

**„Der Einfluss der regulierten Expression der
onkogenen Kinase PKB/Akt auf die T-Zell-vermittelte
Tumorabstoßung“**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Patricia Serena Hänel
geb. in Mainz

Mainz, 2007

Die Arbeit wurde extern an der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik, Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität, angefertigt.

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2007

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	2
1.1. Der programmierte Zelltod (Apoptose)	2
1.1.1. Endphase der Apoptose	3
1.1.2. Extrinsischer Signalweg der Apoptose	4
1.1.3. Todesrezeptor-unabhängige Induktion der Apoptose	5
1.1.4. Intrinsischer Signalweg der Apoptose	7
1.2. Proteinkinase B/Akt (PKB/Akt)	10
1.2.1. Struktur und Aufbau	10
1.2.2. Regulation von PKB/Akt	12
1.2.3. Substrate der PKB/Akt	13
1.2.4. Deregulation der PKB/Akt	16
1.3. Zielsetzung der Arbeit	17
2. Material und Methoden	19
2.1. Material	19
2.1.1. Geräte und Zubehör	19
2.1.2. Chemikalien	20
2.1.3. Lösungen und Puffer	20
2.1.4. Längenstandards	23
2.1.5. Nährmedien	23
2.1.6. Bakterienstämme	23
2.1.7. Enzyme	23
2.1.8. Fertigsysteme	24
2.1.9. Primer	24
2.1.10. Plasmide	25
2.1.11. Zellkulturmedien, Zusätze und verwendete Materialien	26
2.1.12. Zelllinien	27
2.1.12. Antikörper	29
2.1.14. Mausstämme	30
2.1.14.1. C57Bl/6	30

2.1.14.2. CyA2K ^b	30
2.1.14.3. NOD/LtSz-scid/scid	31
2.1.14.4. KO-Pfr1	31
2.1.15. Verwendete Software	31
2.1.16. Verwendete Datenbanken	32
2.1.17. Auftragsarbeiten	32
2.2. Methoden	33
2.2.1. Agarosegelelektrophorese	33
2.2.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen / Gelextraktion	33
2.2.3. Klonierung von PCR-Produkten in einen TA- <i>Cloning vector</i>	34
2.2.4. Enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA	34
2.2.5. Aufreinigung von Vektor-DNA	34
2.2.6. Dephosphorylierung von Vektoren	34
2.2.7. Ligation	35
2.2.8. Transformation kompetenter Bakterien	35
2.2.9. Plasmid-Präparationen	36
2.2.10. Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	36
2.2.11. Isolierung von DNA aus Gewebe	37
2.2.12. Gewinnung von RNA aus eukaryotischen Zellkulturen	37
2.2.13. cDNA-Synthese	37
2.2.14. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.2.14.1. qRT-PCR	38
2.2.15. Zellkultur	39
2.2.15.1. Herstellen von Zelllinien	39
2.2.15.2. Passagieren von Zellen	40
2.2.15.3. Einfrieren von Zellen	40
2.2.15.4. Auftauen von Zellen	40
2.2.15.5. Restimulation muriner T-Zell-Linien	41
2.2.15.6. Zellzahlbestimmung	41
2.2.16. Herstellung stabil transduzierter Zelllinien	41
2.2.16.1. Transfektion von eukaryotischer Zelllinien mittels Calciumphosphat	41
2.2.16.2. Retrovirale Transduktion von eukaryotischer Zelllinien	42

2.2.16.3. Selektion von Zelllinien	42
2.2.16.4. Herstellung retroviraler bzw. lentiviraler Virusüberstände	43
2.2.17. Durchflusszytometrie	44
2.2.17.1. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials	44
2.2.17.2. Bestimmung des Zellzyklusprofils	45
2.2.17.3. Direkte und indirekte Markierung von Oberflächenantigenen	46
2.2.18. Fluoreszenzfärben von Zellen	46
2.2.18.1. Kokultur	47
2.2.19. Behandlung von Zelllinien mit zytotoxischen Agenzien	47
2.2.20. Behandlung von Zelllinien mit UV-Bestrahlung	47
2.2.21. Kolonie-Kokulturassay	48
2.2.22. Chrom-Freisetzungs-Assay	48
2.2.23. Mausmodelle	49
2.2.23.1. Bestrahlen von Mäusen	49
2.2.23.2. Gewinnung von Milzzellen aus Mäusen	49
2.2.23.3. Applikation von Milzzellen	50
2.2.23.4. Transplantation von Tumorzellen	50
2.2.23.5. Aufnahme des Tumorwachstums	50
2.2.23.6. Explantieren von Tumorgewebe	50
2.2.23.7. Genotypisierung des Mausstamms C57Bl/6-Pfr1 tm1Sdz/J	51
2.2.24. Immunmagnetische Zellseparation	51
2.2.25. Proteinbiochemische Methoden	52
2.2.25.1. Herstellung von Gesamtzellextrakten	52
2.2.25.2. Herstellung von Tumorextrakten aus explantierten Maustumoren	53
2.2.25.3. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	53
2.2.25.4. Auftrennung von Proteinen durch SDS-Gelelektrophorese	54
2.2.25.5. Proteintransfer immobilisierter Proteine auf Nitrocellulosemembran	55
2.2.25.6. Immunodetektion von Proteinen	56
2.2.25.7. Dehybridisieren der Membran	56
2.2.26. Konditional aktivierbares Expressionssystem	57
2.2.26.1. Aktivierung des ER ^{tam} -Fusionsproteins <i>in vivo</i>	57
2.2.27. <i>in vitro</i> Kinase-Assay	57

2.2.28. <i>in vitro</i> Proliferations-Assay	58
3. Ergebnisse	59
3.1. Validierung des konditionalen Expressionssystems <i>in vitro</i>	59
3.2. Kinetik zur Aktivierung des konditionalen Expressionssystems <i>in vitro</i>	61
3.3. Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der mit PKB/Akt-ER ^{tam} transduzierten Zellen <i>in vitro</i>	62
3.4. Etablierung eines HLA-A*0201-transgenen Tumormodells mit CyA2K ^b -PKB/Akt Er ^{tam} -Mef <i>in vivo</i>	63
3.5. Validierung der Funktionalität des konditionalen Expressionssystems <i>in vivo</i>	66
3.6. Untersuchungen zur Hemmung von Apoptose durch konditional aktivierte PKB/Akt <i>in vitro</i>	67
3.6.1. Hemmung Staurosporin-induzierter Apoptose durch konditional aktivierte PBK/Akt-ER ^{tam}	67
3.6.2. Hemmung UV-induzierter Apoptose durch konditional aktivierte PBK/Akt-ER ^{tam}	69
3.7. Einfluss konditional aktivierter PKB/Akt-ER ^{tam} auf die Hemmung der durch HLA-A*0201-restringierten murinen ZTL vermittelten Wachstumshemmung <i>in vitro</i>	70
3.8. Konditional aktivierte PKB/Akt-ERTam hemmt die Tumorsuppression adoptiv transplantierte zellulärer Immuneffektoren <i>in vivo</i>	75
3.9. Identifikation und Charakterisierung der Effektorpopulation <i>in vivo</i>	76
3.10. Identifikation des molekularen Mechanismus der durch PKB/Akt vermittelten Apoptosehemmung	79
3.10.1. Charakterisierung des molekularen Mechanismus der durch PKB/Akt vermittelten Immunresistenz	79
3.10.2. Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation anti- apoptotischer Gene der BCL-2-Familie	80
3.10.3. Untersuchungen zur PKB/Akt-abhängigen post-transkriptionellen Regulation anti-apoptotischer Proteine	

der BCL-2-Familie	82
3.10.4. Untersuchungen zur Bedeutung von MCL-1 für die PKB/Akt-abhängige Immunresistenz	83
3.11. Untersuchungen zur Wirkung pharmakologischer Inhibitoren auf die PKB/Akt-abhängige Resistenz <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	86
3.11.1. Untersuchung zur Wirkung von ABT-737 auf PKB/Akt-vermittelte Apoptosehemmung <i>in vitro</i>	86
3.11.2. Untersuchung zur Wirkung von Rapamycin auf PKB/Akt-vermittelte Resistenz <i>in vivo</i>	88
3.12. Kinetische Untersuchungen zur Identifikation eines kritischen Zeitfensters für die PKB/Akt-induzierte Immunresistenz	93
4. Diskussion	95
4.1. PKB/Akt als Resistenzfaktor gegenüber immunologischen Effektormechanismen	95
4.2. PKB/Akt vermittelt Apoptoseresistenz <i>in vitro</i>	96
4.3. PKB/Akt vermittelt Immunresistenz gegenüber ZTL-vermittelter Zytotoxizität <i>in vivo</i>	97
4.4. PKB/Akt-abhängige posttranskriptionelle Stabilisierung von MCL-1 vermittelt Immunresistenz	98
4.5. MCL-1 und mTOR sind kritische Effektoren in der PKB/Akt-vermittelten Immunresistenz	99
4.5.1. MCL-1 als Regulator von Zellüberleben	99
4.5.2. Pharmakologische Regulation von MCL-1	101
4.5.3. Inhibition des mTOR-Signalweges sensitiviert Tumorzellen gegenüber der ZTL-vermittelten Zytotoxizität	102
4.6. Ausblick	105
5. Literaturverzeichnis	107
6. Danksagung	116
Anhang	I
1. Abkürzungsverzeichnis	I

2. Abbildungsverzeichnis	IV
3. Tabellenverzeichnis	VII
4. shRNA	VIII

Zusammenfassung

Eine wesentliche Voraussetzung für die maligne Transformation von Zellen ist die Inaktivierung des programmierten Zelltodes (Apoptose). Die dabei erworbenen Defekte der Apoptose-Signalwege führen häufig zu Resistenzen gegenüber Radio- und Chemotherapien. Immuntherapeutische Ansätze haben zum Ziel, solche resistenten Tumorzellen spezifisch zu entfernen. Resistenzen gegenüber Immuntherapien können wiederum in einer gestörten Immunerkennung der Tumorzellen oder deren Resistenz gegenüber Immuneffektormechanismen begründet sein. Wesentliche Effektoren der zellulären Immunantwort sind zytotoxische T-Zellen (ZTL) und natürliche Killer (NK)-Zellen, welche beide Tumorzellen durch Induktion von Apoptose eliminieren.

Ziel dieser Arbeit war, zu überprüfen, ob durch die Proteinkinase B (PKB)/Akt Immunresistenz vermittelt werden kann. Hierbei zeigte sich, dass die Aktivierung des PKB/Akt-Signalweges in Tumorzellen einen deutlichen Schutz gegenüber verschiedenen Apoptosestimuli *in vitro* vermittelt. Die konditionale Aktivierung von PKB/Akt hemmte sowohl die pharmakologisch, als auch die durch ZTL induzierte Apoptose-Signalkaskade über eine posttranskriptionelle Stabilisierung des anti-apoptotischen Proteins MCL-1. Diese Beobachtung konnte auch in einem murinen Tumorummuntherapiemodell *in vivo* bestätigt werden. Unstimulierte Splenozyten von C57Bl/6-Mäusen wurden adoptiv in NOD/SCID-Mäuse mit etablierten, PKB/Akt-exprimierenden, murinen Fibrosarkomen transferiert. Die konditionale Aktivierung von PKB/Akt inhibierte den tumorsuppressiven Effekt dieser transplantierten Splenozyten signifikant. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die PKB/Akt-abhängige Immunresistenz auch *in vivo* durch anti-apoptotisches MCL-1 vermittelt wird. PKB/Akt-exprimierende Fibrosarkome mit supprimierter endogener MCL-1-Expression verloren ihre Resistenz gegenüber der durch adoptiven Splenozytentransfer vermittelten Tumorsuppression. Dies bestätigte endogenes MCL-1 als entscheidenden Faktor der PKB/Akt-vermittelten Immunresistenz. Ferner konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der PKB/Akt-induzierten Signaltransduktion auf der Ebene der nachgeschalteten Kinase mTOR etablierte Fibrosarkome gegenüber adoptiver Lymphozytentherapie sensitiviert. Der mTOR-Inhibitor Rapamycin verhinderte die PKB/Akt-induzierte Aufregulation von MCL-1 und die damit einhergehende Resistenzentwicklung *in vivo*.

Zusammengefasst wurde erstmalig gezeigt, dass eine Deregulation des PKB/Akt-Signalweges Resistenz gegenüber immunologischer Tumorsuppression vermitteln kann. PKB/Akt stellt somit ein entscheidendes Zielmolekül für die Verbesserung von Krebsimmuntherapien dar.

1. Einleitung

1.1. Der programmierte Zelltod (Apoptose)

Bei der Apoptose handelt sich um einen physiologischen Prozess zur Eliminierung überzähliger Zellen. Die Vorgänge, die bei der Apoptose ablaufen, sind genetisch determiniert, so dass man von einem „programmierten“ Zelltod sprechen kann (Lockshin and Williams, 1965). Für einen vielzelligen Organismus ist eine ausgewogene Balance zwischen Zellproliferation und Zelltod von essentieller Bedeutung. So werden z.B. während der Embryogenese Zellen gezielt entfernt, die nicht mehr benötigt werden. Auch im adulten Organismus ist eine Balance zwischen Zellproliferation und Zellsterben wichtig, wie sie unter anderem durch den Prozess der Apoptose gewährleistet wird. Kommt es in diesem Gleichgewicht zu Deregulationen zugunsten der Apoptose, kann dies in z.B. neurodegenerativen Krankheiten resultieren. Umgekehrt spielt eine Suppression der Apoptose vor allem bei der malignen Transformation der Zelle eine Rolle (Vermeulen et al., 2005), was z.B. zur Ausbildung von Krebserkrankungen führen kann. Durch inaktivierende Mutationen pro-apoptotischer Gene oder durch Überexpression anti-apoptotischer Gene können transformierte Zellen überleben, die resistent gegenüber intrinsischen und extrinsischen Apoptosestimuli sind. Eine solche Apoptosedefizienz kann bei der Entstehung von Resistenzen gegenüber Radio- und Chemotherapie und Immuntherapien von Bedeutung sein (Igney and Krammer, 2002).

Die Apoptose zeichnet sich durch einen gesetzmäßigen Verlauf aus, der durch morphologische und biochemische Merkmale gekennzeichnet ist, und grenzt sich hier von der Nekrose ab (Kerr et al., 1972). Im Gegensatz zur Nekrose bleibt bei der Apoptose die Plasmamembranintegrität erhalten. Im Verlauf des Zelltodes schnüren sich exozytotische Membranvesikel von der Plasmamembran ab, die Fragmente der Zelle enthalten. Diese apoptotischen Körperchen (*apoptotic bodies*) sind ein charakteristisches morphologisches Merkmal der Apoptose. Die Vesikel werden von Nachbarzellen bzw. Makrophagen aufgenommen, ohne dass zytosolische Bestandteile der apoptotischen Zelle in den extrazellulären Raum treten und inflammatorische Reaktionen verursachen können (Nishikawa and Sasaki, 1996). Durch Exposition spezifischer Signalmoleküle markieren sich apoptotische Zellen, um von Immunzellen für die Phagozytose erkannt zu werden (Botto, 2004). Im weiteren Verlauf der Apoptose kondensiert das Chromatin im Nukleus der Zelle und Endonukleasen spalten die chromosomale DNA zwischen den Nukleosomen. Diese

Spaltprodukte können elektrophoretisch aufgetrennt werden und zeigen die für die Apoptose charakteristische „DNA-Leiter“ (Ellis et al., 1991). Die Spaltung der DNA ist das Ergebnis einer Kaskade von intrazellulären Prozessen, bei denen pro- und anti-apoptische Signale eine Rolle spielen. Eine ausgewogene Balance zwischen diesen beiden Signalwegen garantiert die biologische Homöostase und die Aufrechterhaltung der physiologischen Prozesse in einem mehrzelligen Organismus (Jacobson et al., 1997).

1.1.1. Endphase der Apoptose

Der Ablauf der Apoptose kann in zwei Phasen unterteilt werden: die Initiationsphase und die Exekutionsphase. In beiden Phasen werden spezifische Cystein-abhängige Aspartat-spaltende Proteasen (Caspasen) aktiviert. Die für die Apoptose relevanten Caspasen werden in Initiator- und Effektorcaspasen unterschieden (Shi, 2002), wobei Initiatorcaspasen über eine längere Pro-Domäne verfügen. Diese Aminosäuresequenz beinhaltet Motive für die Selbstassoziation und die Bindung an aktivierende Adaptoren (Stennicke and Salvesen, 2000). Pro-Caspase-9 assoziiert z.B. mit dem Adapterprotein APAF-1 (*A*poptotic *P*rotease *A*ctivating *F*actor 1), welches in Abhängigkeit von Cytochrom C das Apoptosom bildet (Rodriguez and Lazebnik, 1999); Pro-Caspase-8 wird durch Bindung an das Adapterprotein FADD (*F*as *A*ssociated *D*eath *D*omain) im DISC-Komplex (*D*eah *I*nducing *S*ignaling *C*omplex) aktiviert (Lavrik et al., 2003).

Caspasen liegen als inaktive Zymogene in der Zelle vor. Die Aktivierung der Caspasen erfolgt entweder autokatalytisch oder nach Prozessierung durch andere Proteasen. Die Zymogene besitzen je eine große und eine kleine Untereinheit, die durch eine Linker-Domäne miteinander verbunden sind. Am Aminoterminus ist eine Pro-Domäne lokalisiert. Zur Aktivierung der Caspasen wird erst die Pro-Domäne abgespalten und in einer zweiten Reaktion die große Untereinheit von der kleinen durch Spaltung der Linker-Domäne getrennt. Die entstandenen Caspasenmonomere bilden ein aktives Dimer. Aktive Caspasen bestehen somit aus einem Heterotetramer, welches sich aus zwei identischen großen und zwei identischen kleinen Untereinheiten zusammensetzt.

Effektorcaspasen (Caspasen-3, -6 und -7) liegen im Zytosol als latente Dimere vor und werden über Spaltung durch Initiatorcaspasen aktiviert (Chai et al., 2001). Außer Initiatorcaspasen kann die Spaltung der Effektorcaspasen auch im Rahmen der T-

Zell-vermittelten Apoptose durch Granzym B erfolgen, aber auch Effektorcaspasen selbst können diese Spaltung vermitteln. Hierbei handelt es sich um einen Amplifikationsmechanismus, der in der Endphase der Apoptose von Bedeutung ist.

Substrate der Caspasen umfassen Strukturproteine, Reparaturenzyme, Zellzyklusregulatoren und weitere zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase wichtige Faktoren. So spaltet Caspase-3 z.B. das Protein ICAD (*Inhibitor of Caspase-Activated DNase*). Dadurch wird die Endonuklease CAD freigesetzt und fragmentiert nach Translokation in den Zellkern die chromosomale DNA in charakteristischer Weise (Enari et al., 1998). Das DNA-Reparaturenzym PARP (*Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Protein*) würde mit diesem Prozess antagonisieren und wird entsprechend von Caspase-3 degradiert (An and Knox, 1996), so dass die Fragmentierung der DNA nicht mehr inhibiert wird.

Durch diese Aktivierung von Endonukleasen und die Degeneration zellulärer Strukturen leiten Effektorcaspasen die finalen Schritte der Apoptose ein.

1.1.2. Extrinsischer Signalweg der Apoptose

Apoptose kann durch verschiedene Signalwege ausgelöst werden. So wird zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Signalweg unterschieden. Der extrinsische Signalweg ist membranvermittelt, die „Todessignale“ werden über die Familie der Todesrezeptoren in die Zelle übertragen. Diese in der Plasmamembran lokalisierten Rezeptoren verfügen über eine sogenannte zytosolische Todesdomäne. Kommt es zur Rezeptor-Liganden-Interaktion, folgt eine aktivierende Rezeptortrimerisierung; dadurch können sich Adapterproteine direkt oder indirekt über ihre eigene Todesdomäne an die des Rezeptors anlagern. Diese FADD (*Fas Associated Death Domain*)-Proteine verfügen zusätzlich über eine Todes-Effektor-Domäne (*Death Effector Domain (DED)*), an die wiederum die Pro-Caspase-8 über ihre Todesdomäne binden kann. Der gebildete Komplex aus Ligand, Rezeptor, FADD und Pro-Caspase-8 wird als DISC (*Death Inducing Signaling Complex*) bezeichnet (Muzio et al., 1996; Boldin et al., 1996).

Pro-caspasen-8 transaktivieren sich gegenseitig und wirken letztlich aktivierend auf die Effektorcaspase-3 und andere Effektorcaspasen. Ein weiteres Zielprotein der Caspase-8 ist das BH3-only Protein BID, welches von Caspase-8 gespalten wird (Li et al., 1998). Daraus resultiert ein trunkiertes BID (*tBID*), welches an den Mitochondrien eine Freisetzung von Cytochrom C bewirkt. Cytochrom C seinerseits

führt ebenfalls zur Aktivierung der Caspasen-9 und -3 und leitet damit die Apoptose ein.

Der DISC-Signalweg kann durch c-FLIP-Expression, eine dominant negative Form der Caspase-8, inhibiert werden. Ist cFLIP (*cellular FLICE-Inhibitory Protein*) bei der DISC-Formation beteiligt, ist der gebildete Komplex nicht zur weiteren Signalweiterleitung fähig, da die Transaktivierung der Caspasen-8 gestört ist (Kataoka, 2005).

Zu den am genauesten untersuchten Reaktionswegen der extrinsischen Apoptose gehört der über Fas (*Fibroblast Associated*)-Rezeptor (auch bezeichnet als CD95 oder Apo-1 (*Apoptosis-1*)) vermittelte Reaktionsweg.

Die Fas-vermittelte Apoptose ist ein wichtiger Mechanismus für Induktion der Apoptose in der Immunantwort. Bei der Aktivierung von T-Zellen kommt es zur Expression des Liganden FasL, der auf der Oberfläche der aktivierten T-Zelle präsentiert wird. Folgt nun eine Bindung der T-Zelle an den Zielzellrezeptor über die Interaktion FasL-Fas, wird der extrinsische Apoptose-Signalweg in der Zielzelle ausgelöst.

Abgesehen von Fas gibt es noch weitere Todesrezeptoren, die ähnliche oder dieselben intrazellulären Signalstoffe und Reaktionswege benutzen, z.B. TNF-r1 (*Tumor Necrosis Factor Receptor 1*) TRAIL-Rezeptor 1, TRAIL-Rezeptor 2, TRAMP (Locksley et al., 2001; Walczak and Krammer, 2000).

1.1.3. Todesrezeptor-unabhängige Induktion der Apoptose

Zytotoxische T-Zellen (ZTL) induzieren neben Expression von FasL auch über Perforin/Granzym B Zelltod in Zielzellen (Kagi et al., 1994a; Podack et al., 1985). Beide Arten der Zytotoxizität sind kontaktabhängig, wobei die Perforin-vermittelte Zytotoxizität bei CD8⁺-T-Zellen sowie bei natürlichen Killer (NK) -Zellen dominant ist (Kagi et al., 1994b), wogegen der über Fas-vermittelte Signalweg eine große Bedeutung bei CD4⁺-T-Zellen mit einem T-Helfer Phänotyp 1 hat (Ju et al., 1994). Im Gegensatz zu NK-Zellen liegen CD8⁺-T-Zellen als naive Zellen vor und müssen sich erst durch Proliferation und Differenzierung zu aktiven zytotoxischen Zellen entwickeln. Dieser Vorgang wird durch Bindung des T-Zell-Rezeptors der naiven T-Zelle an ein Antigen, welches auf der Oberfläche einer anderen Zelle im Kontext von MHC-Klasse I (*Major-Histocompatibility-Complex*)-Molekülen präsentiert wird, ausgelöst (Zinkernagel and Doherty, 1974).

Serinproteasen, allen voran die Serinprotease Granzym B, kommen bei dieser Form der Apoptoseinduktion eine tragende Rolle zu. Sie werden von zytotoxischen Lymphozyten in Form zytolytischer Granula sezerniert, nachdem die aktive T-Zelle die Zielzelle über rezeptorabhängige Kontakte erkannt hat.

