCF	Stammzellfaktor, stem cell factor
TGF	tumor growth factor
™	eingetragenes Warenzeichen
Tris	Tris(hydroxymethyl)methylamin Hydrochlorid
U	Units
V	Volt

8. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Weiterhin erkläre ich, dass die vorgelegte Arbeit noch in keinem anderen Prüfungsverfahren in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegen hat.

Außer den in dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden habe ich keine weiteren Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Hannover, den

Wolfgang Tränkenschuh

Danksagungen

Herrn Professor Dr. med. Ulf R. Rapp möchte ich herzlich für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu dürfen danken und dabei eine anregende Zusammenarbeit der unterschiedlichen Arbeitsgruppen des Hauses zu erfahren.

In besonderem Maße gilt mein Dank meinem Betreuer Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Jakob Troppmair für das Überlassen des interessanten Themas und das Begleiten dieser Arbeit, auch dafür dass sein Engagement später über die weite Entfernung nicht nachließ. Frau Ruth Baldauf sei namentlich für die zahlreichen Korrekturen und den herzlichen Empfang in Innsbruck gedankt.

Herrn Professor Dr. med. Gilbert Schönfelder möchte ich für seine Bereitschaft das Koreferat zu übernehmen danken.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch alle Mitarbeitern in unserem und den benachbarten Labors, die mir bei den zahlreichen Fragen, die im Rahmen dieser Arbeit auftraten weiterhalfen, insbesondere Frau Dr. Ulrike Rennefahrt, die mir zu unzähligen Gelegenheiten die erste Ansprechpartnerin war und Dr. Andris Avots, der mir den Umgang mit dem FACS nahegebracht hat.

Weiterhin haben mir Frau Dr. Andrea Denk und Herr Professor Thomas Wirth mit ihrem EMSA-Versuch wertvolle Unterstützung geleistet.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meinen Eltern und meiner Schwester bedanken, die mich über die ganze Zeit unterstützt haben.

Anschließend danke ich allen, die nicht namentlich erwähnt sind, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.