Ein weiterer Bestandteil der zytolytischen Granula ist Perforin, ein sekretorisches Protein mit einem Molekulargewicht von etwa ~67kD, das aus 534 Aminosäuren besteht, (Lichtenheld and Podack, 1989). Perforin zeichnet sich durch eine große Ähnlichkeit mit den porenbildenden Komplementkomponenten C6-C9 aus und ist in der Lage, Poren in den Membranen der Zielzelle zu bilden (Podack et al., 1985; Shinkai et al., 1988). Die Bindung von Perforin an die Phospholipid-Doppelschicht und die Polymerisation sind Ca^{2+} -abhängige Prozesse. Die Rolle von Perforin wird kontrovers diskutiert; so ging man lange davon aus, Perforin selbst löse den Zelltod durch Porenbildung in der Zielzellmembran aus. Auch die Theorie, dass Perforin lediglich das Eindringen der Granzyme ermöglicht, wird heute bezweifelt, da die von Perforin gebildeten Poren zu klein sind, um den Granzym-Komplexen das Vordringen in die Zelle zu ermöglichen (Froelich et al., 1996; Browne et al., 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass Granzym B an hochaffine Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Zielzelle bindet, durch Endozytose aufgenommen wird und in Vesikeln akkumuliert (Pinkoski et al., 1998). Apoptose wird aber nur in Anwesenheit von Perforin ausgelöst, welches Poren in die Endosomenmembran schlägt (Froelich et al., 1996). Andere Studien legen den Schluss nahe, dass Perforin mit Granzym B in den Endosomen ko-internalisiert wird und dann von innen heraus in der Endosomenmembran Poren bildet, so dass Granzym B in das Zytoplasma gelangt (Talanian et al., 1997).

Granzym B induziert in der Zielzelle Caspasen-unabhängige Apoptose z.B. durch die Spaltung von ICAD und Freisetzung der Endonuklease CAD (Andrade et al., 2004). Eine Caspasen-abhängige Apoptose durch Spaltung der Caspase-10 durch Granzym B wird diskutiert (Adrain et al., 2005).

Des Weiteren konnte eine Spaltung des BH3-only Proteins BID durch Granzym B beobachtet werden (Heibein et al., 2000), was eine Permeabilisation der äußeren mitochondrialen Membran und letztlich eine Cytochrom C-Freisetzung zur Folge hat.

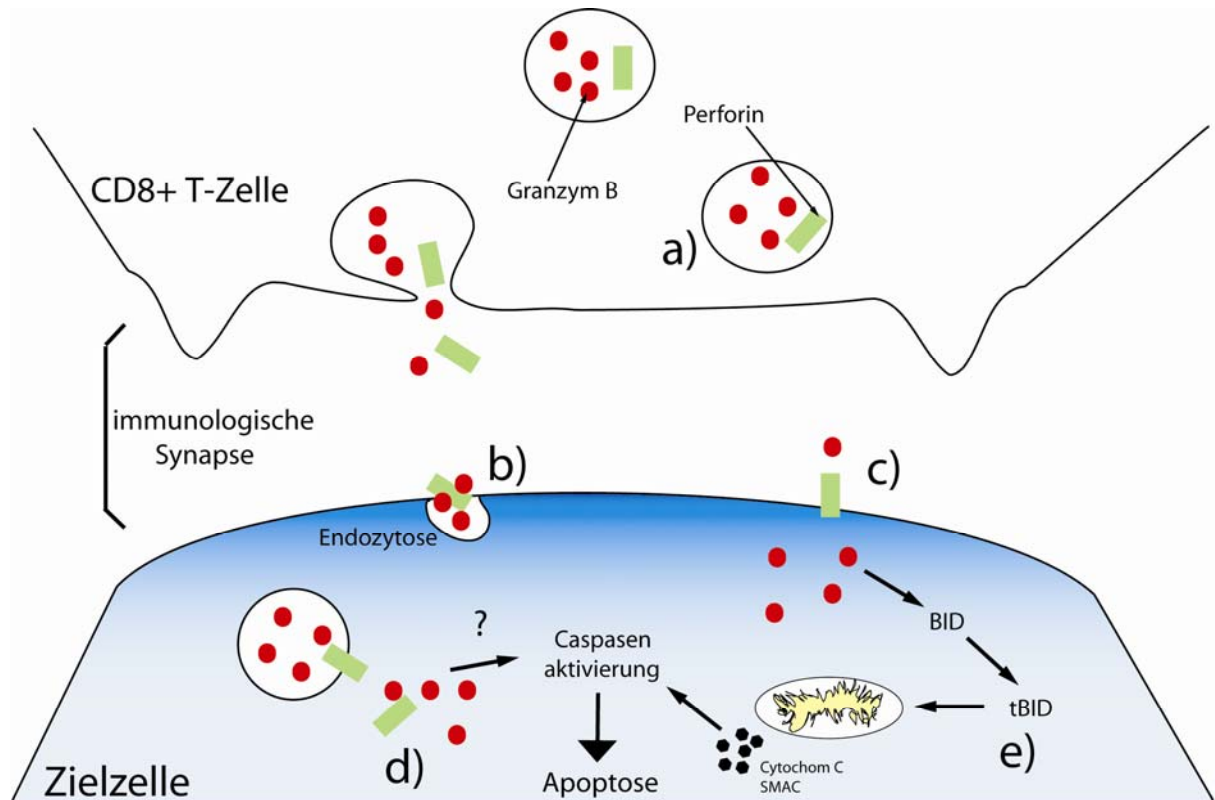


Abb. 1.1.: Granzym B-vermittelte Aktivierung der Apoptose

a) Zytotoxische CD8⁺-T-Zellen verfügen über Vesikel, in denen sich Granzym B und Perforin befinden. Bei Kontakt mit einer Zielzelle und Ausbildung einer immunologischen Synapse, wird der Inhalt der Vesikel in den extrazellulären Raum entlassen.

Für die Aufnahme der Granzyme in die Zielzelle werden mehrere Modelle diskutiert: **b)** Granzym B bindet über hochaffine Rezeptoren an die Membran der Zielzelle und wird über Endozytose in die Zelle aufgenommen. Endozytisiertes Perforin formt Poren in die Endosomenmembran und fördert so die intrazelluläre Freisetzung von Granzym B. **c)** Eine andere Theorie postuliert die Ca²⁺-abhängige Bindung von Perforin an die Zellmembran der Zielzelle, durch Formen einer Pore kann das Granzym B eindringen. **d)** Ob Granzym B durch Spaltung der Initiatorcaspase-10 eine Aktivierung der Caspasenkaskade, die die Vorgänge der Apoptose auslöst, bewirkt, wird diskutiert. **e)** Granzym B spaltet das BH3-only-Protein BID. Das carboxyterminale Fragment von BID (tBID) induziert eine Permeabilisation der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP). Dadurch kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C und SMAC, welche Apoptose initiieren.

1.1.4. Intrinsischer Signalweg der Apoptose

Neben der exogenen Aktivierung des programmierten Zelltodes, kann dieser auch auf endogene Weise aktiviert werden. Vor allem durch zellulären Streß, wie DNA-Schäden, Entzug von Wachstumsfaktoren oder Onkogenexpression, lösen diese Form der Apoptose aus (Green, 1998). Hierbei haben Mitochondrien essentielle regulatorische Aufgaben und nehmen die zentrale Rolle in diesem Signalweg der Apoptose ein.

Schlüsselpositionen in diesem Prozess besitzen die Mitglieder der BCL-2 (*B-Cell CLL/Lymphoma 2*)-Familie. Die humane BCL-2-Familie besteht aus mehr als 20 bisher identifizierten Proteinen, die entweder anti- oder pro- apoptotische Funktionen wahrnehmen. Die Klassifikation dieser Proteine wird anhand der Anzahl ihrer alpha-helikalen BH (*BCL-2-Homologie*)-Domänen vorgenommen. So können BCL-2 Proteinen zwischen einer und vier dieser konservierten Domänen besitzen. Für die Membranbindung der Proteine ist eine carboxyterminale, hydrophobe Domäne verantwortlich (Nguyen et al., 1993). Die verschiedenen Mitglieder dieser Proteinfamilie interagieren über ihre BH3-Domäne miteinander, die bei allen Familienmitgliedern vorhanden ist.

Pro-apoptotische BCL-2-Proteine unterteilen sich in die Gruppen der BH3-only-Proteine sowie in die Gruppe der Multidomänen-Proteine. BAX, BAK und BOK zählen zu den Multidomänen-Proteinen, während BAD, BIK, BID, BLK, BIM, NOXA, PUMA und weitere Proteine zur Familie der BH3-only-Proteine gehören. Anti-apoptotische BCL-2-Proteine sind z.B. BCL-2, MCL-1, BCL-x_L, A1 und BCL-w. Diese Proteine wechselwirken miteinander, wobei sich im Verlauf der Apoptose das Gleichgewicht der pro- und der anti-apoptotischen Proteine zugunsten der pro-apoptotischen verschiebt.

Ein zentraler Regulator der intrinsischen Apoptose ist das Protein p53, das während der Apoptose die Transkription von PUMA und NOXA aktiviert. Diese BH3-Proteine hemmen die Wirkung von BCL-2 und BCL-x_L, welche somit nicht mehr die pro-apoptotischen Proteine BAX und BAK inhibieren können.

Die Aktivierung der Mitochondrien wird die Proteine BAX und BAK ausgelöst. BAX transloziert auf einen pro-apoptotischen Stimulus hin zum Mitochondrium und assoziiert mit der Membran über den carboxyterminalen Bereich. Oligomerisiert BAX, kommt es zu einer Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (*MOMP*) und dadurch zur Freisetzung von Cytochrom C und anderer mitochondrialer Faktoren. BAK hingegen ist auch in inaktivem Zustand in der mitochondrialen Membran lokalisiert. Seine Aktivität wird durch anti-apoptotische BH3-Proteine wie z.B. MCL-1 reguliert (Willis et al., 2005; Gelinas and White, 2005).

Kommt es zu einer Wechselwirkung von pro-apoptotischen mit anti-apoptotischen Familienmitgliedern, wie BCL-2, MCL-1, BCL-x_L, A1 und BCL-w, wird die Wirkung der pro-apoptotischen Faktoren antagonisiert (Kluck et al., 1997). Die Unterfamilie der BH3-only-Proteine der BCL-2 Gen-Familie reguliert den Vorgang der Aktivierung des

mitochondrialen Signalweges, indem sie anti-apoptotische Proteine wie BCL- x_L und BCL-2 aus der Bindung an BAX verdrängen können und hierdurch BAX (oder auch BAK) aktivieren. Solche Wirkungen wurden mittlerweile auch für BAD, BIM und BID gezeigt.

Die Homodimerisierung von BAX oder BAK bzw. die Heterodimerisierung beider Proteine führt zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Zytosolisches Cytochrom C bindet an das Adapterprotein APAF-1 und ermöglicht somit die Aktivierung des Apoptosoms, welches die Effektorcaspase 3 über Caspase-9 aktiviert (Li et al., 1997). Cytochrom C bildet mit APAF-1 das sogenannte Apoptosom in das Caspase-9 rekrutiert wird. Durch diese Komplexbildung wird Caspase-9 aktiviert. Caspase-9 wiederum aktiviert durch proteolytische Spaltung Effektorcaspasen wie Caspase-3 (Green, 2000).

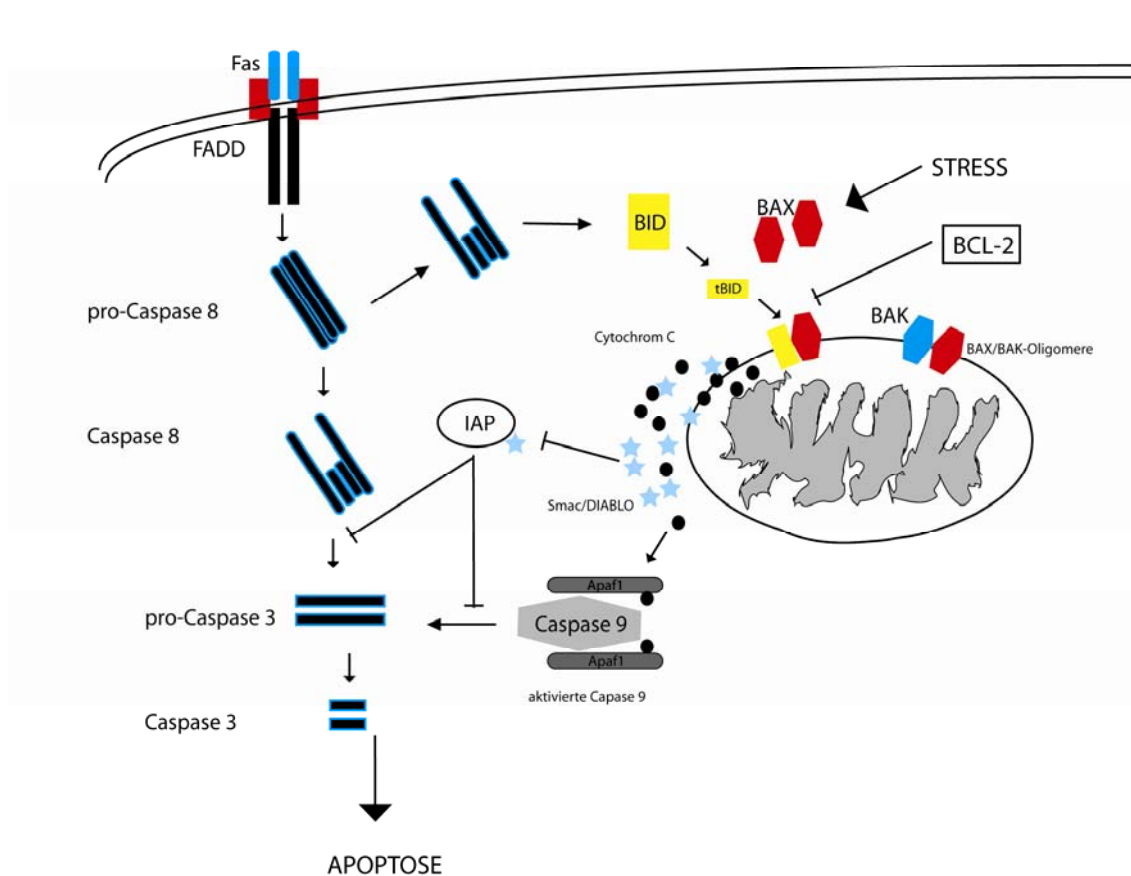


Abb. 1.2.: Schematische Darstellung der Caspasenaktivierung

Durch Einfluss pro-apoptotischer Mitglieder der BCL-2-Familie kommt es zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran und zur Freisetzung von Cytochrom C sowie Smac/DIABLO ins Zytosol. Cytochrom C bildet mit APAF-1 das Apoptosom und rekrutiert Caspase-9, die wiederum weitere Effektorcaspasen wie Caspase-3 aktiviert. Eine Aktivierung von Caspase 3 wird auch über Spaltung durch Caspase-8 ausgelöst, welche wiederum auf Todesrezeptor-abhängige Weise aktiviert wird. Smac/DIABLO inhibiert IAP-Proteine, die ihrerseits Repressorfunktionen auf die Caspasenaktivierung ausüben.

Die Aktivierung der Caspasen kann durch IAP (*Inhibitors of Apoptosis*)-Proteine gehemmt werden. Diese Proteine verfügen über eine BIR (*Baculoviral-IAP-Repeats*)-Domäne und sind hochkonservierte Proteine innerhalb der Eukaryoten (Deveraux and Reed, 1999).

Die Apoptosehemmung durch IAP-Proteine findet hauptsächlich auf der Ebene der Initiatorcaspasen statt (Deveraux et al., 1998; Deveraux and Reed, 1999).

Smac, ein weiterer Faktor, der für die Regulation des Zelltodes verantwortlich ist, wird ebenfalls bei der Permeabilisierung der mitochondrialen Membran freigesetzt. Als Repressor der IAP-Proteine fungiert Smac/DIABLO als pro-apoptotischer Faktor (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000).

1.2. Proteinkinase B/Akt (PKB/Akt)

Die Serin/Threonin-Kinase PKB/Akt ist ein Substrat der Phosphatidylinositol-3-Kinase (*PI3K*) und somit ein zentraler Mediator des PI3K-Signalweges in der intakten sowie der malignen Zelle.

1.2.1. Struktur und Aufbau

PKB/Akt ist eine 57kD große Serin/Threonin Kinase. Im Genom der Mammalia konnten drei Gene gefunden werden, die für drei Isoformen der Kinase codieren: PKB α /Akt1, PKB β /Akt2 und PKB γ /Akt3 (Datta et al., 1999). Die Aminosäuresequenz von Akt2 zeigt eine 81% Homologie, die Sequenz von Akt3 eine 83%ige Homologie mit Akt1 (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000). Alle drei Isoformen verfügen über eine Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne im Aminoterminal, eine zentrale katalytische Domäne sowie eine carboxylterminale regulatorische Domäne. Bei der PH-Domäne handelt es sich um eine globuläre Proteindomäne, die sich aus ca. 100 Aminosäuren zusammensetzt.

Es wird angenommen, dass alle drei Isoformen durch gemeinsame Mechanismen aktiviert werden. Im Weiteren wird auf die Isoform PKB α /Akt1 eingegangen, da die meisten Studien zur Regulation von PKB/Akt mit der alpha-Isoform durchgeführt worden sind. Alle Isoformen verfügen über zwei regulatorische Phosphorylierungsstellen; diese sind bei Akt1 an Threonin 308 und Serin 473 lokalisiert. Phosphorylierung an Threonin 308 aktiviert die Kinase teilweise, zur vollständigen Aktivierung bedarf es jedoch der Phosphorylierung an beiden

Aminosäuren. Eine Phosphorylierung an Serin 473 alleine hat hingegen kaum Effekte auf die Aktivierung der Kinase (Alessi et al., 1996).

Das Gen für PKB α /Akt1 ist auf dem Chromosom 14q32 lokalisiert, wohingegen PKB β /Akt2 auf Chromosom 19q13.1-13.2 und PKB γ /Akt3 auf dem Chromosom 1q44 gefunden wurden (Staal et al., 1988; Nakatani et al., 1999; Cheng et al., 1992).

Die einzelnen Isoformen werden in den verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert; so ist eine starke Expression von PKB α /Akt1 in Gehirn, Herz und Lunge zu finden, PKB β /Akt2 wird vornehmlich in der Skelettmuskulatur und im embryonalen braunen Fettgewebe exprimiert, wogegen PKB γ /Akt3 in Gehirn, Niere und embryonalem Herzgewebe zur Expression kommt (Altomare et al., 1995; Altomare et al., 1998; Brodbeck et al., 1999; Coffey and Woodgett, 1991).

Die unterschiedlichen Funktionen der einzelnen Isoformen konnten durch Studien mit verschiedenen Knockout-Mausstämmen näher charakterisiert werden.

So sind PKB α /Akt1-defiziente Mäuse verglichen mit dem Elternstamm kleiner und haben eine erhöhte Apoptoserate im Thymus (Cho et al., 2001a; Chen et al., 2001). Zu dem kann eine erhöhte perinatale Mortalität bei diesen Tieren festgestellt werden. Genauere Untersuchungen zeigten, dass PKB α /Akt1 in der Entwicklung der Plazenta eine Rolle spielt (Cho et al., 2001a). Im Gegensatz dazu zeigen Mäuse, die über kein PKB β /Akt2 verfügen, einen diabetischen Phänotyp (Cho et al., 2001b; Garofalo et al., 2003). Dieser Phänotyp gibt Hinweise auf die Rolle von PKB β /Akt2 im Glukosemetabolismus der Zelle. Bei PKB γ /Akt3 -defizienten Mäuse wurde eine um ~25% reduzierte Hirngröße festgestellt, welche sowohl durch Reduktion der Zellzahl als auch der Zellgröße hervorgerufen wird (Tschopp et al., 2005). Doppel-Knockout-Mäuse für PKB α / β /Akt1/2 zeigen schwere Störungen in ihrer Entwicklung und sterben kurz nach der Geburt. Bei diesen Tieren sind abnorme Knochenentwicklung, Muskelatrophie und Anomalien in der Epidermisentwicklung phänotypisch (Peng et al., 2003).

Diese Beobachtungen zusammengefasst, spiegeln die unterschiedlichen Funktionen bzw. unterschiedlichen Gewebe-spezifischen Verteilungen der drei Isoformen der PKB/Akt wider.

1.2.2. Regulation von PKB/Akt

Die Aktivierung von PKB/Akt erfolgt in mehreren Schritten, bei denen die Phosphorylierung sowie die Rekrutierung zur Zellmembran eine Rolle spielen.

PKB/Akt ist ein Substrat der PI3K; bei PI3K handelt es sich um ein Heterodimer, das sich aus der katalytischen Untereinheit p110 sowie der regulatorischen Adapteruntereinheit p85 zusammensetzt. Diese Untereinheit wird durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (*RTK*) sowie von GPCR (*G-protein coupled receptor*) aktiviert (Wymann et al., 2003). Aktivierte PI3K setzt durch Phosphorylierung der 3. Position des Inositol-Ringe PI(4,5)P₂ zu PI(3, 4, 5,)P₃ um.

PI(3, 4, 5,)P₃ reagiert mit dem Bindungsmotiv der PH-Domäne von PKB/Akt; diese Interaktion ist verantwortlich für die Rekrutierung von PKB/Akt zur Plasmamembran. Eine damit einhergehende Konformationsänderung erlaubt die nächsten Schritte der Phosphorylierung der Kinase PKB α /Akt1 an Threonin 308 sowie Serin 473. Die Phosphorylierungsstelle Threonin 308 ist in der Kinase-Domäne lokalisiert und wird durch PDK1 (*Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1*), ebenfalls eine Kinase mit PH-Domäne, phosphoryliert (Anderson et al., 1998; Andjelkovic et al., 1997).

Die Identität der Serin 473-Kinase konnte noch nicht endgültig geklärt werden: So gibt es Hinweise, dass auch diese Phosphorylierung durch PDK1 bewerkstelligt wird (Balendran et al., 1999); andere Untersuchungen weisen auf eine Beteiligung von ILK (*Integrin-Linked-Kinase*) hin (Delcommenne et al., 1998; Persad et al., 2001). Des Weiteren wird eine Autophosphorylierung von PKB/Akt diskutiert. Neueste Hinweise postulieren eine Beteiligung des mTOR-Komplexes 2 (*mTOR complex 2, mTORC2*) (Hresko and Mueckler, 2005; Sarbassov et al., 2005); dieser Komplex setzt sich aus mTOR, einem Substrat der PKB/Akt, Rictor und mLST8 zusammen.

Neben der Aktivierung ist für eine ausgewogene Regulation die Inhibition von PKB/Akt wichtig. Diese negative Regulation wird in der Hauptsache durch den Tumorsuppressor PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten*) ausgeführt. PTEN reduziert den zellulären Gehalt an PI(3, 4,5)P₃ durch Dephosphorylierung; dadurch wird die Rekrutierung der PKB/Akt zur Zellmembran verhindert. Kommt es zu inaktivierenden Mutationen von PTEN oder zum Verlust des Proteins, geht damit eine dauerhafte Aktivierung des PI3K-PKB/Akt-Signalweges einher, was zur vermehrten Zellproliferation und Resistenz gegenüber Apoptose führt. In Studien an Krebszelllinien sowie an primären humanen Tumoren konnte häufig eine defekte Expression und/oder Funktion von PTEN gefunden werden.

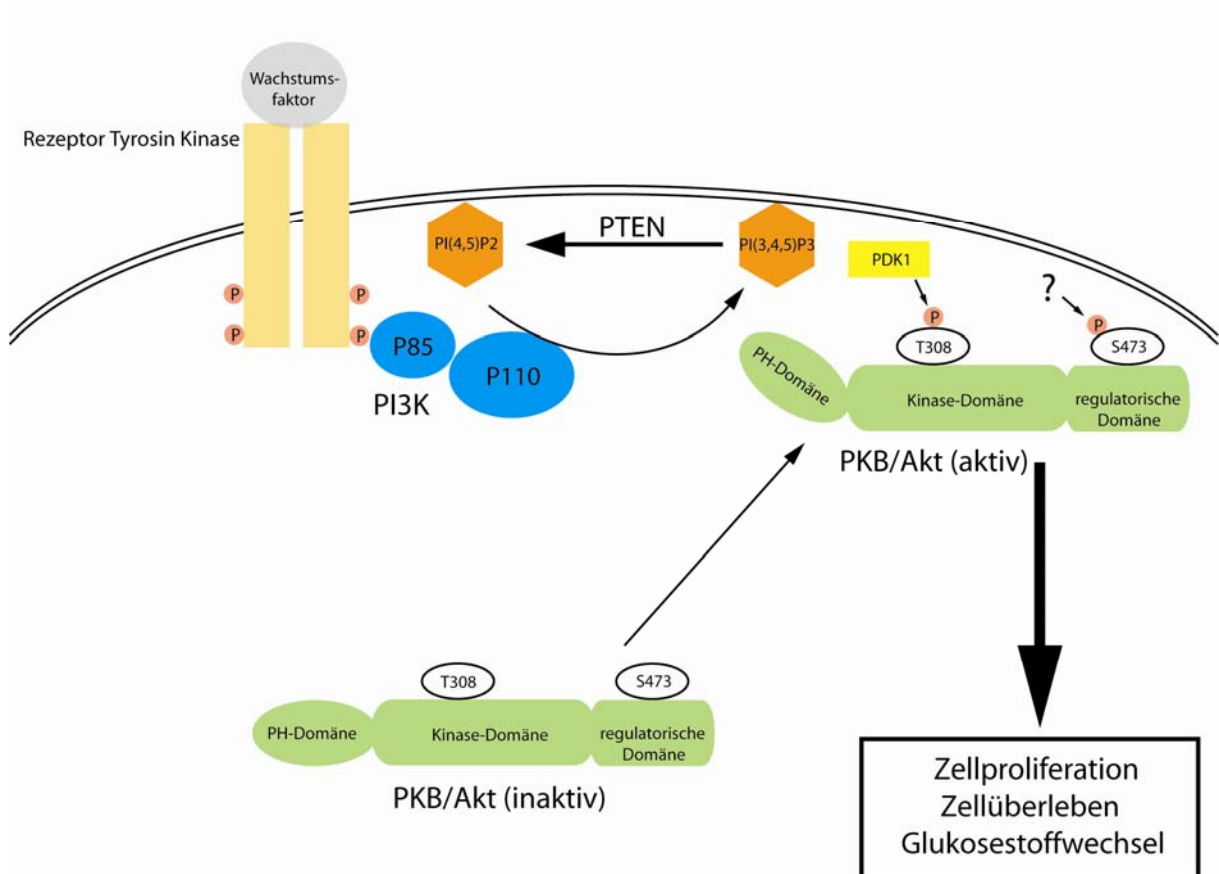


Abb. 1.3.: Regulation der PKB/Akt

Durch Bindung von Wachstumsfaktoren an RTK kommt es zur Aktivierung der PI3K. Diese setzt durch Phosphorylierung PI(4,5)P2 zu PI(3,4,5)P3, welches die PH-domäne von PKB/Akt bindet, um. Dadurch wird inaktive PKB/Akt zur Zellmembran rekrutiert, damit einher geht eine Konformationsänderung der PH-Domäne. Durch Phosphorylierung an Threonin 308 und Serin 473 wird die Kinase aktiviert. Die Kinase-Domäne von PKB/Akt wird durch PDK1 an Threonin 308 phosphoryliert. Die Identität des zweiten Aktivators wird derzeit diskutiert, so gibt es Hinweise z.B. auf eine Beteiligung von mTORC2, PDK1 oder ILK.

1.2.3. Substrate der PKB/Akt

PKB/Akt phosphoryliert eine Reihe von Substraten und ist somit ein zentraler Mediator für Zellproliferation und Zellüberleben. Des Weiteren besitzt PKB/Akt Schlüsselfunktionen in der Regulation des Glukosemetabolismus der Zelle und der Proteintranslation.

PKB/Akt phosphoryliert und inaktiviert die GSK-3β (*Glucose-Synthase-Kinase-3β*), wodurch es zu einer Aktivierung der Glykogensynthese kommt. Auch in der Glykolyse spielt PKB/Akt eine Rolle. So zeigten Studien, dass PKB/Akt *in vitro* PFK2 (*6-Phosphofructose 2-Kinase*), eine zentrale Kinase der Säuger-Glykolyse,

phosphoryliert und aktiviert (Deprez et al., 1997). Die PFK2 ist ein interkonvertierbares, bifunktionelles Enzym, das in seiner phosphorylierten Form als Phosphatase fungiert und die Fruktose-2,6-Bisphosphat in der Glykolyse hydrolysiert.

Neben der Regulation des Metabolismus der Zelle nimmt PKB/Akt auch durch transkriptionelle und translationale Regulation Einfluss auf Zellzyklus und Apoptose. PKB/Akt beeinflusst über die Steigerung der Phosphorylierung und Aktivierung von mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) die Proteinbiosynthese. Aktiviertes mTOR fördert die Translation von Cyclin D, aktiviert die p70-ribosomale-Protein-S6-Kinase (p70S6K) und hemmt auf der anderen Seite den eukaryotischen Initiationsfaktor 4E-BP1 (*4E-Binding Protein*). 4E-BP1 hemmt die Translation durch Bindung des Translationsinitiationsfaktors eIF4E (*eukaryotic Initiation Factor-4E*). Die Inhibierung von eIF4E verlangsamt die Zellproliferation (De et al., 1991) und resultiert in einem frühen G1-Arrest in der Hefe (Brenner et al., 1988).

Durch Phosphorylierung der inhibitorischen Zellzyklusregulatoren p27/Kip2 (*Protein27/ Kinase inhibitor protein 2*) und p21/Waf1/Cip1 (*Protein21/CDK-interacting protein1/Wildtype p53-activated fragment 1*) durch PKB/Akt verbleiben diese Proteine im Zytoplasma, wo sie ihre antiproliferativen Effekte nicht ausüben können.

Das Tumorsuppressorprotein p53 vermittelt z.B. nach DNA-Schaden Zellzyklusarrest und Apoptose. p53 wird u.a. durch die Ubiquitinligase Mdm2 (*Mouse-double-minute 2*) reguliert. Mdm2 bindet im Nukleus an p53, hemmt seine Funktion als Transkriptionsfaktor und bewirkt eine Destabilisierung und raschen proteasomalen Abbau von p53. Durch Phosphorylierung von Mdm2 fördert PKB/Akt die Translokation dieses Proteins in den Nukleus (Mayo and Donner, 2001), wo es inhibitorisch auf p53 wirken kann.

PKB/Akt nimmt neben der transkriptionellen Kontrolle der Apoptose auch direkt Einfluss auf die Regulation der Apoptose. So konnte eine Phosphorylierung und somit eine Inaktivierung des pro-apoptotischen BH3-only-Proteins BAD in Abhängigkeit von PKB/Akt beobachtet werden (Datta et al., 1997). Andere pro-apoptotische Gene wie FasL, IGFBP-1 (*Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1*) und Bim werden transkriptionell durch Mitglieder der Forkhead Familie reguliert; diese Transkriptionsfaktoren ihrerseits werden über Phosphorylierung durch PKB/Akt gehemmt. Die Phosphorylierung der Forkhead-Proteine durch PKB/Akt resultiert in

einer zytoplasmatischen Lokalisation dieser Proteine, wodurch sie ihre spezifischen Zielgene nicht mehr aktivieren können (Datta et al., 1999).

PKB/Akt greift auch in den NF-kappaB-Signalweg ein. Die I-kappaB-Kinase α wird durch PKB/Akt-abhängige Phosphorylierung aktiviert und phosphoryliert ihrerseits I-kappaB, welches danach degradiert wird (Ozes et al., 1999). Dies führt zu einer Translokation und Aktivierung von NF-kappaB (*Nuclear Factor-KappaB*) in den Kern und zu einer vermehrten Transkription anti-apoptotischer Gene wie Bcl-xL und Caspasen-Inhibitoren. Zusätzlich aktiviert PKB/Akt das zyklische AMP-response element-binding Protein, was wiederum zu einer verstärkten Transkription von anti-apoptotischen Genen wie Bcl-2, Mcl-1 und PKB/Akt führt.

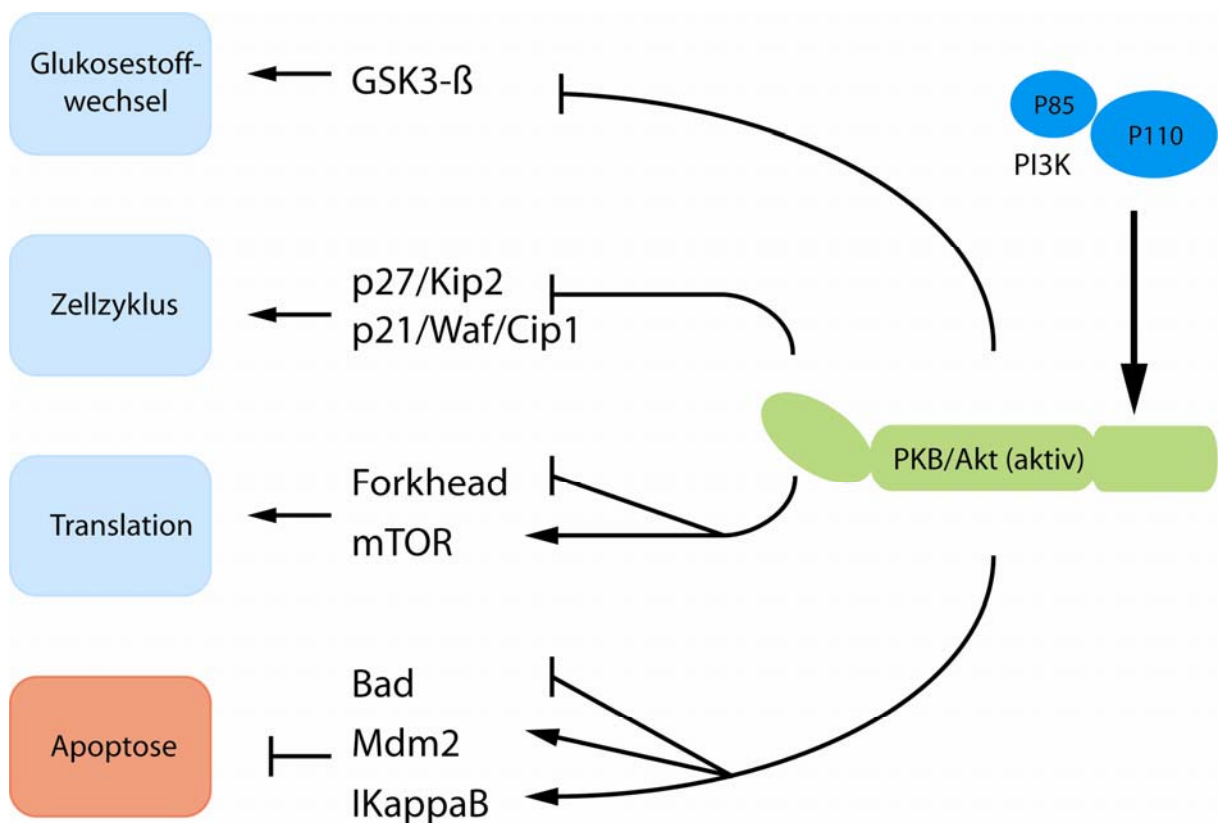


Abb. 1.4.: ausgewählte Substrate der PKB/Akt

PKB/Akt ist ein zentraler Mediator in der Proteinbiosynthese, der Regulation des Zellzyklus und nimmt ebenso Einfluss auf den Glukosestoffwechsel. Durch die Inhibition des proapoptotischen Faktors Bad, die Aktivierung von Mdm2 und der Aktivierung des NF-kappaB-Signalweges hemmt PKB/Akt die Exekution der Apoptose. Einer Deregulation von PKB/Akt favorisiert somit Resistenz gegenüber Apoptosestimuli.

1.2.4. Deregulation der PKB/Akt

Eine Deregulation der PKB/Akt wurde schon vielfach in verschiedenen Krebsarten beschrieben. Sie ist z.B. durch den Verlust des Tumorsuppressors PTEN, einer unvollständigen Aktivierung der PI3K, einer PKB/Akt-Gen-Amplifikation oder Überexpression hervorgerufen.

Für die Funktion von PKB/Akt als Onkogen ist sowohl eine ständige Aktivierung der Kinase, als auch eine permanente Rekrutierung an die Plasmamembran von Bedeutung (Aoki et al., 1998).

Die Rolle von PKB/Akt in der Onkogenese konnte bei Studien des murine Virus PKB/Akt8 von Bellacosa et al. beobachtet werden (Bellacosa et al., 1991). Das virale Homolog, v-Akt, verfügt an seinem Aminoterminus über eine Gag-Sequenz. Aus dieser Fusion resultiert eine Myristoylierungssequenz, die zu einer post-translationalen Modifikation führt, welche wiederum eine ständige Lokalisation des Proteins an die Plasmamembran und somit dessen dauerhafte Aktivierung zur Folge hat (Ahmed et al., 1993).

Des Weiteren wurde bei gastro-intestinalen Adenokarzinomen eine Genamplifikation im Locus 14q32 identifiziert, der für PKB α /Akt1 kodiert (Staal, 1987).

Eine Deregulation von PKB/Akt kann auch aus der permanenten Aktivierung der PI3K resultieren. So führt z.B. eine somatische Mutation in der regulatorischen PI3K-Untereinheit p85 über konstitutive Aktivierung zu Colon- und Ovarialkarzinomen (Klippel et al., 1998). Aktuellere Ergebnisse zeigen in einigen Krebsarten eine Amplifikation und Überexpression des Gens der PI3K-Isoform p110 (Hennessey et al., 2005). Zudem wurden genetische Mutationen der Isoform p110 α in einer großen Anzahl an Krebsarten beschrieben (Samuels et al., 2004); diese Ereignisse führen zu einer dauerhaften Aktivierung von PKB/Akt.

Eine besondere Rolle bei der Deregulation von PKB/Akt kommen Inaktivierungen des Tumorsuppressors PTEN zu. PTEN gehört zu den am häufigsten mutierten Genen bei Tumoren und ein LOH (*loss of heterozygosity*) am PTEN-Genlocus 10q23 wird häufig in primären Tumoren, als auch bei Metastasen beobachtet. Keimzellenmutationen im PTEN-Gen resultieren im Cowden-Syndrom, bei dem ein erhöhtes Risiko der Entstehung maligner Tumoren besteht (Liaw et al., 1997).

Da in vielen sporadischen Tumoren eine Deregulation und Hyperaktivität von PKB/Akt nachzuweisen ist, kann man davon ausgehen, dass PKB/Akt ein entscheidender Faktor in der Onkogenese sein kann.

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Während der Onkogenese entwickeln Tumorzellen Mechanismen um der körpereigenen Immunantwort zu entgehen (Lowe et al., 2004). Transformierte Zellen zeichnen sich oft durch Resistenzen gegenüber Radio- und Chemotherapien aus. Zur Umgehung dieser Resistenzen und um ein Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern, werden unter anderem immuntherapeutische Ansätze verfolgt (Blattman and Greenberg, 2004). Immuntherapeutische Ansätze, wie allogene Stammzelltransplantation oder Applikation von Spenderlymphozyten (*Donor Lymphocyte Infusion, DLI*) sind heute etablierte Therapieformen in der Behandlung hämatologischer Krebserkrankungen. Des Weiteren wird ihre Anwendung in der Behandlung von Patienten mit soliden Tumoren, die gegen Radio- und Chemotherapie resistent sind, untersucht. Ferner laufen derzeit Vakzinierungsstudien, die zum Ziel haben, eine antigen-spezifische autologe Immunreaktion des Patienten auszulösen und die Tumortoleranz der Immunzellen zu brechen. Trotz einiger Therapieerfolge kommt es bei der Behandlung von Patienten immer wieder zu Rezidiven. Das Versagen einer Immuntherapie kann theoretisch durch mehrere Faktoren bedingt sein: (a) Es kommt nur zu einer unzureichenden Aktivierung von Tumor-spezifischen Immunzellen. (b) In anderen Fällen schreitet die Krebserkrankung trotz eines weitestgehend intakten und aktivierten Immunsystems fort. Dieses Phänomen des "Immune escape" kann ebenfalls einer erfolgreichen Immuntherapie im Wege stehen. Durch die Sekretion immunsuppressiver Zytokine, der Herunterregulation von MHC Klasse I und II Molekülen durch Mutationen und Defekte in der Regulation HLA (*Human Leukocyte Antigen*) Klasse I abhängiger Antigenprozessierung (Bennink et al., 1993) sowie die Expression von Todesrezeptorliganden kann der Tumor der Erkennung durch das Immunsystem entgehen.

Allerdings kann die beobachtete Resistenz gegenüber immuntherapeutischen Ansätzen auch auf einer Deregulation der Signaltransduktion in den Krebszellen begründet liegen. So könnten Tumorzellen gegenüber aktivierten Immunzellen resistent sein, wenn die Apoptose-Signalkaskade der Tumorzelle gestört ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte der Einfluss von konstitutiv aktivem PKB/Akt auf die T-Zell-vermittelte Apoptose untersucht werden. PKB/Akt ist ein zentraler Regulator von Zellproliferation und Zellüberleben und somit ein zentrales Element verschiedener Signaltransduktionswege, die in der Onkogenese eine Rolle spielen.

Eine Deregulation und somit eine konstitutive Aktivierung von PKB/Akt ist in einer Vielzahl von Tumoren nachgewiesen worden. Substrate der PKB/Akt umfassen Regulatoren der Proteinbiosynthese, des Zellzyklus und der Apoptose; daher stellt PKB/Akt ein interessantes Zielprotein für therapeutische Interventionen bei Krebsbehandlungen dar.

Um die Wirkung der Deregulation der PKB/Akt in der ZTL-vermittelten Apoptose zu untersuchen, sollte eine konstitutiv aktive Form der Kinase verwendet werden. Um Selektionsphänomene zu vermeiden und Analysen zu verschiedenen Aktivierungsstadien der Kinase zu erlauben, würde hierbei mit einer pharmakologisch regulierbaren Mutante von PKB/Akt gearbeitet. Diese konstitutiv aktive Form der PKB/Akt ist an eine mutierte Ligandenbindungsstelle des murinen Östrogenrezeptors fusioniert. Dadurch liegt das Fusionsprotein in einem inaktiven Zustand innerhalb der Zelle vor und wird erst nach Zugabe des Liganden 4-Hydroxy-Tamoxifen binnen weniger Minuten aktiviert.

Die mit diesem Konstrukt stabil transduzierte Tumorzelllinie sollte in Kokulturstudien mit murinen Tumor-spezifischen T-Zellen eingesetzt werden, um den Einfluss der aktiven PKB/Akt auf die T-Zell-vermittelte Apoptose zu untersuchen. Hierbei fänden T-Zell-Populationen verschiedener Spezifität Anwendung. In einem weiteren Schritt sollte ein Transplantationsmodell etabliert werden, das entsprechende Studien des Einflusses der PKB/Akt *in vivo* erlaubt.

Sollte ein Einfluss der PKB/Akt auf die T-Zell-vermittelte Apoptose beobachtet werden, ergibt sich hieraus das Ziel, diese Resistenz pharmakologisch zu überkommen. Hierbei ermöglicht die Anwendung des induzierbaren Systems Studien über das kritische Zeitfenster einer Therapie, da durch Entzug von Tamoxifen die PKB/Akt schnell inaktiviert werden kann und so die Simulation einer gegen aktive PKB/Akt pharmakologischen Therapie möglich ist.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte und Zubehör

3-dimensionaler Taumel-Roll-Mischer „CAT RM5“	Neolab, Heidelberg
Auflichtmikroskop „Wilovert ^R “	Hund, Wetzlar
Autoklav „Varioklav“	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Bestrahlungsgerät Nr. 112 CS 137	Molgaard Medical, Dänemark
Bestrahlungsgerät Typ CDCK 4905 CS 137	Buchler, Braunschweig
Bleiburg	Neolab, Heidelberg,
Brutschrank „Typ 6200“	Heraeus, Langenselbold
Chemielumineszenzdetektor	Intas, Göttingen
Dispergiergerät „Ultra Turrax T25“	IKA Labortechnik, Staufen
Durchflusszytometer „Cytomics FC500“	Beckman Coulter, Krefeld
Durchflusszytometer „Epics XL-MCL“	Beckman Coulter, Krefeld
Ear Punch 2mm	FMI, Seeheim
Elektrophorese-System horizontal „B2“ & „B1A“	Peqlab, Erlangen
Elektrophorese-System vertikal „Mini-Protean 2“	BioRad, München
Elisa Reader „Dynex MRX“	Dynex Technologies
Feinwaage „AC120S“	Sartorius Göttingen
Film-Prozessor „KODAK X-Omat 5000 RA Processor“	Kodak, Stuttgart
Geiger-Müller-Zählrohr, Typ LB1210B	Berthold, Bad Wildbach
Geldokumentationssystem „Gene Genius“	Syngene, Langenfeld
Injektionskäfig „Typ Broome HAR-52-04xx“	FMI, Seeheim
Inkubationseinheit „Certomat“	H B. Braun, Melsungen
Käfigwechselstation	Tecniplast, Hohenpeißenberg
Kühlzentrifuge „5417R“ (Rotor Z031)	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge Sorvall „RC-5B“ (Rotor SS34 / GSA)	DuPont Instruments, USA
LightCycler	Roche Mannheim
Magnetrührer „RCT 3019“	IKA Labortechnik, Staufen
Mikroskop Modell CHT	Olympus, Japan
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Neubauerzählkammer (Tiefe 01 mm, 0,0025 mm ²)	Neolab, Heidelberg
Nitrocellulosemembran „HybondTM-ECL Nitrocellulose“	Amersham Pharmacia, Freiburg
Petrischalen-Drehtisch	Neolab, Heidelberg
pH-Meter „HI9321“	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Photometer „GeneQuant Pro“	Amersham Pharmacia, Freiburg
Pipetten	Gilson, USA
Pipettierhilfe	Hirschmann, Eberstadt
Powerpack 300	BioRad, München
Powerpack 3000	BioRad, München
Reagenzglasschüttler „MS2 Minishaker“	IKA Labortechnik, Staufen
Röntgenfilm „CL-XPosure“	Pierce, USA
Röntgenfilmcassette „Hypercassette TM “	Amersham Pharmacia Biotech, UK
Schüttelwasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Schwenktisch 3019	Gfl, Burgwedel
Sicherheitswerkbank „CleanAir Typ DLF/BSS4“	Woerden, Niederlande
Sicherheitswerkbank Herasafe KS18	Heraeus, Langenselbold
Szintillationszähler „Cobra II“	Packard Bioscience, Dreieich
Thermoblock „ThermoStat plus“	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer „Thermomixer 5437“	Eppendorf, Hamburg

Thermocycler „i-cycler“	BioRad, München
Tischzentrifuge „Biofuge“	Heraeus, Langenselbold
Tischzentrifuge „Omnifuge 2.0 ORS“	Heraeus, Langenselbold
Tischzentrifuge „Omnifuge 2.0 RS“	Heraeus, Langenselbold
Transferkammer „Mini Trans-Blot Cell“	BioRad, München
UV-C-Quelle UV-Crosslinker „Stratagene 1800“	Stratagene, Heidelberg
UV-Transilluminator „TL312A“	Spectroline, USA
Waage „LC420“	Sartorius, Göttingen
Waage „U4100“	Sartorius, Göttingen
Wasserbad Typ „1012“	Gfl, Burgwedel
Zellseparationsmagnet „Vario MACS“	Miltenyi Biotec, USA

2.1.2. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in Analysequalität bezogen und stammten, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen).

2.1.3. Lösungen und Puffer

Die aufgelisteten Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit Aqua dest. angesetzt. Bei Bedarf wurden die Lösungen bzw. Puffer steril filtriert oder autoklaviert.

1,5 M Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	181,55 g Tris 800 ml H ₂ O pH 8,8 (HCl)
10% Ammoniumpersulfat	10% (w/v) Ammoniumpersulfat in H ₂ O (Lagerung bei -20 °C)
10% SDS (<i>Natriumdodecylsulfat</i>)	100 g SDS 900 ml H ₂ O Auf 68 °C erwärmen, pH 7,2 (HCl)
1 M Tris	121,1 g Tris 800 ml H ₂ O pH 6,8 (HCl)
5X SDS-PAGE (<i>Polyacryamidgelelektrophorese</i>) Laufpuffer	125 mM Tris 1 M Glyzin 17 mM SDS H ₂ O ad 1000 ml pH 8,3
1X SDS-PAGE Laufpuffer	200 ml 5X SDS-PAGE Laufpuffer 800 ml H ₂ O
5X SDS-PAGE Transferpuffer	239 mM Tris 193 mM Glyzin 6,4 mM SDS (pH 9, Lagerung 4 °C)

1X SDS-PAGE Transferpuffer	200 ml 5X SDS-PAGE Transferpuffer 200 ml Methanol 600 ml H ₂ O
25X Proteasen-Inhibitor-Lösung	1 Tablette Complete™ Proteasen-inhibitoren-Cocktail (Roche, Mannheim) 2 ml H ₂ O (Lagerung bei -20 °C)
2 M CaCl ₂	2 M CaCl ₂ in H ₂ O (filtrieren 0,22µM Filter Lagerung bei -20 °C)
2X HBS	280 mM NaCl 10 mM KCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 12 mM Dextrose 50 mM Hepes pH 7,0 ad H ₂ O (Lagerung bei -20 °C)
50X Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure (TAE) Stammlösung	2 M Tris 5,7% (v/v) Essigsäure (100%) 0,05 M EDTA ad H ₂ O
6X DNA-Gelladepuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% /w/v) Xylencyanol 40% (v/v) 30% Glycerin ad H ₂ O
6X SDS Ladepuffer	60 mM Tris-HCl 24% (w/v) SDS 0,2% (w/v) Bromphenolblau 20% (v/v) Glycerol 200 mM β-MSH (<i>β-Mercaptoethanol</i>) ad H ₂ O (Lagerung bei -80 °C)
ABT-737	50 mM ABT-737 (Abbott) in DMSO (Lagerung bei -20 °C)
Antibiotika-Stammlösungen: Ampicillin: Kanamycin:	50 mg/ml Ampicillin 25 mg/ml Kanamycin ad H ₂ O (steril filtriert, Lagerung bei -20 °C)
β ₂ -Microglobulin	10 µg β ₂ -Microglobulin in PBS (Lagerung bei -20 °C)
Blocking-Reagenz	5% (w/v) fettfreie Trockenmilch 0,1% (v/v) Tween20 PBS (<i>Phosphat-buffered saline</i>) ad 1000 ml
Coomassie®-Brilliant-Blau-Färbelösung	0,1% (w/v) Coomassie® Brilliant Blau R250 50% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure

Cycloheximid-Stammlösung	100 mg/ml Cycloheximid in Ethanol absolut (Lagerung bei -20°C)
Dehybridisierungslösung	62,5 mM 1 M Tris-HCl (pH 6,8) 2% (w/v) SDS
DNA-Größenstandard	25 µl 6X DNA-Gelladepuffer 10 µl Basenpaarleiter „1 Kb Plus DNA Ladder“ (Invitrogen) 65 µl H ₂ O (Lagerung bei -20 °C)
FACS-Puffer	PBS 5% BSA (<i>Bovine serum albumin</i>) 0,1% NaN ₃
Fibronectin-Stammlösung	0,1 mg Fibronectin in PBS (Lagerung bei 4 °C)
Ethidiumbromid Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in destilliertem H ₂ O (Lagerung bei 4 °C)
Hydroxy-Tamoxifen-Stammlösung	1 mM 4-Hydroxy-Tamoxifen in DMSO (Lagerung bei -20 °C)
Interleukin-2 (Medicopharm)	18*10 ⁶ IU in 3 ml PBS 3 ml Incomplete Freunds Adjuvant (Difco)
MACS-Puffer	0,5% (w/v) BSA 2 mM EDTA in PBS pH 7,2 (Lagerung bei 4 °C)
NP-40-Lysepuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1% (v/v) NP-40 40 µl/ml Proteasen- Inhibitoren-Cocktail (25x) 1% (v/v) Phosphatase-Inhibitor-Cocktail I (Sigma) 1% (v/v) Phosphatase-Inhibitor-Cocktail II (Sigma) ad H ₂ O (Lagerung bei 4 °C)
Peptid-Stammlösung: Hu p53 (264-272) FluM1 (58-66)	10 mg Peptid in PBS 10 mg Peptid in PBS (Lagerung bei -20 °C)
PonceauS-Färbelösung	3% Trichloressigsäure 2% (w/v) PonceauS ad H ₂ O
Propidiumjodid-DNA-Färbelösung	0,07 mM Propidiumjodid 3,9 mM Natriumcitrat 0,1% (v/v) TritonX-100 ad H ₂ O (Lagerung bei 4 °C)

Rapamycin (Rapamune [®] , Sirolimus)	Fertiglösung bezogen von Wyeth
Staurosporin-Stammlösung	250 µM Staurosporin in DMSO (Lagerung bei -20 °C)
Tamoxifen-Stammlösung (für <i>in vivo</i> Applikation)	10 mg Tamoxifen in 1 ml Erdnußöl (Lagerung bei -20 °C)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA ad H ₂ O
TMRE-Stammlösung (<i>Tetramethylrhodaminethylsterperchlorat</i>)	50 mM TMRE in DMSO (Lagerung bei -20 °C)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA ad H ₂ O
Z-VAD-FMK (<i>N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Aspfluoromethylketon</i>)	Z-VAD-FMK (ICN) 10 mM in DMSO

Tabelle 2.1.1: verwendete Lösungen und Puffer

2.1.4. Längenstandards

Basenpaarleiter „1 Kb Plus DNA Ladder“	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinleiter „BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder“	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinleiter „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.5. Nährmedien

Alle Nährmedien wurden mit Aqua dest. angesetzt und anschließend autoklaviert.

LB Agar Medium (8 Kapseln /l H ₂ O)	Q-Bio-gene, Heidelberg
Circlegrow Medium (40 Kapseln /l H ₂ O)	Q-Bio-gene, Heidelberg

2.1.6. Bakterienstämme

MAX Efficiency [®] Stbl2™ Cells	Invitrogen, Karlsruhe
MAX Efficiency [®] DH5α™ Competent Cells	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.7. Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim

Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Roche, Mannheim

2.1.8. Fertigsysteme

Akt Kinase Assay	Cell Signaling Technology, USA
Light cycler FastStart DNA Master SYBR GreenI	Roche, Mannheim
Omniscript Reverse Transcriptase	Qiagen, Hilden
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche, Mannheim
pcDNA3.1/V5-His [®] TOPO [®] TA Expressions-Kit	Invitrogen, Karlsruhe
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Maxi Cartridges	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce, USA
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, USA
Vybrant [®] CFDA SE Cell Tracer Kit	Molecular Probes, USA

2.1.9. Primer

In der nachfolgenden Tabelle sind alle Oligonukleotide aufgelistet, die für die RT-PCR (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*) eingesetzt wurden. Die Primer wurden von der Firma MWG (Ebersberg) synthetisiert.

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	Produktgröße	Bemerkung
muActin#1_S	ttc gtt gcc ggt cca ca	60 bp	real time PCR murines β -actin
muActin#2_AS	acc agc gca gcg ata tcg	60 bp	real time PCR murines β -actin
muBCLXL#1_S	tcg gga tgg agt aaa ctg gg	80 bp	real time PCR murines BCL-x _L
muBCLXL#2_AS	cct tgt cta cgc ttt cca cg	80 bp	real time PCR murines BCL-x _L

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	Produktgröße	Bemerkung
muBCL2#1_S	cag ggt atg ata acc ggg ag	64 bp	real time PCR murines BCL-2
muBCL2#2_AS	tag ccc ctc ttgt gac agc tt	64 bp	real time PCR murines BCL-2
muMcl1#1_S	tgt caa aac aaa aga ggc tgg gat gg	73 bp	real time PCR murines MCL-1
muMcl1#2_AS	att tct gat gcc gcc ttct agg tc	73 bp	real time PCR murines MCL-1

Tabelle 2.1.2.: verwendete Oligonukleotide für RT-PCR

2.1.10. Plasmide

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt.

Vektorbezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pMx-pie	Expressionsvektor, GFP-Reporter gen	A. Mui
pQCXIP	Expressionsvektor, Puromycin-Resistenzgen	Clontech
pQC_mtAkt-HA-ER ^{tam} _IP	exprimiert eine konstitutiv aktive Mutante der Proteinkinase B/Akt, die als Fusionsprotein pharmakologisch durch Zugabe von Tamoxifen reguliert werden kann; Puromycin-Resistenzgen	AG Schuler, Mainz
pM_mtAkt-HA-ER ^{tam} _IE	exprimiert eine konstitutiv aktive Mutante der Proteinkinase B/Akt, die als Fusionsprotein pharmakologisch durch Zugabe von Tamoxifen reguliert werden kann; GFP-Reporter gen	AG Schuler, Mainz
pM_bcl-x _L _pie	exprimiert BCL-x _L ; GFP-Reporter gen	AG Schuler, Mainz
pM_DN-FADD_IH2B-EGFP	exprimiert eine dominant negative Mutante von FADD; GFP-Reporter gen	AG Schuler, Mainz
pLKO.1-puro_TRCN0000004691	shRNA murines MCL-1, lentiviraler Vektor; Puromycin-Resistenzgen	MISSION TRC-Mm 1.0 library, Sigma, Deisenhofen
pLKO.1-puro_TRCN0000004692	shRNA murines MCL-1, lentiviraler Vektor; Puromycin-Resistenzgen	MISSION TRC-Mm 1.0 library, Sigma, Deisenhofen
pLKO.1-puro_TRCN0000004693	shRNA murines MCL-1, lentiviraler Vektor; Puromycin-Resistenzgen	MISSION TRC-Mm 1.0 library, Sigma, Deisenhofen

Vektorbezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pLKO.1-puro_TRCN0000004694	shRNA murines MCL-1, lentiviraler Vektor; Puromycin-Resistenzgen	MISSION TRC-Mm 1.0 library, Sigma, Deisenhofen
pLKO.1-puro_TRCN0000004695	shRNA murines MCL-1, lentiviraler Vektor; Puromycin-Resistenzgen	MISSION TRC-Mm 1.0 library, Sigma, Deisenhofen
pCMV.VSV-G	Helferplasmid für retrovirale Tansduktion, kodiert VSV-G-Protein	W. Nishioka
Hit60 (MLV gag-pol)	Helferplasmid für retrovirale Tansduktion, kodiert für MMLV gag und pol	C. Benedict
pMDL	Helferplasmid für lentivirale Tansduktion, kodiert für HIV-Rev	I. Verma/D. Tronno
pRSV.Rev	Helferplasmid für lentivirale Tansduktion, kodiert für HIV-gag polRRE	I. Verma/D. Tronno

Tabelle 2.1.3.: verwendete Plasmide

2.1.11. Zellkulturmedien, Zusätze und verwendete Materialien

DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>) (ohne L-Glutamin)	Gibco, Eggenstein
FKS (<i>Fötales Kälberserum</i>)	Gibco, Eggenstein
Einfriermedium: 90% (v/v) FKS 10% (v/v) DMSO	
Gentamicin (50 mg/ml)	Cambrex, USA
Hygromycin (50 mg/ml)	Calbiochem, USA
L-Glutamin 200 mM	Gibco, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml / 10000 µg/ml)	Gibco, Eggenstein
D-PBS (ohne Calcium und Magnesium)	Gibco, Eggenstein
Puromycin (Stammlösung: 5 mg/ml in H ₂ O)	Calbiochem, USA
RPMI (<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>) 1640 (ohne L-Glutamin)	Gibco, Eggenstein
TCGF (<i>T-cell Growth Factor</i>)	AG Theobald, Mainz
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% / 0,02%)	Cambrex, USA
β-MSH	Sigma, Deisenhofen

Sterile Zellkulturschalen, Zellkulturflaschen, 6-Loch-Platten, 24-Loch-Platten, Zentrifugenröhrchen, serologische Einmalpipetten sowie Tiefkühlröhrchen wurden von den Firmen Corning (USA), BD Falcon (Heidelberg), Nunc (Dänemark) und Greiner (Frickenhausen).

2.1.12. Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Eigenschaften	Nährmedium	Bezugsquelle
CyA2Kb-MR-H	<i>Mus musculus</i>	exprimiert ein chimäres MHC-I-Molekül (Vgl. 2.1.4.2.), gewonnen aus Mäusen mit C57Bl/6-Hintergrund immortalisiert mit Myc und Ras	DMEM (15% FKS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,0007% β -MSH)	AG Schuler, Mainz
Jurkat A2	<i>Homo sapiens</i>	Akute lymphatische Leukämiezelllinie, transgen für HLA-A2	RPMI1640 (10% FKS, 1% L-Glutamin, 0,1% Gentamicin, 0,01% β -MSH)	AG Theobald, Mainz
293T	<i>Homo sapiens</i>	renale Fibroblasten, embryonal, SV40 T-Antigen, Ad5-Genom	DMEM (10% FKS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin)	ATCC, USA
Phoenix	<i>Homo sapiens</i>	Transiente Verpackungszelllinie auf der Basis von 293T, enthält stabil integriertes Plasmid, das für gag, pol, env (MMLV) codiert.	DMEM (10% FKS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin)	Dr. G. Nolan, USA
CyA2Kb- Akt-ER ^{tam}	<i>Mus musculus</i>	stabil transduziert mit dem Expressionsvektor pQC_mAkt-HA- ER ^{tam} _IP	DMEM (15% FKS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,0007% β -MSH), 0,5 μ g/ml Puromycin	AG Schuler, Mainz

Zelllinie	Herkunft	Eigenschaften	Nährmedium	Bezugsquelle
CyA2Kb- Akt-ER ^{tam} (GFP)	<i>Mus musculus</i>	stabil transduziert mit dem Expressionsvektor pM_mtAkt-HA- ER ^{tam} _IE	DMEM (15% FKS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,0007% β -MSH), 0,5 μ g/ml Puromycin	AG Schuler, Mainz
CyA2Kb- Akt-ER ^{tam} (GFP) sh-MCL-1	<i>Mus musculus</i>	stabil transduziert mit dem Expressionsvektor pM_mtAkt-HA- ER ^{tam} _IE, sowie dem Vektor pLKO.1-puro_TRCN0000004691	DMEM (15% FKS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,0007% β -MSH)	AG Schuler, Mainz
CyA2Kb- Akt-ER ^{tam} (GFP) sh-neg Kontrolle	<i>Mus musculus</i>	stabil transduziert mit dem Expressionsvektor pM_mtAkt-HA- ER ^{tam} _IE, sowie dem Vektor pLKO.1-puro_TRCN0000004693	DMEM (15% FKS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,0007% β -MSH)	AG Schuler, Mainz
CyA2Kb- Akt-ER ^{tam} -BCL-x _L	<i>Mus musculus</i>	stabil transduziert mit dem Expressionsvektor pQC_mAkt-HA- ER ^{tam} _IP, sowie dem Vektor pM_bcl-x _L _pie	DMEM (15% FKS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,0007% β -MSH), 0,5 μ g/ml Puromycin	AG Schuler, Mainz
CyA2Kb- Akt-ER ^{tam} - dnFADD	<i>Mus musculus</i>	stabil transduziert mit dem Expressionsvektor pQC_mAkt-HA- ER ^{tam} _I, sowie dem Vektor pM_DN-FADD_IH2B-EGFP	DMEM (15% FKS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,0007% β -MSH), 0,5 μ g/ml Puromycin	AG Schuler, Mainz

Zelllinie	Herkunft	Eigenschaften	Nährmedium	Bezugsquelle
CyA2Kb- Akt-ER ^{tam} -Mock	<i>Mus musculus</i>	stabil transduziert mit dem Expressionsvektor pQC_mAkt-HA- ER ^{tam} _IP, sowie dem Leervektor pMx-pie	DMEM (15% FKS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,0007% β -MSH), 0,5 μ g/ml Puromycin	AG Schuler, Mainz
CD8 Allo A2	<i>Mus musculus</i>	Allo-A2Kb-reaktive ZTL,	RPMI1640 (10% FKS, 1% L-Glutamin, 0,1% Gentamicin, 0,01% β -MSH)	AG Theobald, Mainz
A2 p53 (264-272) cl46	<i>Mus musculus</i>	ZTL spezifisch gegen humanes p53-Peptid 264-272	RPMI1640 (10% FKS, 1% L-Glutamin, 0,1% Gentamicin, 0,01% β -MSH)	AG Theobald, Mainz
CD8 X A2Kb Flu M1	<i>Mus musculus</i>	CTL spezifisch gegen Influenzapeptid 58-66,	RPMI1640 (10% FKS, 1% L-Glutamin, 0,1% Gentamicin, 0,01% β -MSH)	AG Theobald, Mainz
T2	<i>Homo sapiens</i>	Lymphoplasten, HLA-A2 positiv, negativ für MHC Klasse II	RPMI1640 (10% FKS, 1% L-Glutamin, 0,1% Gentamicin, 0,01% β -MSH)	ATCC, USA

Tabelle 2.1.4.: verwendete Zelllinien

2.1.12. Antikörper

Die nachfolgende Tabelle weist die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper aus.

Primärantikörper		Herkunftsorganismus	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Aktin	monoklonal	Maus	1:1000	ICN, USA
Anti-Akt1/2	polyklonal	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Akt (Ser473)	polyklonal	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
Anti-Akt (Thr308)	polyklonal	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
Anti-BCL-2	monoklonal	Maus	1:500	Santa Cruz, Heidelberg

Primärantikörper		Herkunftsorganismus	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-BCL-x _L	monoklonal	Maus	1:850	BD Pharmingen, USA
Anti-BCL-x _L	monoklonal	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
Anti-CD8 (Ly-2)	monoklonal	Ratte	1:1000	BD Pharmingen, USA
Anti-GSK-3 β	polyklonal	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
Anti-Phospho-GSK-3 β (Ser9)	polyklonal	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
Anti-HA	monoklonal	Ratte	1:2000	Roche, Mannheim
Anti-HLA-A2	monoklonal	Maus	1:5000	BD Pharmingen, USA
Anti-MCL-1 (S-19)	polyklonal	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-MCL-1	monoklonal	Kaninchen	1:1000	Epitomics, USA
Anti-p70S6 Kinase	polyklonal	Kaninchen	1:1000	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-Phospho-p70S6 Kinase (T389)	polyklonal	Kaninchen	1:1000	R&D Systems, Wiesbaden
Sekundärantikörper		Herkunftsorganismus	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-Maus, HRP-konjugiert	monoklonal	Ziege	1:2000	Pierce, USA
anti-Kaninchen, HRP-konjugiert	monoklonal	Ziege	1:2000	Pierce, USA
anti-Kaninchen, HRP-konjugiert	monoklonal	Ziege	1:2000	Pierce, USA

Tabelle 2.1.5.: verwendete Antikörper

2.1.14. Mausstämme

2.1.14.1. C57Bl/6

Der C57Bl/6-Stamm ist ein immunkompetenter Inzuchtstamm, der aus einer 1921 von Little etablierten Zucht hervorgegangen ist und heute weite Verbreitung gefunden hat.

Die Tiere wurden von der Eigenzucht der ZVTE (Zentrale Versuchstiereinrichtung) der Universität Mainz bezogen.

2.1.14.2. CyA2K^b

Die Tiere des Stammes CyA2K^b exprimieren ein chimäres MHC-I-Molekül, welches aus der $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Domäne des humanen HLA-A2.1 Moleküls sowie der $\alpha 3$, der Transmembran- und der intrazellulären Domäne des murinen H-2K^b Moleküls besteht. Es handelt sich um einen transgenen Stamm auf dem genetischen Hintergrund C57Bl/6 (Vitiello et al., 1991).

Die Tiere wurden von der Eigenzucht der ZVTE der Universität Mainz bezogen.

2.1.14.3. NOD/LtSz-scid/scid

Bei dem Mausstamm NOD/LtSz-scid/scid (NOD/SCID) handelt es sich um immundefiziente Tiere, die eine autosomal rezessive Mutation im SCID (Severe Combined Immundeficiency)-Gen besitzen (Bosma et al., 1988). Diese Mutation verhindert ein erfolgreiches Rearrangement und somit die notwendige Neuordnung von Immunglobulin- und T-Zellrezeptorgenen. Daraus resultiert letztlich ein Mangel an Immunfunktionen, die durch T- und B-Zellen vermittelt werden. Des Weiteren weisen die Tiere eine verminderte NK-Zellfunktion sowie das Fehlen von zirkulierendem Komplement auf (Baxter and Cooke, 1993; Kataoka et al., 1983; Shultz et al., 1995). Diese Eigenschaften leiten sich vom Elternstamm NOD/Lt (Non Obese Diabetic) ab. Allerdings sind NOD/SCID-Mäuse nicht von Diabetes betroffen, da ihnen die zur Vermittlung der Erkrankung notwendigen T-Zellen fehlen.

Die Tiere wurden von der Eigenzucht der ZVTE der Universität Mainz bezogen.

2.1.14.4. KO-Pfr1

Der Mausstamm C57Bl/6-Pfr1 tm1Sdz/J ist ein Knock-out Stamm, bei dem das Gen Perforin inaktiviert wurde. Perforin -/- verhält sich gegenüber Perforin +/+ rezessiv, so dass nur homozygote Tiere untereinander verpaart wurden. Der Stammhintergrund ist C57Bl/6 (Kagi et al., 1994).

Der Stamm wurde vom Jackson Laboratory (USA) bezogen.

Alle Tierversuche wurden im Rahmen genehmigter Tierversuchsvorhaben durchgeführt.

2.1.15. Verwendete Software

Zur Datenverarbeitung dienten Programme des Softwarepakets „Microsoft Office“, graphische Auswertungen erfolgten ebenfalls mit Programmen aus „Microsoft Office“ sowie mit Grafik-Programmen der „Adobe® Creative Suite® 2.3 Premium“. DNA-Sequenzanalysen wurden mit Hilfe des Programms „Chromas“ sowie dem Programmpaket „DNA-Star“ (Lasergene) durchgeführt.

Bei gerätegestützter Datenerfassung erfolgte die Aquisition sowie die Auswertung der Daten mit Hilfe der vom Hersteller mit gelieferten Software-Programme.

2.1.16. Verwendete Datenbanken

Die in der folgenden Tabelle aufgelisteten Datenbanken und Anwendungswerkzeuge dienten zur Sequenzanalyse auf Protein und DNA-Ebene, Generierung und Analyse von Oligonukleotiden und Etablierung von PCR-Programmen.

National Center of Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
ExPASy Proteomics	http://www.expasy.org
OligoAnalyzer 3.0	http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx
European Molecular Biology Laboratory	http://www.embl-heidelberg.de
Primer Bank	http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/

2.1.17. Auftragsarbeiten

Sequenzierungen wurden bei der Firma „Medigenomix“ (Martinsried) in Auftrag gegeben.

2.2. Methoden

2.2.1. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren, das es erlaubt DNA (*Deoxyribonucleic-Acid*)-Fragmente anhand ihrer Größe aufzutrennen. Das grundlegende Prinzip ist die elektrophoretische Beweglichkeit der negativ geladenen DNA im elektrischen Feld. Hierbei trennen sich die unterschiedlich großen DNA-Fragmente der Größe nach auf, wobei die Wanderstrecke in linearer Abhängigkeit zum Logarithmus der Fragmentlänge in Basenpaaren (bp) steht.

Die entsprechende Menge an Agarose wurde in TAE-Puffer durch Erwärmen in der Mikrowelle zur Lösung gebracht und nach Abkühlen mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Bei einer Temperatur von 60 °C wurde das Gel in einen horizontalen Gelträger gegossen und nach Polymerisation in eine Elektrophoresekammer mit 1XTAE-Puffer überführt.

Vor dem Auftragen wurden 10 µl Probe mit 3 µl DNA-Ladepuffer versetzt und danach in die Geltaschen eingeführt. Das im Ladepuffer enthaltene Glycerin beschwert die Proben und sorgt für ein Absinken in die Geltaschen. Durch Anlegen einer Spannung von ca. 90 V und einer Laufzeit von 40 min wurden die DNA-Fragmente aufgetrennt. Durch das im Gel enthaltene Ethidiumbromid, das in die DNA-Doppelhelix interkaliert und im UV-Licht (310 nm) fluoresziert, konnte die DNA sichtbar gemacht und mit Hilfe eines digitalen Systems dokumentiert werden.

Um die Größe der Fragmente exakt bestimmen zu können, wurde ein DNA-Größenstandard mitgeführt.

2.2.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen / Gelextraktion

Um DNA-Moleküle nach deren Separation durch Agarosegelelektrophorese zur weiteren Verwendung aus dem Gel zu isolieren, mussten die spezifischen DNA-Fragmente aus dem Gel isoliert werden. Hierfür wurden die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und die gewünschte Bande mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Das so isolierte Produkt wurde mittels des „Quiaquick Gel Extraction Kits“ gemäß Herstellerprotokoll aus dem Gel extrahiert und stand so für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

2.2.3. Klonierung von PCR-Produkten in einen TA-Cloning vector

Das „pcDNA3.1/V5-His[®] TOPO[®]TA Expressions-Kit“ der Firma Invitrogen ermöglicht die einfache Klonierung von Amplifikationsprodukten in einen Expressionsvektor. Das Prinzip dieser Methode beruht auf den Anhängen einzelner Adenosin-Nukleotide im Anschluss an die Extensionsphase der PCR-Reaktion. Diese Überhänge werden unabhängig von der DNA-Matrize gebildet. Das Fertigsystem enthält einen linearisierten und dephosphorylierten Vektor, dessen 5'-Enden über Thymidin-Nukleotidüberhänge verfügen. Die Ligation in den Vektor erfolgt über die Komplementarität der Überhänge.

Die Durchführung wurde dem Herstellerprotokoll entnommen.

2.2.4. Enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA

Eine sequenzspezifische Analyse der DNA wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen vom Typ II durchgeführt. Der Restriktionsansatz enthielt neben der zu spaltenden DNA spezifische Enzyme und den möglichst optimalen Reaktionspuffer.

Reaktionsansatz: 10 µg DNA
0,5 U Enzym
2 µl Puffer (10X)
ad 20 µl H₂O

Der Verdau erfolgte bei 37 °C über Nacht.

2.2.5. Aufreinigung von Vektor-DNA

Um störende Salze herauszufiltern, wurde der linearisierte Vektor vor Dephosphorylierung mit dem „QIA quick PCR Purification Kit“ aufgereinigt.

2.2.6. Dephosphorylierung von Vektoren

Nach Restriktionsspaltung des Vektors wurden die 5'-Phosphatgruppen durch alkalische Phosphatase entfernt, um eine Autoligation der Vektor-DNA bei der folgenden Ligationsreaktion zu verhindern.

Reaktionsansatz: 81 µl Vektor-Eluat
10 µl Dephosphorylierungspuffer (10X)
7 µl Aqua dest.
2 µl alkalische Phosphatase

Der Reaktionsansatz wurde für 4 h bei 37 °C inkubiert. Um für die weitere Verwendung der Vektor-DNA Verunreinigungen, wie Enzyme und Salze, zu beseitigen, erfolgte eine Isolierung über Agarosegelelektrophorese mit anschließender Gelextraktion (2.2.2. und 2.2.3.).

2.2.7. Ligation

Um verschiedene DNA-Fragmente miteinander zu verknüpfen, wird die T4-DNA-Ligase verwendet. Diese katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 3'-Hydroxylgruppe und der Phosphatgruppe eines 5'-Endes.

Zum Einbringen des DNA-Konstrukts in einen Expressionsvektor wurden die aufgereinigten DNA-Fragmente zusammen mit dem linearisierten und dephosphorylierten Vektor in die Ligationsreaktion eingesetzt. Dabei wurde in verschiedenen Ansätzen das molare Verhältnis von Vektor-DNA zu Insert-DNA zwischen 1:1 und 1:3 variiert. Nach Zugabe des ATP-haltigen Ligationspuffers und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) wurde das Gesamtvolumen mit sterilem A. dest auf 20 µl aufgefüllt. Die Ligationsreaktion erfolgte bei 14 °C über einen Zeitraum von ca. 18 h.

2.2.8. Transformation kompetenter Bakterien

Zur Vermehrung der Plasmid-DNA wurden kompetente Bakterien transformiert. Bei diesem Vorgang nehmen Bakterien Fremd-DNA auf, die mit einem Resistenzgen ausgestattet ist. Bakterien mit aufgenommenem Resistenzgen besitzen einen Selektionsvorteil. Meist wird eine Antibiotikaresistenz vermittelt, unter Selektionsdruck verbleibt das eingebrachte Plasmid stabil in der Bakterienkultur.

Kompetente Bakterien (DH5α, Stbl2) wurden entsprechend den Herstellerangaben transformiert. Die Bakterien wurden nach erfolgter Transformation auf Agarplatten mit Selektionsmarker ausgestrichen und von Einzelklonen Suspensionskulturen angeimpft. Aus diesen wurde mittels Minipräparation Plasmid-DNA gewonnen und durch Restriktionsverdau überprüft.

Um positiv getestete Bakterienklone zu konservieren, wurden aus Suspensionskulturen Glycerolkulturen angelegt, die bei -80 °C gelagert werden können.

Hierfür wurde 500 µl der Kultur mit 500 µl Glycerol versetzt und sofort bei -80 °C weggefroren.

2.2.9. Plasmid-Präparationen

Um Plasmide aus Bakterienkulturen in ausreichender Menge z.B. für Transfektionen zu isolieren, wurden die Fertigsysteme „QiagenPlasmid Maxi Kit“ bzw. „Qiagen Plasmid Mini Kit“ verwendet.

Für die Minipräparation wurden 5 ml LB-Medium, supplementiert mit dem entsprechenden Antibiotikum, aus einem Glyzerolstock angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Retrovirale Vektoren wurden zur Vermeidung von Rekombinationen bei 30 °C bebrütet.

Für die Maxipräparation wurde ein Volumen von 100 ml Bakteriensuspension eingesetzt.

Der Aufschluss der Bakterien basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse. Die Plasmid-DNA wurde anschließend an das Gelbett einer äquilibrierten Säule gebunden, die mit einem Anionenaustauscherharz beschickt ist. Nach dem Auswaschen von Verunreinigungen (z.B. RNA, Proteine, Metabolite) wurde die Plasmid-DNA von der Säule eluiert, mit 10,5 ml Isopropanol bei Raumtemperatur präzipitiert und für 30 min bei 4 °C und 14000 U/min zentrifugiert. Die DNA wurde mit 6 ml 70%igem Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert, getrocknet und in 100 µl 0,1X TE aufgenommen.

2.2.10. Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Eine gängige Methode zur Bestimmung der DNA-Konzentration ist die Messung der UV-Absorption bei 260 nm. Um im Weiteren eine Aussage über die Qualität der DNA bzw. RNA zu erhalten, wurde ein Absorptionsquotient (Q), welcher sich aus den Absorptionswerten bei 260 nm (Maximum des DNA-Spektrums) und 280 nm (Maximum des Spektrums von aromatischen Aminosäuren in Proteinen) ermittelt. Für reine DNA-Lösungen liegt Q zwischen 1,7 und 2.

In einer Quarzküvette wurde der Leerwert mit 100 µl 0,1X TE-Puffer (bei Messung von DNA) bzw. 100 µl RNase-freiem Wasser (bei Messung von RNA) bestimmt. Danach wurden die Proben mit einer Verdünnung von 1:50 in 0,1X TE-Puffer bzw. RNase-freiem H₂O gemessen, wobei eine OD₂₆₀ von 1 bei einer Küvettendicken von 1 cm einer DNA-Konzentration von ca. 50 µg/ml bzw. RNA-Konzentration von ca. 40 µg/ml entspricht.

2.2.11. Isolierung von DNA aus Gewebe

Zur Isolation von genomischer DNA aus murinem Gewebe wurde das „QIA amp DNA Mini Kit“ nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.12. Gewinnung von RNA aus eukaryotischen Zellkulturen

Zur Herstellung von Gesamt-RNA wurde das Präparationsystem „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

Die Isolation der RNA erfolgte über eine Silica-Gelmatrix, über welche die RNA gebunden und so von Verunreinigungen wie Proteinen, Polysacchariden und Lipiden befreit wird. Nach Elution der RNA in RNase-freiem Wasser wurde diese bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung zwischengelagert.

2.2.13. cDNA-Synthese

Um aus isolierter RNA komplementäre DNA (cDNA) herzustellen, wurde das Fertigsystem „Omniscript Reverse Transcriptase“ von Qiagen nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die in dem Kit enthaltene MMLV Reverse Transkriptase synthetisiert aus RNA cDNA. Um diese Reaktion ausführen zu können, benötigt die Reverse Transkriptase ein Startermolekül, das an die RNA bindet. Hierfür werden Desoxythymidin-Oligonukleotide ("Oligo(dT)") in die Reaktion eingesetzt. mRNA besitzt an ihrem 3'-Ende eine Abfolge von Adenin-Nukleotiden (Poly (A)-Schwanz), an die die Desoxythymidin-Oligonukleotide binden. Mittels der ebenfalls im Kit enthaltenen Deoxynukleosidtriphosphate (dNTP-Mix) synthetisiert die Reverse Transkriptase komplementäre cDNA-Stränge aller polyadenylierten RNA's der Probe.

Es wurden 5 µg isolierte Gesamt-RNA in die Reaktion eingesetzt. Die Ansätze wurden im Thermocycler mit folgenden Bedingungen inkubiert: 42 °C für 90 min, 70 °C für 15 min, 4 °C - ∞. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

2.2.14. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis et al., 1992)

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*) ist eine Methode zur Amplifikation spezifischer Nukleinsäureabschnitte. Hierzu macht man sich die Eigenschaften der Polymerasen zunutze, DNA zu duplizieren. Um der Polymerase den Beginn der Synthese zu ermöglichen, benötigt diese ein bereits vorhandenes kurzes DNA-Stück mit einem freien 3'-OH-Ende. Diese kurzen DNA-Stücke werden

in Form von Oligonukleotiden dem Versuchsansatz beigefügt. Die Oligonukleotide oder Primer binden an die einzelsträngige DNA und ermöglichen so den Beginn der Synthese eines neuen Stranges. Durch erneutes Denaturieren der DNA werden diese Doppelstränge wiederum getrennt und ein neuer Vorgang kann gestartet werden.

Die zugegebenen Primer werden so gewählt, dass sie den Bereich, der amplifiziert werden soll, flankieren. Ein Primer bindet am „sense“-Strang, ein zweiter am „antisense“-Strang, der dazwischen befindliche DNA-Abschnitt wird amplifiziert.

Da auch die neu gebildeten Stränge im nächsten Schritt als Matrize für die Polymerase dienen können und sich an sie wieder neue Primer anlagern, kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation.

2.2.14.1. qRT-PCR

Die Quantifikation der Expression der Gene für MCL1, BCL-x_L und BCL-2 erfolgte mittels quantitativer Real-Time-PCR. Zur Durchführung wurde das Kit „Light cycler FastStart DNA Master SYBR GreenI“ verwendet.

Das Light Cycler System erlaubt eine quantitative und qualitative PCR mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBRGreenI. Dieser fluoresziert nur, wenn er an Doppelstrang-DNA (dsDNA) gebunden ist. Der Beginn der exponentiellen Produktzunahme, der linearen Logphase der PCR, wird aufgrund der Fluoreszenzzunahme bestimmt und entspricht dem sog. *crossing point*. Dieser korreliert mit der Anfangskonzentration der zu amplifizierenden cDNA-Sequenz und kann deshalb zur Quantifizierung von RNA Transkripten herangezogen werden. Im Anschluss an die letzte Elongationsphase der PCR wurde jeweils eine Schmelzkurvenanalyse zur Identifizierung des spezifischen Produkts durchgeführt. Die Spezifität des Schmelzpunktes eines jeden PCR-Produktes ist sowohl von der Produktlänge als von dem GC-Gehalt abhängig.

Zusätzlich wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch in einem 1,0%igen Agarosegel aufgetrennt (post PCR-Schritt).

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis ausgeführt.

10X Reaktionsmix	2 μ l
25 mM Magnesiumchlorid	2,4 μ l
Sense Primer (20 pmol/ μ l)	1 μ l
Antisense Primer (20 pmol/ μ l)	1 μ l
cDNA	10 μ l
A. dest. (PCR rein)	1,6 μ l

Tabelle 2.2.1.: Reaktionsansatz zur qRT-PCR

	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklenzahl
Denaturierung	95	600	1
Amplifikation	95	5	40
	60	5	
	72	20	
Schmelzkurve	95	0	1
	62	5	
	95	0 (0,1 °C/s)	
Kühlung	40	30s- ∞	1

Tabelle 2.2.2.: PCR-Programm zur qRT-PCR am Light Cycler

2.2.15. Zellkultur

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte stets unter den gleichen Voraussetzungen in einem Brutschrank bei einer Temperatur 37 °C, 5% CO₂ und feuchter Atmosphäre.

2.2.15.1. Herstellen von Zelllinien

Murine Fibroblasten wurden aus Embryonen des Embryonalstadiums E14 von CyA2kB-transgenen Mäusen gewonnen. Hierzu wurden die Embryonen aus dem Uterus der weiblichen Tiere unter sterilen Bedingungen entnommen, der Kopf und die inneren Organe entfernt und aus dem verbleibenden Gewebe eine Zellsuspension durch Inkubation mit 3 ml Trypsin-EDTA für 30 min bei 37 °C hergestellt. Nach einer weiteren Inkubationsphase wurden 2 ml FKS zur Neutralisation des Trypsins zugesetzt. Um das Trypsin vollständig zu entfernen, wurde die Zellsuspension bei 1400 U/min für 5 min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in DMEM versetzt mit 15% FKS aufgenommen und in einer Zellkulturschale ausgesät. Nach

24 h wurde das Nährmedium gewechselt.

Zur Immortalisierung der Zellen wurden diese in der vierten Kulturpassage mit den Vektoren pBabeHygro.myc und pBabeHygro.H-ras transduziert.

2.2.15.2. Passagieren von Zellen

Durch die fortwährende Poliferation der Zellen mussten diese 2-3-mal pro Woche geteilt (passagiert) und in frisches Wachstumsmedium überführt werden. Suspensionszellen wurden hierzu in ein Schraubdeckelröhrchen überführt und bei 800 U/min für 10 min zentrifugiert. So war es möglich, die Zellen von verbrauchten Nährmedium zu trennen und von vorhandenen Zellfragmenten zu reinigen. Nach erfolgter Zentrifugation wurde das Zellpellet in frischem Nährmedium aufgenommen und in dem gewünschten Teilungsverhältnis auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt.

Adhärente Zellen wurden nach Abnahme des Mediums mit 5 ml PBS gewaschen, mit 1-2ml Trypsin-EDTA versetzt und für 1-2 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die so gelösten Zellen wurden in 5ml Nährmedium aufgenommen, bei 1400 U/min für 5 min zentrifugiert und die sedimentierten Zellen entsprechend dem gewünschten Teilungsverhältnis auf neue Zellkulturschalen verteilt. Nach 24 h erfolgte eine optische Kontrolle.

2.2.15.3. Einfrieren von Zellen

Nach Abnahme des Nährmediums wurden die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin-EDTA von der Kulturplatte gelöst. Die Zellen wurden in ein Schraubdeckelgefäß mit 5 ml vorgewärmtem Medium überführt und für 5 min bei 1400 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml Einfriermedium (90% FKS+10% DMSO) resuspendiert und die Lösung in ein Tiefkühlröhrchen überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Nach 24 h mussten die Tiefkühlröhrchen zur langfristigen Lagerung der Zelllinien in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt werden.

2.2.15.4. Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden dem Stickstofftank entnommen und umgehend in einem Wasserbad mit

37 °C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde unter sterilen Bedingungen in ein 15 ml Schraubdeckelröhrchen mit 5 ml vorgewärmten Nährmedium überführt und bei 1400 U/min für 5 min zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die sedimentierten Zellen in Nährmedium resuspendiert und in ein steriles Kulturgefäß überführt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel um eventuell vorhandene Reste an DMSO zu entfernen.

2.2.15.5. Restimulation muriner T-Zell-Linien

Zur gezielte Generierung antigenspezifischer muriner T-Zelllinien war es erforderlich, diese wöchentlich durch Kokultivierung mit anderen Zellen, die das entsprechende Antigen in einem geeigneten molekularen Kontext auf ihrer Oberfläche präsentieren, zu restimulieren.

Hierzu wurden Jurkat A2-Zellen mit 200 Gy bestrahlt, nach zweimaligen Waschen für 30-60 min mit 5 µg des entsprechenden Peptids und 5 µg β-2-Mikroglobulin in FKS-freiem RPMI bei 37 °C in feuchter Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Um überschüssiges Peptid zu entfernen, schloss sich zweimaliges Waschen in Nährmedium an.

Frisch gewonnene Milzzellen (siehe Abschnitt 2.2.23.2.) aus C57Bl/6-Mäusen wurden bei 3,0 Gy bestrahlt, gewaschen und auf $12 \cdot 10^6$ / ml eingestellt.

Zur Restimulation wurden die T-Zellen in einem makroskopisch ermitteltem Teilungsverhältnis mit $0,5 \cdot 10^6$ JA2 und $6 \cdot 10^6$ Milzzellen unter Zugabe von 5-10% TCGF kokultiviert. Nach vier Tagen erfolgte eine Kontrolle durch Zählung der T-Zellen (Theobald et al., 1995).

2.2.15.6. Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde aus einer homogenen Zellsuspension ein Volumen von 50 µl entnommen, im Verhältnis 1:1 mit 0,2% Trypanblau versetzt und 10 µl der Mischung in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Aus dem Mittelwert der in den vier Quadranten der Zählkammer gezählten Zellen konnte unter Berücksichtigung des Kammerfaktors (10^4) und der hergestellten Verdünnungen die Zellzahl pro ml bestimmt werden.

2.2.16. Herstellung stabil transduzierter Zelllinien

2.2.16.1. Transfektion von eukaryotischer Zelllinien mittels Calciumphosphat

Eine gängige Methode zum Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen ist die phagozytotische Aufnahme eines Copräzipitats aus DNA und Calciumphosphat (Graham and van der Eb, 1973). Hierzu wird die DNA mit Calcium und einem Phosphatpuffer gemischt; dabei bilden sich feinkörnige Präzipitate, die auf die Zellen pipettiert werden und von diesen über Endocytose aufgenommen werden. Ein Teil der DNA gelangt in den Kern, um dort episomal transkribiert zu werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Calciumphosphat-Methode verwendet, um die Verpackungszelllinien Phönix und 293T mit retroviralen Vektoren und den entsprechenden Helferplasmiden zu transfizieren.

2.2.16.2. Retrovirale Transduktion von eukaryotischer Zelllinien

Retroviren gehören zur Familie der RNA-Viren, die sich über ein DNA-Intermediat replizieren. Dieses DNA-Intermediat oder Provirus integriert sich stabil in das Genom der infizierten Zelle. Der Integrationsort der viralen DNA ist unspezifisch und wird durch das viral kodierte Protein Integrase bewirkt. Die Aufnahme des Virus geschieht über rezeptorgesteuerte Endozytose.

Retrovirale Gentransfersysteme bestehen aus zwei Komponenten: dem retroviralen Vektor und der Verpackungszelllinie.

Der retrovirale Vektor ist ein von MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) abgeleitetes Plasmid, das nur noch über die retroviralen 5'- und 3'-LTRs, das Verpackungssignal Ψ , eine Insertionsstelle für die zu übertragende Gensequenz und gegebenenfalls über verschiedene Selektionsmarker verfügt.

Die Verpackungszelllinie stellt die retroviralen Proteine in trans zur Verfügung, die zur Verpackung der Vektor-RNA notwendig sind. Die viralen Proteine Reverse Transkriptase, Integrase und Hüllproteine werden von replikations-defizienten Proviren, die ins Genom der Zelllinie eingebracht worden sind, geliefert.

Abhängig der vom Helfergenom exprimierten Hüllproteine wird zwischen ecotropen und amphotropen Verpackungszelllinien unterschieden.

Nach Transfektion der Verpackungszelllinie mit dem retroviralen Vektor werden von diesem Transkripte hergestellt, die als genomische RNA in neue Virionen verpackt werden. Die Transkripte werden jedoch auch in der Verpackungszelllinie translatiert.

Durch die gebildeten Virionen können Zielzellen infiziert werden, in deren Genom sich das von der übertragenen retroviralen RNA umgeschriebene Provirus stabil integriert. Das entsprechende Gen und der Selektionsmarker werden in der eigentlichen Zielzelllinie exprimiert.

2.2.16.3. Selektion von Zelllinien

Um solche Zellen zu selektieren, die einen Vektor aufgenommen haben, werden Selektionsgene auf den für den Gentransfer verwendeten Vektoren platziert. Diese

Gene vermitteln eine Resistenz gegen Antibiotika, die auf eukaryotische Zellen wirksam sind.

Puromycin wirkt auf zweierlei Weise in den Zielzellen: Zum einen kommt es zu einer Inhibierung des Proteintransporte in die Mitochondrien, zum anderen terminiert Puromycin die Translation durch Mimikry einer tyrosyl-tRNA.

Bei Hygromycin B handelt es sich um ein Aminoglykosid, das die Proteinbiosynthese in Pro- und Eukaryoten hemmt.

2.2.16.4. Herstellung retroviraler bzw. lentiviraler Virusüberstände

Virusüberstände retroviraler Vektoren wurden durch Transfektion der Verpackungszelllinie Phönix hergestellt.

$1,2 \cdot 10^6$ Phönix-Zellen wurden auf einer 10 cm-Zellkulturschale, die mit Fibronectin beschichtet war, am Vortag ausgesät. Vier Stunden vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. In einen sterilen Polypropylenröhrchen wurden 200 μ l H₂O mit 1,5 μ g pCMV.VSV-G, 1,5 μ g Hit60 (MLV gag-pol), 10 μ g Vektor-DNA und 50 μ l 2 M CaCl₂ versetzt. Unter starkem Schütteln mittels eines Reagenzglasschüttlers wurde 2XHBS-Puffer tropfenweise zugegeben. Es schloss sich eine zweiminütige Inkubation zur Bildung von Präzipitaten bei Raumtemperatur an, danach wurde das Gemisch gleichmäßig auf den Zellen verteilt. Nach 20-stündiger Inkubation im Feuchtinkubator erfolgte eine optische Kontrolle der Zellen sowie ein Mediumwechsel. Nach weiteren 24 h konnte der Virusüberstand geerntet werden. Dieser wurde mit Hilfe eines Spritzenvorsatzfilters (Porengröße 0,45 μ M) von Zellkontaminationen der Verpackungszelllinie befreit, mit Polybrene (5 μ g/ml Endkonzentration) versetzt und auf die Zielzellen gegeben.

Die Zielzellen CyA2Kb wurden am Vortag in drei unterschiedlichen Dichten ausgesät ($0,1 \cdot 10^6$, $0,15 \cdot 10^6$ und $0,2 \cdot 10^6$ Zellen), um in einem Ansatz eine optimale Transduktionseffizienz zu erreichen.

24 h später wurde das Medium gewechselt, so dass die Zellen 24 h regenerieren konnten, bevor das Selektionsmedium hinzugegeben wurde.

Die Sensitivität der Zielzellen CyA2Kb gegenüber den Antibiotika Hygromycin B und Puromycin wurde zuvor austitriert. Für Puromycin lag diese bei einer Konzentration von

1 μ g/ml, für Hygromycin bei einer Konzentration von 100 μ g/ml. Die Selektion erfolgte über 14 Tage, wobei eine Kontrollprobe ohne Resistenzgen mitgeführt wurde, die

nach wenigen Tagen unter Selektion starb. Um eine dauerhafte Expression des Genproduktes Akt-Er^{tam} zu gewährleisten, wurden die Zellen unter Dauerselektion mit 0,5 µg/ml Puromycin im Nährmedium gehalten.

Zur Herstellung lentiviraler Virusüberstände wurde als Verpackungszelllinie 293T verwendet, hierbei kam das gleiche Protokoll zur Anwendung, wobei $1,4 \cdot 10^6$ Zellen zu Beginn eingesetzt wurden. Es wurden 5 µg Vektor-DNA, 5 µg PMDL, 3 µg pMDG(VSV-G) und 2 µg RSV-Rev eingesetzt.

2.2.17. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt Größe, Strukturen, Oberflächeneigenschaften und auch intrazelluläre Eigenschaften von Einzelzellen zu untersuchen. Ein wichtiges Hilfsmittel stellen hierbei sowohl an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte spezifische Antikörper, als auch Fluoreszenzfarbstoffe, die an spezifische Zellstrukturen binden, dar.

Das Kernelement des Durchflusszytometers ist ein Laser, an dessen gebündeltem Strahl die Zellen in einem laminaren Probenstrom einzeln vorbeigeführt werden. Der Laser regt den eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff an, der daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Die emittierten Photonen werden durch ein komplexes System an Spiegeln und Filtern im Durchflusszytometer gebündelt und zerlegt. Somit bekommt man für jeden Farbstoff ein spezifisches Signal. Die Photonenkonzentration und somit die Höhe des gemessenen Signals verhält sich proportional zur Menge des an der Zelle gebundenen Farbstoffs.

Unabhängig von den gekoppelten Farbstoffen lässt sich eine Aussage über Größe und Granularität der Zelle treffen. Das von der Zelle nach vorne abgelenkte Streulicht ist ein Maß für die Größe der Zelle (Forward Scatter); das in einem Winkel von 90° abgestrahlte Seitenstreulicht ist ein Maß für die Zellgranularität und wird als Sideward Scatter bezeichnet.

Mit dem Einsatz von Fluoreszenzen unterschiedlicher Emissionsspektren können verschiedene Zelleigenschaften gleichzeitig untersucht werden.

2.2.17.1. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials

TMRE (*Tetramethylrhodaminethylsterperchlorat*) ist ein membranpermeabler, kationischer Fluoreszenzfarbstoff, der sich in Mitochondrien mit intaktem Membranpotential ansammelt. Während der Apoptose kommt es zur Depolarisation

des mitochondrialen Membranpotentials, wobei der Farbstoff aus den Mitochondrien ins Zellplasma diffundiert. Dies zeigt sich in einer Abnahme der messbaren Fluoreszenz bei 520 nm. Somit zeigt sich eine Erniedrigung des mitochondrialen Membranpotentials in einer Abnahme der im Durchflusszytometer messbaren Fluoreszenzintensität.

Zur Messung des mitochondrialen Membranpotentials wurde der Farbstoff direkt in die Zellkultur gegeben (Endkonzentration: 50 nM). Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden die Zellen geerntet, in ein Probenröhrchen überführt und nach Zentrifugation einmal in 3 ml PBS gewaschen. Nach wiederholtem Zentrifugieren wurden die sedimentierten Zellen in 500 µl PBS aufgenommen und im Durchflusszytometer gemessen.

2.2.17.2. Bestimmung des Zellzyklusprofils

Der Zellzyklus der eukaryotischen Zelle zeichnet sich durch verschiedene Stadien aus, in denen die Menge an genetischem Material variiert. So kommt es in der S-Phase der Zelle zu einer Verdopplung des genetischen Materials, so dass der Chromosomensatz von $2n$ auf $4n$ erweitert wird. Die sich anschließende G₂/M-Phase zeichnet sich durch einen vierfachen Chromosomensatz ($4n$) aus, der sich durch Zellteilung auf den einfachen Chromosomensatz ($2n$) reduziert. In der präsynthetischen Phase G₁ verfügt die Zelle somit über einen Chromosomensatz $2n$. Im Verlauf des programmierten Zelltodes kommt es durch aktivierte Nukleasen zum Abbau bzw. zur Fragmentierung der DNA, so dass eine Zelle, die sich im Prozess der Apoptose befindet, über einen Chromosomensatz kleiner $2n$ verfügt.

Mit Hilfe des in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs Propidiumiodid (Emissionsmaximum 617 nm) kann man das Zellzyklusprofil einer Zellpopulation im Durchflusszytometer sichtbar machen bzw. den Anteil an apoptotischen Zellen determinieren. Bei der Zellzyklus-Analyse besteht ein linearer Zusammenhang zwischen DNA-Gehalt und Fluoreszenzintensität, wenn Propidiumiodid im Überschuss in die Färbung eingesetzt wird.

Um ein Verfälschen der Ergebnisse zu vermeiden, ist es wichtig, Dupletten, die bei der Probenvorbereitung entstehen können, nicht in die Analyse mit einzubeziehen.

Da Dupletten gegenüber einer Einzelzelle jedoch ein breites Lasersignal erzeugen, können sie von der Analyse ausgeschlossen werden.

Für die durchflusszytometrische DNA-Messung wurden Zellen geerntet, in Polypropylenröhrchen überführt und für 5 min bei 1400 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl HFS-Puffer aufgenommen. Während einer Inkubation von 30min bei 4 °C im Dunkeln wurden die Zellen permeabilisiert und gleichzeitig durch PI-Inkorporation gefärbt. Anschließend wurde das Zellzyklusprofil der Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt.

2.2.17.3. Direkte und indirekte Markierung von Oberflächenantigenen

Um zelluläre Oberflächenantigene zu detektieren und somit die Zellen charakterisieren zu können, wurden die Oberflächenantigene mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer gemessen.

Hierzu wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen in ein Polypropylenröhrchen überführt und bei 1400 U/min für 5min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zum Waschen in 3 ml PBS aufgenommen und wiederum nach Durchmischen abzentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet im PBS-Rücklauf (ca. 50 µl) resuspendiert und mit 5 µl Antikörper versetzt. Es schloss sich eine Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln an.

Nach zweimaligem Waschen der Zellsuspension, um ungebundenen Antikörper zu entfernen, konnten die Zellen in 500 µl FACS-Puffer zur Messung im Durchflusszytometer aufgenommen werden.

War der Antikörper selbst noch nicht an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, musste der unmarkierte Primärantikörper in einem zweiten Schritt mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper markiert werden. Bei dieser indirekten Markierung war darauf zu achten, dass kein ungebundener Primärantikörper bei Zugabe des sekundären Antikörpers vorhanden war, um falsch positive Signale zu unterbinden. Die Inkubationszeit des Sekundärenantikörpers betrug 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln.

2.2.18. Fluoreszenzfärben von Zellen

Zur Markierung einer Zellpopulation wurde der Fluoreszenzfarbstoff CFDA (*Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester*) verwendet. CFDA diffundiert passiv in die Zellen, wo die Acetatgruppen des Farbstoffs durch intrazelluläre

Esterasen gespalten werden. Hierdurch kommt es zur Bildung von fluoreszierenden, amino-reaktiven Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Estern.

Der Farbstoff wurde in DMSO gelöst und in einer Konzentration von 5 μM sterilem PBS zugesetzt. Die Zellen wurden für 15 min bei 37 °C in dem so vorbereiteten Medium inkubiert. In dieser Zeit diffundierte der Farbstoff in die Zellen. Nach Abnahme des CFDA-PBS wurden die Zellen mit Nährmedium versorgt und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation waren die Zellen gefärbt und stehen für weitere Versuche zur Verfügung.

2.2.18.1. Kokultur

Die Zellen wurden mit CFDA (2.2.18.) gefärbt und am Folgetag in einer 24-Loch-Platte ausgesät, wobei eine Zellzahl von $0,04 \cdot 10^6$ Zellen verwendet wurde. 24 h nach Aussaat der Zellen wurde in die entsprechenden Löcher 4-OHT-haltiges Nährmedium gegeben, um das unter 2.2.28. beschriebene Fusionsprotein zu aktivieren. Nach Inkubation über eine Stunde, wurden die T-Zellen in verschiedenen E:T-Konzentrationen zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C im Brutschrank mit regelmäßiger optischer Kontrolle der Zellen. Zeigten die Zellen einen veränderten Phänotyp (abgerundet, abgelöst), wurde TMRE zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials in Medium gegeben (2.2.17.1.). Die Auswertung erfolgte im Durchflusszytometer, wobei Zielzellen aufgrund ihrer grünen Fluoreszenz von Effektorzellen differenziert werden konnten.

2.2.19. Behandlung von Zelllinien mit zytotoxischen Agenzien

Zur Charakterisierung der Zelllinie und zur Funktionsprüfung der untersuchten Resistenzfaktoren *in vitro*, wurden die Zellen mit verschiedenen zytotoxischen Agenzien behandelt. Hierzu wurden $0,04 \cdot 10^6$ Zellen in einer 24-Loch-Platte ausgesät, 24 h später mit den Zytostatika in unterschiedlicher Konzentration behandelt. 24 h bzw. 48 h nach Zugabe des Zytostatikums erfolgte die Auswertung mittels Bestimmung des Membranpotential (2.2.17.1.) und Zellzyklusmessung (2.2.17.2.) im Durchflusszytometer.

2.2.20. Behandlung von Zelllinien mit UV-Bestrahlung

Zur Untersuchung der UV-induzierten Apoptose wurden $0,2 \cdot 10^6$ in einer 6-Loch-Platte 24 h vor Bestrahlung ausgesät. Mit Hilfe des Stratalinker wurden die Zellen bei einer Wellenlänge von 254 nm mit drei unterschiedlichen Dosen an Energie bestrahlt

(10 mJ/cm³ - 20 mJ/cm³ - 50 mJ/cm³). Um Bildung von toxischen Phenolen im Medium zu vermeiden, wurde nach Bestrahlung das Medium gewechselt und die Zellen für 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Zustand der Zellen am Durchflusszytometer mittels Zellzyklusmessung und Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials bestimmt.

2.2.21. Kolonie-Kokulturassay

Mit Hilfe des CFU (*Colony Forming Unit*)-Assays kann die unterschiedliche Empfindlichkeit der Zielzellen gegenüber der Effektorzellen nach Koinkubation anhand des Langzeitüberlebens untersucht werden.

5000 Zielzellen wurden in einer 96-Loch-Rundboden-Platte am Vortag ausgesät. Gegebenenfalls wurden die Zielzellen zum Aktivieren des Er^{tam}-Systems über Nacht mit

0,1 µM Hydroxy-Tamoxifen inkubiert. Kamen im Versuchsansatz Peptid-spezifische Effektorzellen zum Einsatz, wurden die Zielzellen mit dem entsprechenden Peptid 2 h vorinkubiert.

Die Effektorzellen wurden über 3 Stufen (30:1 – 3:1 – 1:1) ausverdünnt und in einem Volumen von 100 µl den vorgelegten Zielzellen zugegeben. Es folgte eine Inkubation von 4 h bei 37 °C im Brutschrank. Nach erfolgter Inkubation wurde das Medium abgenommen und durch dreimaliges Waschen mit PBS die nicht adhärennten Effektorzellen entfernt. Die im Loch verbliebenen Zielzellen wurden mit Trypsin-EDTA abgespült und in eine 6-Loch-Platte mit vorgelegtem Medium überführt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und eine Inkubation von 5-7 Tagen schloss sich an. Nach Ausformen einzelner, makroskopischer erkennbarer Zellkolonien, wurden die Zellen mit 70% Ethanol auf der Platte fixiert und für 60 min mit Brilliantblau gefärbt. Danach erfolgte eine optische Auswertung und Quantifizierung. Ein Vergleich der unterschiedlichen Anzahl an Kolonien lässt Rückschlüsse auf die Empfindlichkeit der Zielzellen gegenüber den Effektorzellen unter den unterschiedlichen Bedingungen zu.

2.2.22. Chrom-Freisetzung-Assay

Um die zellvermittelte Zytotoxizität untersuchen zu können, wurde der Chrom-Freisetzung-Assay angewandt. Dieser basiert auf der Freisetzung von radioaktivem Chrom (*Cr*) durch lysierte Zellen. Bei Versuchbeginn wurden $0,5 \cdot 10^6$ Zielzellen für 30

min in 100ci⁵¹Cr]-haltigem PBS 10% FKS und gegebenenfalls Peptid inkubiert. Bei dieser Inkubation wird das Chrom in das Zytoplasma der Zellen aufgenommen. Durch dreimaliges Waschen mit Nährmedium wurden überschüssiges Peptid und nicht aufgenommenes Chrom entfernt. Die so markierten Zielzellen wurden in einer 96-Rundboden-Loch-Platte mit den zytotoxischen Effektorzellen koinkubiert. Hierbei wurde das Verhältnis von Zielzelle zu Effektorzelle über fünf Stufen ausverdünnt (30:1 - 10:1 - 3:1 - 1:1 - 0,3:1 - 0,01:1).

Nach einer Ko-Inkubation von 5 h bei 37 °C und 5% CO₂ in einem Feuchtinkubator wurden die Platten bei 1300 U/min für 9 min ohne Bremsen abzentrifugiert und der Kulturüberstand mit dem freigesetzten Chrom abgenommen. Die darin enthaltene Radioaktivität wurde in einem Szintillationszähler quantifiziert. Die Menge an freigesetztem ⁵¹Chrom ist proportional zu nekrotischem bzw. spätapoptotischem Tod der Zielzellen.

Die spezifische Lyse wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = 100 \times \frac{(\text{Probe } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}) - (\text{Spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung})}{(\text{Maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}) - (\text{Spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung})}$$

Spontane ⁵¹Cr-Freisetzung: ⁵¹Cr-Freisetzung der Ziellzellen inkubiert ohne Effektorzellen

Maximale ⁵¹Cr-Freisetzung: Gesamtgehalt an ⁵¹Cr in den Zielzellen

2.2.23. Mausmodelle

2.2.23.1. Bestrahlen von Mäusen

Um die verbleibende NK-Zellfunktion in den NOD/SCID-Mäusen auszuschalten, wurden die Tiere 24h vor Applikation der Tumorzellen einer subletalen Ganzkörperbestrahlung (1,5 Gy) ausgesetzt.

2.2.23.2. Gewinnung von Milzzellen aus Mäusen

Zur Gewinnung muriner Milzzellen wurden 8-12 Wochen alte Tiere mittels Luxation der Halswirbelsäule getötet. Die Tiere wurden in Seitenlage fixiert, mit 70% Ethanol desinfiziert und die Haut oberhalb der Milz eröffnet. Es erfolgte eine weitere Desinfektion, bevor die Haut durchtrennt wurde und die Milz entnommen werden konnte.

Das Organ wurde in 5 ml DMEM komplettiert mit 15% FKS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin überführt. Die Milz wurde zum Herstellen einer Zellsuspension in einer Petrischale auf einem feinmaschigen Draht vorsichtig zerrieben. Die erhaltene Zellsuspension wurde über ein Zellsieb (0,45 µM) gegeben, um eventuelle Gewebereste zu entfernen. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.23.3. Applikation von Milzzellen

Die Milzzellen wurden zweimal in 20 ml PBS gewaschen und dabei die Zellzahl bestimmt. Das maximale Volumen, welches Mäusen intravenös verabreicht werden kann, beträgt 100 µl. Die Zellen wurden entsprechend dem gewünschten Verhältnis Milz- zur Tumorzelle in sterilem PBS aufgenommen und den Mäusen in die laterale Schwanzvene injiziert. Gleichzeitig erhielten die Tiere eine Injektion s.c. von $6 \cdot 10^5$ Units Interleukin-2 resuspendiert in PBS und inkomplettem Freund-Adjuvanz.

2.2.23.4. Transplantation von Tumorzellen

Zellen früher Passage wurden in ausreichender Menge expandiert, bei einer Konfluenz von 60-70% vom Boden der Zellkulturschalen gelöst und in PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bei 1400 U/min für 5 min zentrifugiert und die sedimentierten Zellen wiederum in 20 ml PBS aufgenommen, um letzte Reste von Medium und FKS zu entfernen. Nach Bestimmen der Gesamtzellzahl wurden die Zellen wieder abzentrifugiert und anschließend in PBS resuspendiert, so dass in 200 µl PBS die gewünschte Zahl an Zellen enthalten war. 200 µl der Zellsuspension wurden den NOD/SCID-Mäusen lateral s.c. appliziert.

2.2.23.5. Aufnahme des Tumorwachstums

Der Verlauf des Tumorwachstums wurde durch regelmäßiges Messen des Tumors mit Hilfe einer Schiebelehre bidimensional aufgenommen und anschließend graphisch ausgewertet.

2.2.23.6. Explantieren von Tumorgewebe

Die getötete Maus wurde zur Entnahme des Tumors in Rückenlage fixiert, die Haut der Bauchseite ausgehend von der Körpermitte durch einen median gelegten Schnitt

eröffnet und der subkutan gelegene Tumor vorsichtig freipräpariert. Der Tumor wurde abhängig von den sich anschließenden Untersuchungen weiterbehandelt.

2.2.23.7. Genotypisierung des Mausstamms C57Bl/6-Pfr1 tm1Sdz/J

Zur Kontrolle, ob es sich bei den verwendeten Tieren des Knock-out Stamms C57Bl/6-Pfr1 tm1Sdz/J um homozygote Tiere handelt (Vgl. 2.1.14.4.), wurde eine Genotypisierung in regelmäßigen Abständen mittels PCR (2.2.14.) an genomischer DNA der Tiere (2.2.11.) durchgeführt.

10X Reaktionsmix	2 µl
25 mM Magnesiumchlorid	2,4 µl
Sense Primer (20pmol/µl)	1 µl
Antisense Primer (20pmol/µl)	1 µl
cDNA	10 µl
A. dest. (PCR rein)	1,6 µl

Tabelle 2.2.3.: Reaktionsansatz zur Genotypisierung des KO-PFR1-Mausstammes

	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklenzahl
Denaturierung	94	180	1
Denaturierung	94	30	35
Amplifikation	66	60	
Extension	72	60	
Finale Extension	72	120	1
Kühlung	4	- ∞	1

Tabelle 2.2.4.: PCR-Bedingungen zur Genotypisierung des KO-PFR1-Mausstammes

2.2.24. Immunmagnetische Zellseparation

Um definierte Zellpopulationen aus einem Zellgemisch zu entfernen, kann man sich die antikörpervermittelte Zellseparation mittels magnetischer Markierungen der relevanten bzw. irrelevanten Zellen zu Nutze machen. Eine gut etablierte Methode ist die immunmagnetische Separation, bei der Antikörper an so genannte Magnetbeads gekoppelt werden. Bei diesen Beads handelt es sich um kolloidal suspendierte, kleine superparamagnetische Partikel, die nur in magnetischen Feldern über magnetische Eigenschaften verfügen, so dass die Partikel nicht verklumpen können. Man kann zwischen der Positiv- und der Negativselektion unterscheiden. Bei der Positivselektion werden die relevanten Zellen markiert, separiert und in einem anschließenden Arbeitsschritt wieder von den Beads entkoppelt. Bei der

Negativselektion werden die irrelevanten Zellen markiert und aus dem Zellkonglomerat depletiert.

In dieser Arbeit wurde mit der Negativselektion gearbeitet, da einerseits nur einzelne Populationen depletiert werden sollten, zum anderen waren die weiter verwendeten Zellen unbehandelt, so dass in den nachfolgenden Experimenten störenden Einflüsse aufgrund einer Antikörpermarkierung ausgeschlossen werden konnten.

Milzzellen aus C57Bl/6 Mäusen wurden wie unter Abschnitt 2.2.23.3. steril entnommen und die Gesamtzellzahl bestimmt. Die Zellen wurden bei 1400 U/min für 5 min zentrifugiert, die sedimentierten Zellen in dem entsprechenden Volumen an MACS-Puffer aufgenommen

(90 $\mu\text{l}/10^7$ Zellen) und mit CD8a-Microbeads (Miltenyi Biotech) versetzt (10 $\mu\text{l}/10^7$ Zellen). Nach vorsichtigem Durchmischen erfolgte eine Inkubation von 15 min bei 4 °C. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen und anschließend in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen.

Die so behandelte Zellsuspension wurde über eine mit ferromagnetischer Matrix ausgestatteter Säule geschickt, die sich innerhalb eines starken Magnetfeldes befand. Die markierten Zellen wurden hierdurch zurückgehalten, so dass sich nur unmarkierte, CD8-negative Zellen im Eluat befanden. Die Säule wurde zweimalig mit je 1 ml Puffer gewaschen und das Gesamteluat in weiteren Versuchen eingesetzt.

Die Reinheit der Methode wurde mittels Fluoreszeinisothiocyanat-gekoppelter Antikörper gegen das CD8-Oberflächenantigen im Durchflusszytometer kontrolliert (2.2.17.3.).

2.2.25. Proteinbiochemische Methoden

Zur Vermeidung einer proteolytischen Degradation der Proteine wurden alle Präparationen auf Eis und mit vorgekühlten Reagenzien durchgeführt. Da hauptsächlich Proteine untersucht wurden, die im Zytoplasma lokalisiert sind, fanden Methoden Anwendung, die zur Gesamtfreisetzung von Proteinen führten.

2.2.25.1. Herstellung von Gesamtzellextrakten

Für die Gewinnung von Gesamtprotein aus Zellen wurden Zellen in Medium aufgenommen und bei 1400 U/min für 5 min abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in der zweifachen Menge in NP-40-Lyse-Puffer resuspendiert. Es folgte eine zwanzigminütige Inkubation auf Eis unterbrochen von

wiederholtem Durchmischen der Ansätze auf einem Reagenzglasschüttler. Durch Schockgefrieren in Flüssigstickstoff und Wiederauftauen auf Eis wurden letzte intakte Membranen zerstört und die DNA geschert. Nach Zentrifugation (13000 U/min, 15 min 4 °C) konnte der proteinenthaltende Überstand abgenommen und bei -80 °C gelagert werden.

2.2.25.2. Herstellung von Tumorextrakten aus explantierten Maustumoren

Der wie unter Punkt 2.2.23.6 explantierte Tumor wurde sofort nach Entnahme in ein vorgekühltes Probenröhrchen überführt und mit 1,5 ml NP-40-Lysepuffer (komplementiert mit 25X Complete-Proteinaseinhibitor + je 1% Phosphataseinhibitor I+II (Sigma)) überschichtet. Nach kurzem Durchmischen erfolgte eine Inkubation von 5 min auf Eis. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe eines Dispergiergeräts einer Drehzahl von 8000 min⁻¹ zerkleinert und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Durch die mechanische Zerstörung der Zellmembran, einwirkende Detergenzien und Scherkräfte werden die zellulären Proteine freigesetzt.

Die Probenröhrchen wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren und das Lysat wiederum auf Eis aufgetaut. Es schloss sich eine Zentrifugation für 30 min mit 13000 U/min bei 4 °C an, zu deren Ende sich die freigesetzten zellulären Proteine getrennt von den sedimentierten unlöslichen Gewebetrümmern im Überstand befanden. Die Tumorextrakte wurden abgenommen und konnten bei -80 °C gelagert werden.

2.2.25.3. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

In saurem Milieu bindet der Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G-250 unspezifisch an Protein, damit geht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm auf

595 nm einher. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration.

Vor der eigentlichen Messung musste durch Adsorptionsmessungen von BSA-Lösung definierter Proteinmenge eine Eichkurve erstellt werden.

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurden 800 µl H₂O mit 200 µl Bradford-Konzentrat (Bio-Rad Protein-Assay) und 2 µl des Proteinextraktes in einer Küvette gemischt und für 7 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Farbreaktion erfolgte an einem Photometer bei 595 nm.

2.2.25.4. Auftrennung von Proteinen durch SDS-Gelelektrophorese (Lämmli, 1970)

Um Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht aufzutrennen zu können, müssen die Tertiär- und Sekundärstrukturen der Polypeptide aufgelöst werden. In der Probenvorbereitung wurde hierzu eine definierte Menge an Protein mit einem 6-fach konzentrierten SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min auf 96 °C erhitzt. Durch diesen Vorgang werden die Wasserstoffbrückenbindungen aufgelöst und es kommt zur Streckung der Proteine. Der im Ladepuffer enthaltene β -MSH reduziert zusätzlich die Disulfidbrücken der Proteine. SDS hat weiter die Eigenschaft, die Eigenladung der Proteine durch Anlagerung zu überdecken und ihnen eine negative Gesamtladung zu geben. Diese Nettoladung ist proportional zur Masse der Proteine. Daher bewegen sich SDS-gelöste Proteine im elektrischen Feld in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts. Mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können so die Proteine anhand ihrer Größe aufgetrennt werden, wobei eine Größenbestimmung mit Hilfe eines mitgeführten Größenstandards möglich ist.

In dieser Arbeit wurde das System nach Lämmli (1970) verwendet, das aus einem Sammel- (pH 6,8) sowie einem Trenngel (pH 8,8) besteht. Im Sammelgel kommt es zu einer Fokussierung der Proteine, so dass diese nahezu gleichzeitig in das Trenngel einwandern können. Über die Konzentration des Acrylamids im Trenngel kann auf den Vernetzungsgrad des Gels Einfluss genommen werden und dieser je nach gewünschtem Auftrennungsbereich variiert werden.

Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit 2 ml Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde es mit dem 5% Sammelgel überschichtet, in das ein Probenkamm mit Aussparungen für die Proben eingeführt wurde. Nach vollständigem Aushärten wurde das Polyacrylamid-Gel in eine vertikale Elektrophorese-Apparatur eingespannt und das Reservoir mit SDS-Laufpuffer befüllt. Die Taschen des Sammelgels wurden mit den zu untersuchten Proben sowie dem Größenstandard befüllt und die Elektrophorese bei 100 mV für 3-4 h durchgeführt.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Zusammensetzung von Trenn- bzw. Sammelgel aufgeführt.

	8%	10%	12%
H ₂ O	4,6 ml	4,0 ml	3,3 ml
30% Acrylamid-Bi-Acrylamid Fertigmischung	2,7 ml	3,3 ml	4,0 ml
1,5M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
SDS (10%)	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,006 ml	0,004 ml	0,004 ml

Tabelle 2.2.5.: Zusammensetzung des Trenngels (alle Volumina beziehen sich auf ein Minigel (Mini-Protean 2, Biorad))

	5%
H ₂ O	2,7 ml
30% Acrylamid-Bi-Acrylamid Fertigmischung	0,67 ml
1,0M Tris-HCl (pH 6,8)	0,5 ml
SDS (10%)	0,04 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	0,04 ml
TEMED	0,004 ml

Tabelle 2.2.6.: Zusammensetzung des Sammelgels (Volumina bezieht sich auf ein Minigel)

2.2.25.5. Proteintransfer immobilisierter Proteine auf Nitrocellulosemembran (Towbin et al., 1979)

Nachdem die Proteine mittels der Gelelektrophorese aufgetrennt waren, wurden sie durch Elektrotransfer aus der Polyacrylamid-Matrix auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Bei der Übertragung auf den Träger bleibt die geometrische Anordnung der Proteine erhalten. Der Transfer erfolgte in einem elektrischen Feld, das senkrecht zum Gel angelegt wird.

Das Polyacrylamid-Gel wurde aus der Apparatur entnommen, das Sammelgel abgetrennt und verworfen. Das Trenngel wurde in Transferpuffer überführt und dort für 3-5 min äquiliert. Des Weiteren wurden die Nitrocellulose-Membran sowie zwei Schwämme und zwei „Whatman“-Filterpapiere für 1 h in Transferpuffer eingelegt. Zur Vorbereitung des Transfers wurde das Gel mit der Membran zwischen Filterpapiere und Schwämme in eine Gitterkassette luftblasenfrei eingespannt. Die Gitterkassette konnte in die Transfervorrichtung eingelegt werden, so dass das Gel an der Kathode

positioniert war. Der Blottank wurde mit Transferpuffer befüllt. Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei 120 mA über Nacht (ca. 16 h).

Nach erfolgtem Transfer wurde dieser durch Färbung der Membran mit Ponceau S kontrolliert. PonceauS färbt unspezifisch und reversibel Proteine, so dass eine optische Kontrolle des Transfers erfolgen konnte.

Um freie Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde die Membran für 4 h bei Raumtemperatur unter Schütteln mit Blocking-Reagenz inkubiert.

2.2.25.6. Immunodetektion von Proteinen

Um immobilisierte Proteine auf der Membran zu detektieren, wird die Membran mit einem unmarkierten Primärantikörper inkubiert, der gegen spezifische Epitope des zu untersuchenden Proteins gerichtet ist. In einem zweiten Schritt erfolgte eine Inkubation mit einem zweiten, spezie-spezifischen Antikörper, der markiert ist und den Fc-Anteil des Erstantikörpers erkennt. Durch diese indirekte Markierung kommt es zur einer Signalverstärkung, da sich an den konstanten Teil des Primärantikörpers nicht nur ein, sondern mehrere Sekundärantikörper anlagern.

An die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper war das Enzym Peroxidase gekoppelt, das in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol katalysiert. Dabei bildet sich ein aktiviertes Zwischenprodukt, das bei Rückkehr in seinen energetisch ärmeren Zustand Licht emittiert. Diese Chemielumineszenz kann über Schwärzung auf einem Röntgenfilm oder mit Hilfe eines Lumineszenz-Detektors analysiert werden.

Die Membran wurde mit den Erstantikörpern bei 4 °C über Nacht unter ständiger Bewegung inkubiert. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen folgte 3x10minütiges Waschen mit Blocking-Reagenz, bevor die Membran mit dem jeweiligen Zweitantikörper inkubiert wurde. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur in einem Schraubdeckelgefäß auf einem dreidimensionalen Taumelrollmischer. Nach wiederholtem dreimaligem Waschen wurde die Membran der Chemielumineszenzreaktion ausgesetzt und zur Detektion ein Röntgenfilm auf die Membran aufgebracht.

2.2.25.7. Dehybridisieren der Membran

Damit die Membran wiederholt mit verschiedenen Antikörpern hybridisiert werden konnte, mussten vorher gebundene Antikörperkomplexe gelöst werden.

Für diesen Vorgang wurde die Membran mit 100 ml Dehybridisierungslösung versetzt und für 30 min bei 50 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Es folgte ein Waschen der Membran für 3X10 min und ein erneutes Blockieren für 1 h in Blocking-Reagenz. Danach konnte die Membran erneut mit Antikörper hybridisiert oder bei 4 °C in Folie verpackt gelagert werden.

2.2.26. Konditional aktivierbares Expressionssystem

Die Proteinkinase B/Akt wurde als konstitutiv aktive Mutante fusioniert an eine Östrogen-Rezeptor-Bindungsdomäne (ER) exprimiert. Die Östrogen-Rezeptor-Bindungsdomäne sorgt dafür, dass das exprimierte mtAkt-HA-ER^{tam} Protein in einem inaktiven Zustand vorliegt, da das Fusionsprotein mit Hitzeschockprotein Hsp70, Hsp90 und anderen Chaperonen im Zytoplasma komplexiert ist. Erst die Bindung des spezifischen Liganden an die Östrogen-Rezeptor-Bindungsdomäne induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors, die zur Auflösung des Protein-Chaperon-Komplexes führt und somit die Aktivierung des Fusionsproteins durch Phosphorylierung und Rekrutierung an die Zellmembran ermöglicht. Es wurde eine Punktmutante der ER-Sequenz (ER^{tam}) verwendet, die zur Folge, dass nur die Zugabe des synthetischen Steroids 4-Hydroxy-Tamoxifen zur posttranslationalen Aktivierung des Fusionsproteins führt (Littlewood et al., 1995).

4-Hydroxy-Tamoxifen wurde zur Aktivierung des Proteins in einer Konzentration von 0,1 µM direkt in die Zellkultur gegeben.

2.2.26.1. Aktivierung des ER^{tam}-Fusionsproteins *in vivo*

Zur Aktivierung des Fusionsproteins mAkt-HA-ER^{tam} in s.c. etablierten Tumoren wurde den Mäusen Tamoxifen gelöst in Erdnussöl intraperitoneal (1 mg / 24 h je Maus) verabreicht. In den jeweiligen Kontrollgruppen, in denen keine Aktivierung des Fusionsproteins gewünscht war, wurde den Tieren lediglich die Trägersubstanz Erdnussöl injiziert.

2.2.27. *in vitro* Kinase-Assay

Um die induzierbare Aktivität des in 2.2.27. beschriebenen Vektorsystems zu prüfen, wurde das „Akt-Kinase-Assay“ Kit (Cell Signaling Technology, USA) laut Herstellerangaben eingesetzt.

2.2.28. *in vitro* Proliferations-Assay

Um die metabolische Aktivität der Zellen zu untersuchen, wurde das „Cell Proliferation Kit I (MTT)“ (Roche, Mannheim) verwendet.

Nach Aufnahme des gelben Tetrazoliumsalz MTT in die Zellen, setzen diese es mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem stark blauen, wasserunlöslichen Formazanfarbstoff um. Für die photometrische Messung (570-590 nm) müssen die Zellen lysiert werden, um den Farbstoff freizusetzen. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen und gibt Hinweise auf die Zellproliferation.

3. Ergebnisse

3.1. Validierung des konditionalen Expressionssystems *in vitro*

Um zu überprüfen, ob die HLA-A*0201-transgenen murinen embryonalen Fibroblasten aus CyA2K^b-Mäusen die konstitutiv aktive Mutante der PKB/Akt stabil exprimieren, wurden Zellextrakte hergestellt und diese mittels Immunoblotting auf die Expression des hergestellten Konstruktes überprüft. Die endogene Form der PKB/Akt besitzt ein Molekulargewicht von 60 kD, das berechnete Molekulargewicht des Fusionsproteins betrug 88 kD. Somit ließ sich nach SDS-Gelelektrophorese die endogene PKB/Akt von dem exogenen, HA-getaggten Fusionsprotein unterscheiden (Abb. 3.1.). Vergleicht man die Expressionsstärken des Fusionsproteins mit der endogenen PKB/Akt, so zeigt sich, dass das Fusionsprotein annähernd in physiologischer Konzentration exprimiert wird.

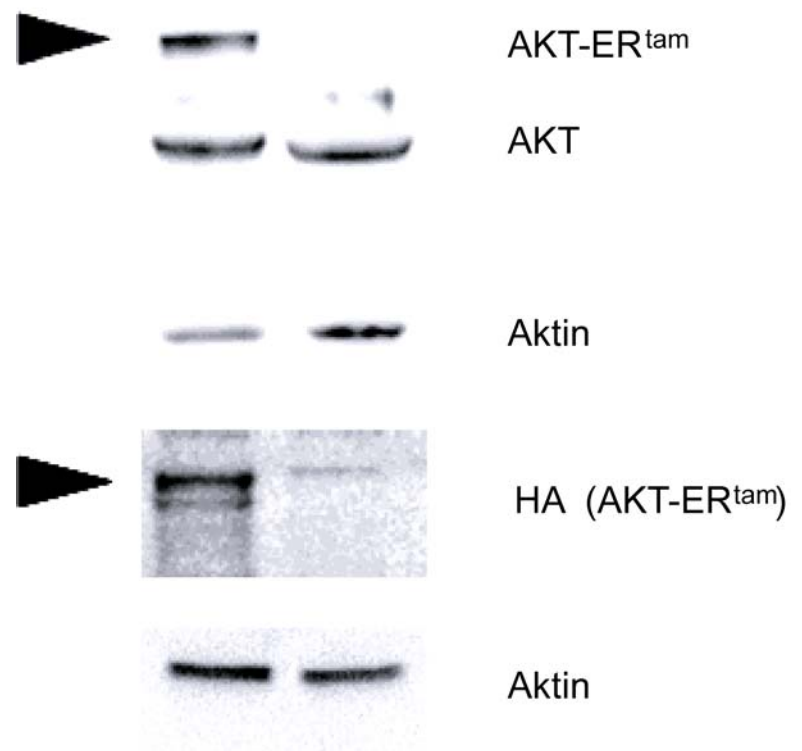


Abb. 3.1.: Detektion des Fusionsproteins PKB/Akt-ER^{tam} mittels Immunoblot.

Gesamtzellextrakte der stabil mit PKB/Akt-ER^{tam} transduzierten Zellen wurden mittels SDS-Page und Immunoblot auf die Expression des Fusionsproteins untersucht. Das HA-getaggte Fusionsprotein konnte sowohl mit einem gegen Akt-gerichteten Antikörper (oben), als auch mit einem gegen HA-gerichteten Antikörper (unten) detektiert werden. Durch die Fusion an den Östrogen-Bindungs-Rezeptor ist das Fusionsprotein um ~28 kD größer als endogene PKB/Akt.

Die Expressionsstärke des Fusionsproteins entspricht annäherungsweise der von endogener PKB/Akt.

Im Weiteren sollte die pharmakologische Regulierbarkeit des Fusionsproteins überprüft werden (Vgl. 2.2.26.). PKB/Akt-ER^{tam} liegt in komplexierter Form und somit inaktiv in der Zelle vor. Nach Addition des spezifischen Liganden Tamoxifen in das Nährmedium kommt es zur Interaktion mit der Östrogen-Rezeptor-Bindungsstelle, was eine Konformationsänderung und die Aktivierung des Proteins zur Folge hat (Abb. 3.2. A)). Der Aktivierungszustand von PKB/Akt kann durch den Nachweis spezifischer Phosphoepitope überprüft werden. Nach Zugabe von Tamoxifen fand sich eine Phosphorylierung von PKB/Akt-ER^{tam} an den Aminosäuren, die Serin 473 und Threonin 308 der endogenen wt-PKB/Akt entsprechen (Abb. 3.2. B)).

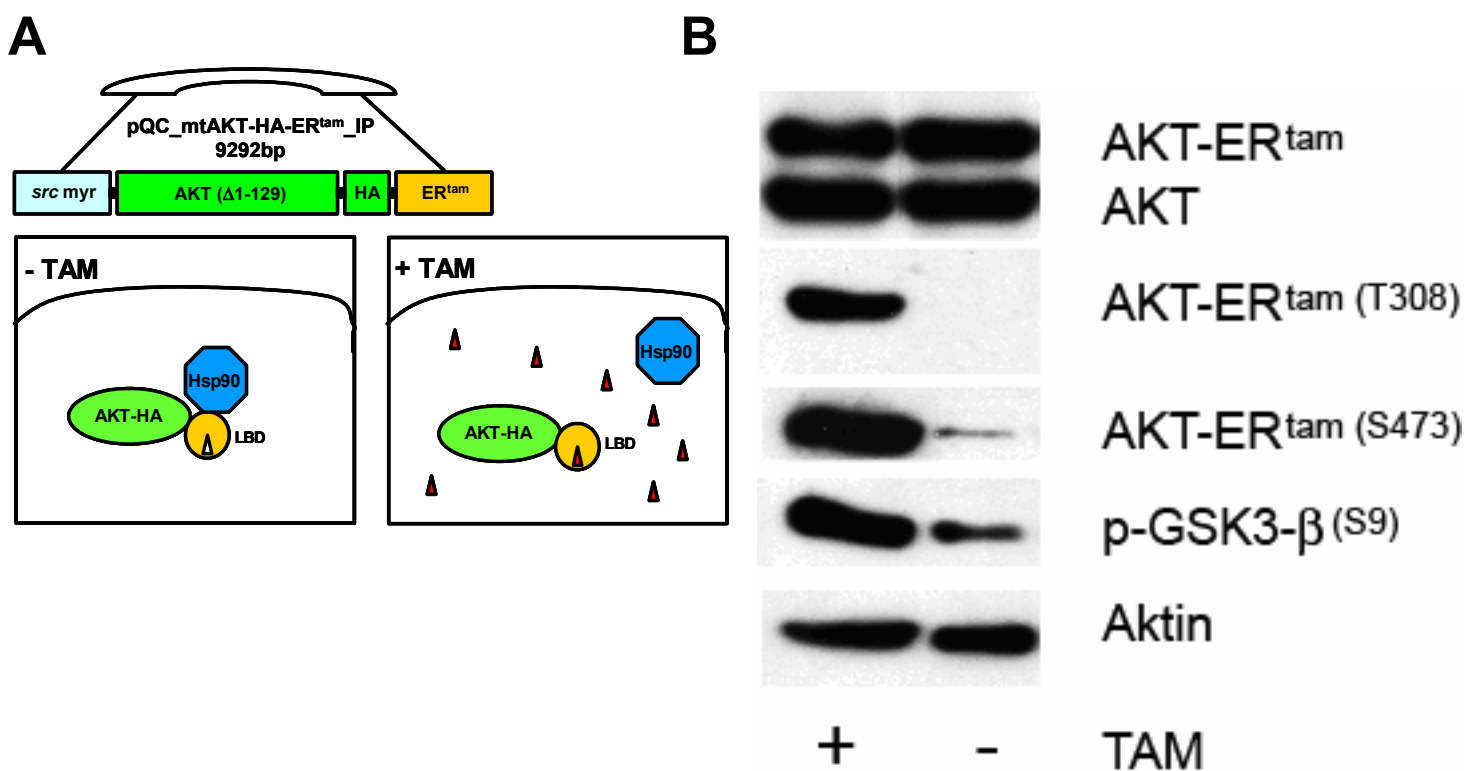


Abb. 3.2.:

A) Schematische Darstellung des PKB/Akt-ER^{tam}-Fusionsproteins sowie des konditional induzierbaren Expressionssystems.

Das Fusionsprotein PKB/Akt-ER^{tam} liegt in komplexierter Form in der Zelle vor. Nach Addition des Liganden Tamoxifen bindet dieser an den Östrogen-Rezeptor. Damit einher geht eine Konformationsänderung, welche eine Aktivierung des Fusionsproteins über membranassoziierte Kinasen ermöglicht.

B) Verifikation des konditionalen Expressionssystems *in vitro*.

Immunoblotnachweis des Fusionsproteins PKB/Akt-ER^{tam} mit und ohne Tamoxifen-Aktivierung (0,1 μM) sowie der Aktivierung des PKB/Akt-Signalweges. In induzierter Form kann eine Phosphorylierung des Fusionsproteins an Threonin 308- sowie Serin 473-entsprechenden Aminosäuren nachgewiesen werden. Ebenso zeigt sich eine Phosphorylierung des PKB/Akt-Substrates GSK-3β.

3.2. Kinetik zur Aktivierung des konditionalen Expressionssystems *in vitro*

Um die Kinetik der Aktivierung des Konstruktes nach Zugabe von Tamoxifen zu ermitteln, wurde Tamoxifen zu verschiedenen Zeitpunkten in die Zellkultur gegeben und nach Addition von Tamoxifen bzw. Trägersubstanz Zellextrakte hergestellt und mittels Immunoblot untersucht (Abb. 3.3.). Nach Addition von Tamoxifen konnte bereits nach 15 bis 30 min für das Fusionsprotein an beiden relevanten, den Aminosäuren Threonin 308 und Serin 473 entsprechenden Phosphorylierungsstellen eine zeitabhängige Phosphorylierung festgestellt werden. Eine Sättigung war 60 min erreicht. In den uninduzierten Zellextrakten blieb die Phosphorylierung aus.

Die Funktionalität ließ sich durch Phosphorylierung des PKB/Akt-Substrates GSK-3 β ebenfalls schon nach 15 bis 30 min nachweisen.

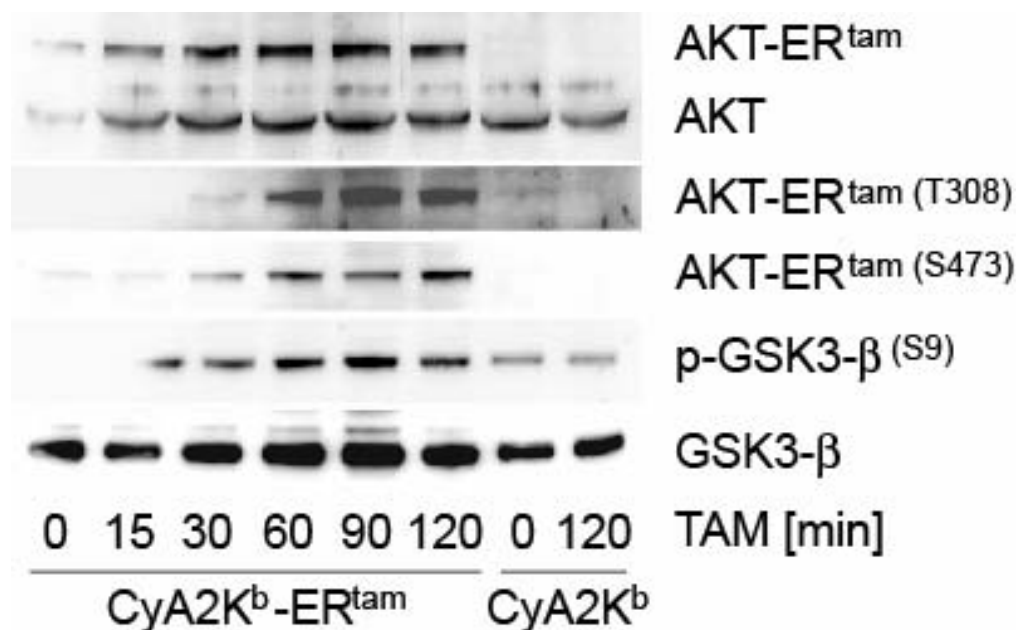


Abb. 3.3.: Kinetik zur Aktivierung des Fusionsproteins PKB/Akt-ER^{tam} nach Zugabe von Tamoxifen (TAM).

Immunoblotanalyse von PKB/Akt-ER^{tam}-exprimierenden Fibroblasten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von Tamoxifen. Die Phosphoepitope der PKB/Akt-ER^{tam} geben Aufschluss über den Aktivierungszustand des Fusionsproteins. Nach ca. 60 min ist eine maximale Aktivierung des Fusionsproteins und des entsprechenden Signalweges erreicht (gezeigt durch Phosphorylierung der GSK-3 β). In der parentalen Zelllinie kann keine Tamoxifen-abhängige Aktivierung des Signalweges aufgrund des Fehlens des Fusionsproteins nachgewiesen werden.

Um Sicherzustellen, dass die beobachteten Phosphorylierungen in der Tat eine auf eine katalytische Aktivität des Fusionsproteins hinweisen, wurde ein zellfreier Kinase-Assay durchgeführt (Vgl. 2.2.27.). Hierfür wurde PKB/Akt-ER^{tam} mittels einem gegen Akt gerichtetem Antikörper immunpräzipitiert, das Präzipitat mit einem rekombinanten Substrat (Paramyosin-GSK3- α/β) in Anwesenheit von ATP *in vitro* inkubiert und anschließend über Immunoblot der Phosphorylierungsstatus des Paramyosin-GSK3- α/β überprüft (Abb. 3.4.). Hier zeigte sich, dass die Aktivität des PKB/Akt-ER^{tam}-Fusionsproteins über Tamoxifen reguliert wird.

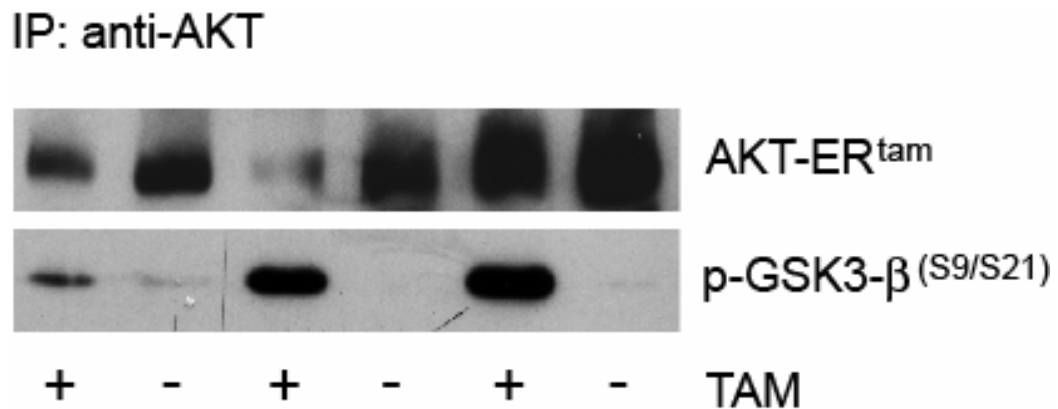


Abb. 3.4.: *in vitro* Kinase Assay mit PKB/Akt-ER^{tam}-Fusionsprotein immunpräzipitiert aus 6 verschiedenen Tumoren.

Tumorextrakte wurden aus 6 Fibrosarkomen gewonnen, wobei drei aus Mäusen entstammten, die mit Tamoxifen behandelt wurde, während drei Tiere Trägersubstanz erhielten. Aus den Extrakten wurde das Fusionsprotein PKB/Akt-ER^{tam} immunpräzipitiert und das so gewonnene Protein mit rekombinanten (Paramyosin-GSK3- α/β) Substrat unter Anwesenheit von ATP inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Proben mittels Immunoblot untersucht. Eine *in vitro*-Phosphorylierung von GSK konnte nur bei Anwesenheit von Tamoxifen nachgewiesen werden.

3.3. Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der mit PKB/Akt-ER^{tam} transduzierten Zellen *in vitro*

Zur weiteren Charakterisierung der HLA-A*0201-transgenen Tumorzellen wurde ein Proliferations-Assay durchgeführt (Vgl. 2.2.28.). Dieser gibt Auskunft über die Stoffwechselaktivität der Zellen und lässt so Rückschlüsse auf das Zellwachstum zu. Es zeigte sich, dass sowohl PKB/Akt-ER^{tam} exprimierende Zellen mit aktivem sowie

inaktivem Fusionsprotein vergleichbar proliferieren (Abb. 3.5.). Somit verschaffte aktive PKB/Akt-ER^{tam} keinen Wachstumsvorteil *in vitro*.

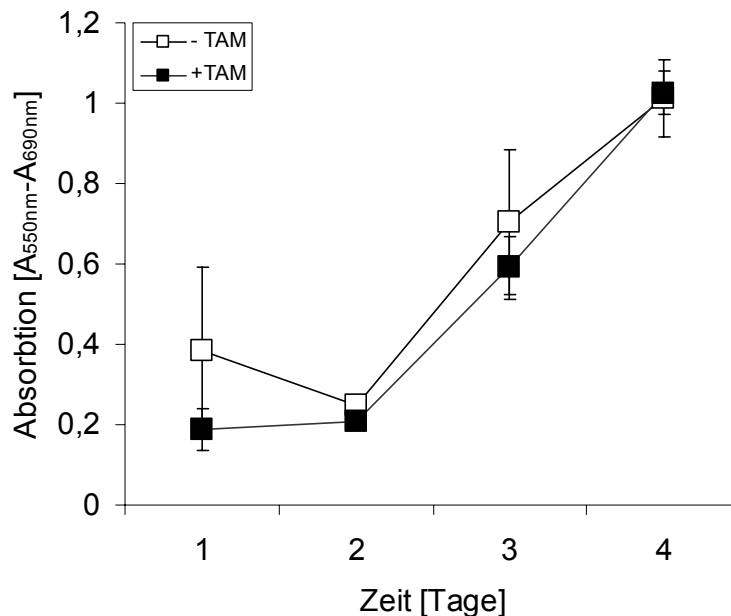


Abb. 3.5.: Wachstumsverhalten der mit PKB/Akt-ER^{tam} transduzierten HLA-A*0201-transgenen Fibroblasten *in vitro*.

CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Mef wurden unter Zugabe von Tamoxifen (0,1 μ M) bzw. mit Trägersubstanz kultiviert. Die metabolische Aktivität der Zellen wurde anhand der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen durch Umsetzen eines Farbstoffes verfolgt. Die Aktivität korreliert mit der proliferativen Aktivität der Zellen. Es zeigte sich, dass der Aktivitätsstatus der PKB/Akt-ER^{tam} keinen Einfluss auf die Zellproliferation der Fibroblasten nahm. (Mittelwerte aus Triplets \pm SD)

3.4. Etablierung eines HLA-A*0201-transgenen Tumormodells mit CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Mef *in vivo*

Um die Rolle PKB/Akt in einem relevanten Modell *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Tumormodell mit den HLA-A*0201-transgenen, PKB/Akt-ER^{tam} exprimierenden murinen Fibrosarkomen etabliert (Vgl. 2.2.23.).

Es wurden je 4 subletal bestrahlten NOD/SCID-Mäusen verschiedene Zellzahlen an CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Mef s.c. injiziert und der Verlauf des Tumorwachstums überprüft. Bei 100% der Tiere kam es zur Ausbildung eines palpablen Flankentumors (Abb. 3.6.). Der Versuchsverlauf zeigte, dass bei einer Zellzahl von 10^6 ein exponentielles Tumorwachstum auftrat, das binnen weniger Tage einen Versuchsabbruch nötig machte. Bei den Zellzahlen von $1 \cdot 10^6$ bzw. $5 \cdot 10^6$ zeigte sich eine mäßige Tumorprogression, wobei sich der Tumorverlauf bei beiden Zellzahlen nicht deutlich unterschied (Abb. 3.6.). Anhand der vorliegenden Daten wurde für nachfolgende Versuche eine Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Maus und Tumor gewählt.

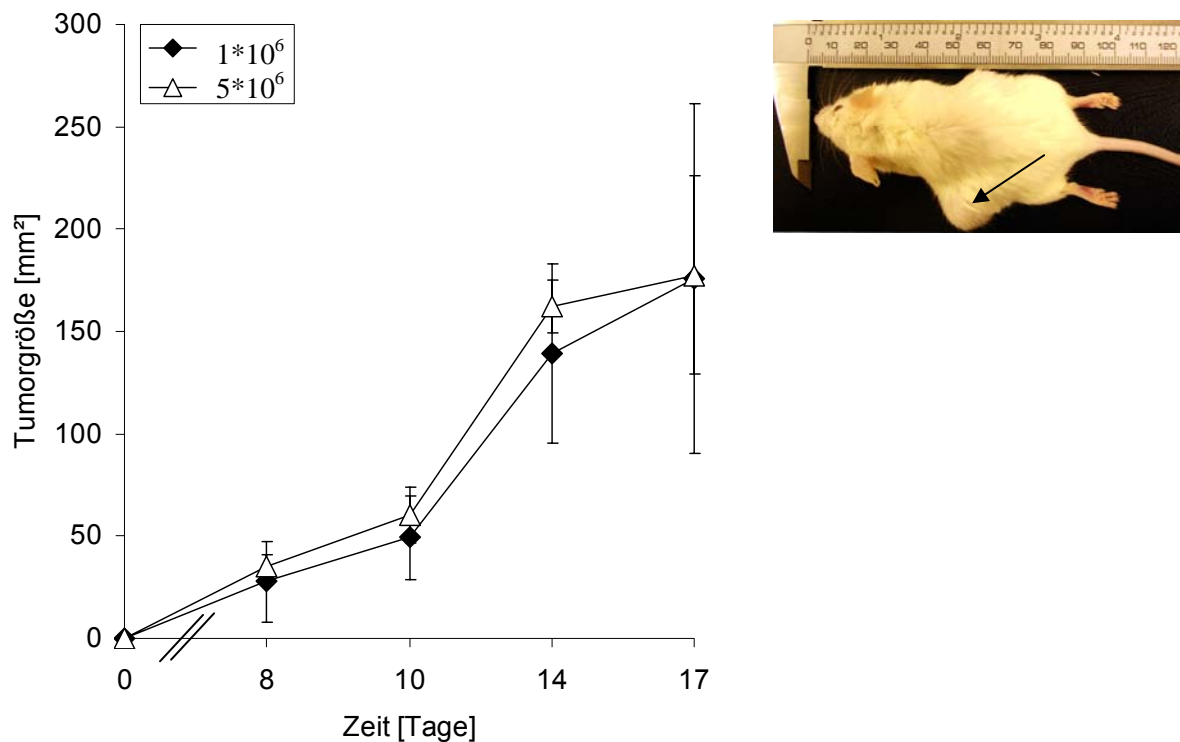


Abb. 3.6.: Etablierung eines HLA-A*0201-transgenen murinen Tumormodells.

CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Mef wurden in verschiedenen Zellzahlen s.c. subletal bestrahlten (1,5 Gy) NOD/SCID-Mäusen in die Flanke gespritzt. Nach Ausbildung eines tastbaren Flankentumors wurde der Tumorverlauf durch bidimensionales Messen aufgenommen. Bei einer eingesetzten Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ Zellen (schwarze Rauten) zeigte sich ein mäßiger Tumorverlauf, der sich nicht signifikant vom Tumorverlauf bei einer Zellzahl von $5 \cdot 10^6$ Zellen (weiße Dreiecke) unterschied. (mittlere Tumorgröße \pm SD; n=4 je Gruppe)

Um zu überprüfen, ob aktives PKB/Akt den Tumoren einen Wachstumsvorteil *in vivo* verschafft, wurde das Tumorstadium in mit Tamoxifen oder Vehikel behandelten Mäusen über einen Zeitraum von 22 Tagen verglichen. Es zeigte sich, dass eine Aktivierung des PKB/Akt-ER^{tam}-Fusionsproteins den Tumoren keinen Wachstumsvorteil erbrachte (Abb. 3.7.).

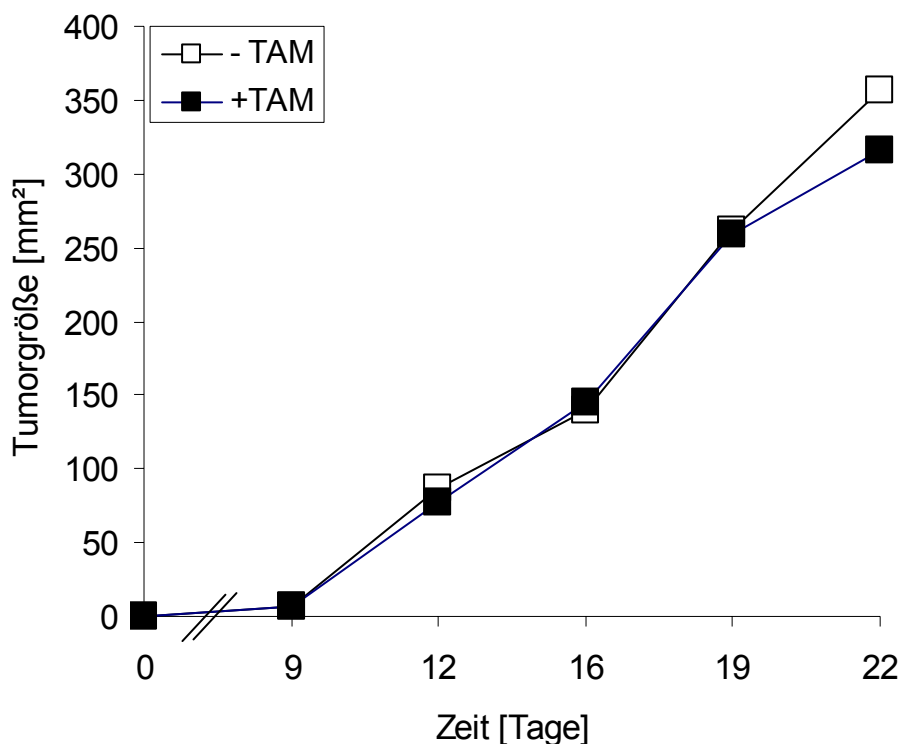


Abb. 3.7.: Wachstumsverhalten der mit PKB/Akt-ER^{tam} transduzierten HLA-A*0201-transgenen Fibroblasten *in vivo*.

Die konditionale Aktivierung des Fusionsproteins PKB/Akt-ER^{tam} durch tägliche interperitoneale Injektionen von Tamoxifen hatte keinen Einfluss auf das Tumorstadium der HLA-A*0201-transgenen Fibrosarkome *in vivo*. Das Tumorstadium der mit Tamoxifen-behandelten Tieren (schwarze Quadrate) entspricht dem der mit Trägersubstanz behandelten Kontrollgruppe (weiße Quadrate). (mittlere Tumorstadium; n=2 je Gruppe)

3.5. Validierung der Funktionalität des konditionalen Expressionssystems *in vivo*

Im Weiteren wurden Tieren mit Tamoxifen-Applikation bzw. Tieren aus der Kontrollgruppe Tumore explantiert und mittels Immunoblot untersucht. Die Expression des Fusionsproteins sowie die Tamoxifen-abhängige Phosphorylierung der Phosphoepitope des PKB/Akt-Substrates GSK-3 β konnten auch *ex vivo* bestätigt werden.

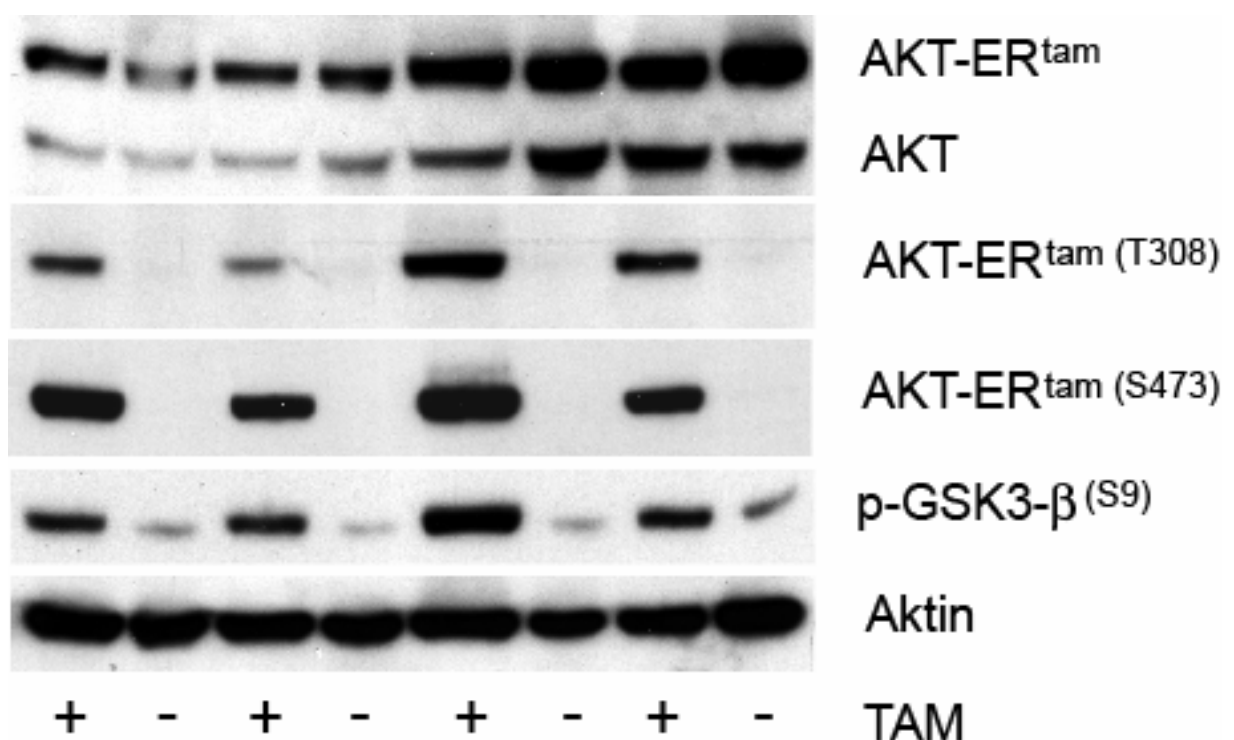


Abb. 3.8.: Verifikation des konditionalen Expressionssystems *in vivo*.

Analyse von 8 Tumorlysaten, die aus 8 unterschiedlichen CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Fibrosarkomen gewonnen wurden. Immunoblotnachweis des Fusionsproteins PBK/Akt-ER^{tam} in allen Tumoren sowie Aktivierung des PKB/Akt-Signalweges in Tumoren, die aus mit Tamoxifen behandelten Mäusen (1 mg/24 h pro Maus) explantiert wurden. In induzierter Form konnte eine Phosphorylierung des Fusionsproteins an Threonin 308 sowie Serin 473 nachgewiesen werden, ebenso wie eine Phosphorylierung des PKB-Substrates GSK-3 β .

3.6. Untersuchungen zur Hemmung von Apoptose durch konditional aktivierte PKB/Akt *in vitro*

3.6.1. Hemmung Staurosporin-induzierter Apoptose durch konditional aktivierte PKB/Akt-ER^{tam}

Eine der Funktionen von PKB/Akt ist die Hemmung des apoptotischen Zelltodes. Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Fusionsprotein funktionell ist, den Zellen *in vitro* wie *in vivo* jedoch keinen Wachstumsvorteil erbrachte, wurde untersucht, ob aktive PKB/Akt Resistenz gegenüber Apoptosestimuli vermittelt. Hierfür wurden die Zellen mit dem Kinaseinhibitor Staurosporin (STS) in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Staurosporin ist ein Alkaloid, das in Zellen über Inhibition von Proteinkinasen Apoptose auslöst (Swannie and Kaye, 2002). Die Zellen mit aktiver bzw. inaktiver PKB/Akt wurden mit 3 verschiedenen Dosen (15,625 nM – 31,25 nM – 62,5 nM) STS für 24 h behandelt und die Fraktion der Zellen mit erhaltenem mitochondrialen Transmembranpotential (TMRE-Färbung (Vgl. 2.2.17.1.)) bzw. mit fragmentierter DNA (PI-Färbung (Vgl. 2.2.17.2.)) durchflusszytometrisch bestimmt. Mit STS-behandelte CyAK^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Mef zeigten einen gegenüber der Kontrolle erhöhten Anteil an Zellen mit fragmentierter DNA bzw. Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials. Der Anteil an apoptotischen Zellen war abhängig von der STS-Konzentration titrierbar.

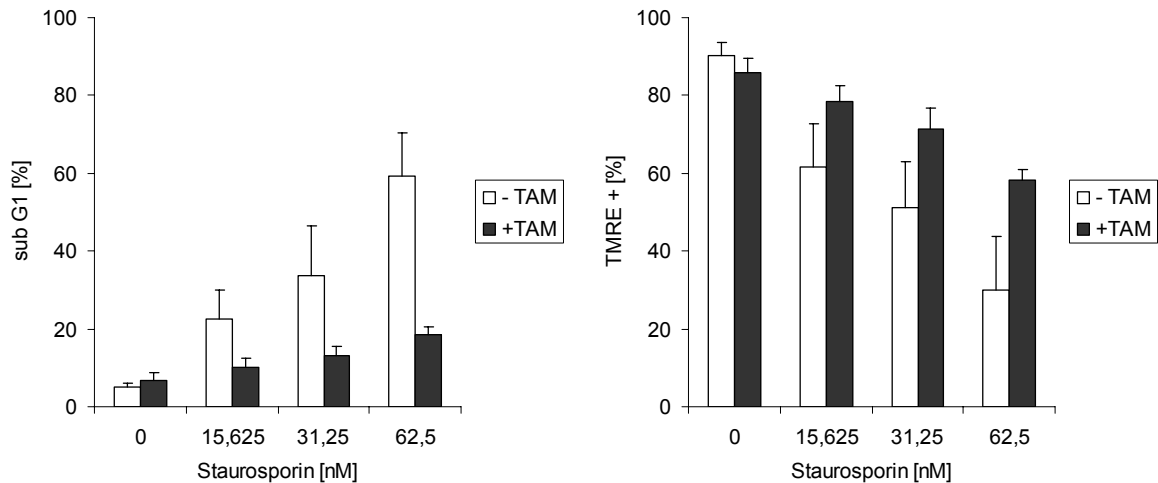


Abb. 3.9.: Konditionale Aktivierung von PKB/Akt-ER^{tam} hemmt vor Staurosporin-induzierter Apoptose.

CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Mef wurden in Anwesenheit (schwarze Balken) oder Abwesenheit (weiße Balken) von Tamoxifen (0,1 μ M) für 24 h mit verschiedenen Dosen des Proteinkinaseinhibitors Staurosporin (STS) behandelt. Der Anteil apoptotischen Zellen mit subgenomischer DNA wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Zellen mit erhaltenem mitochondrialen Transmembranpotential wurden mittels TMRE-Färbung durchflusszytometrisch detektiert. Es zeigte sich, dass konditionale Aktivierung des PKB/Akt-Signalweges vor Staurosporin-induzierter Apoptose schützt und dieser Schutz auf der Ebene der Mitochondrien oder darüber vermittelt wird. (Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD)

PKB/Akt-ER^{tam} vermittelte einen Schutz gegenüber STS-induzierter Apoptose auf der Ebene der mitochondrialen Membran (Abb. 3.9.). Dies konnte durch weitere Versuche bestätigt werden, in denen eine gleichzeitige Expression des anti-apoptotischen BCL-2-Proteins BCL-x_L, welches einer Permeabilisierung der mitochondrialen Membran entgegen wirkt (Vgl. 1.1.4.), keinen weiteren Schutz der Tumorzellen gegenüber Apoptosestimuli vermittelte, wenn PKB/Akt-ER^{tam} aktiv war (Abb. 3.10.).

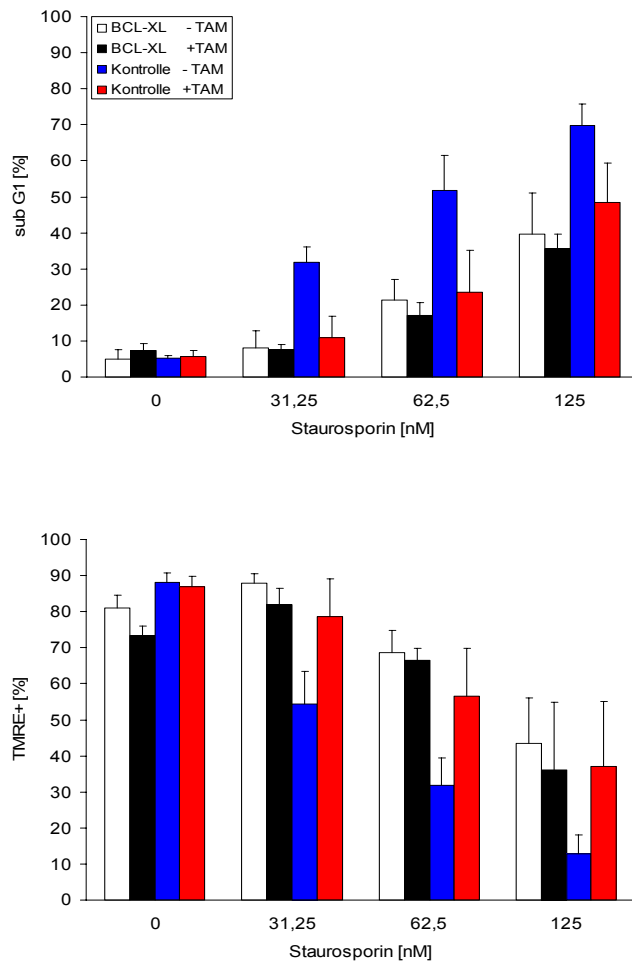


Abb. 3.10.: Analyse des von PKB/Akt vermittelten Schutzes im Vergleich zu BCL-x_L.

CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Mef wurden retroviral mit BCL-x_L (weiße und schwarze Balken) bzw. einem Kontrollvektor transduziert (blaue und rote Balken). Anschließend wurden die Zellen mit dem Kinaseinhibitor Staurosporin in Gegenwart (schwarze und rote Balken) oder Abwesenheit (weiße und blaue Balken) von Tamoxifen behandelt. Nach einer Inkubation von 24 h mit verschiedenen Dosen an Staurosporin wurde der Anteil der apoptotischen Zellen durch Bestimmung des sub G1-Anteils im Durchflusszytometer bestimmt. Parallel dazu wurde das mitochondriale Membranpotential $\Delta\psi_m$ mittels TMRE-Färbung bestimmt.

Konditionale Aktivierung von PKB/Akt vermittelte den Zellen keinen weiteren Schutz bei Expression von BCL-x_L. (Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD)

3.6.2. Hemmung UV-induzierter Apoptose durch konditional aktivierte PKB/Akt-ER^{tam}

Durch UV-Bestrahlung werden in Zellen DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche verursacht, welche über den intrinsischen Signalweg Apoptose auslösen (Vgl. 1.1.4./2.2.20.). Um zu untersuchen, wie aktive PKB/Akt auf die Vorgänge in der Zelle bei DNA-Schädigung wirkt, wurden Zellen im induzierten bzw. im uninduzierten Zustand mit verschiedenen Dosen an UV bestrahlt und 24 h nach Bestrahlung das mitochondriale Membranpotential bzw. der Anteil an apoptotischen Zellen durch Bestimmung der sub G1-Fraktion bestimmt (Abb. 3.11.). Bei ansteigender UV-Dosis nahm der Anteil an apoptotischen Zellen zu, damit einher ging der Verlust des

mitochondrialen Membranpotentials. In Proben mit aktiviertem Fusionsprotein war der Anteil an geschädigten Zellen im Vergleich zu den uninduzierten Proben geringer, im Weiteren stieg der Anteil der sub G1-Zellfraktion bzw. der Verlust des Membranpotentials mit ansteigenden UV-Dosen nicht in dem Masse an wie bei den uninduzierten Proben.

Konditional aktive PKB/Akt hemmt den Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials und schützt vor UV-induzierter Apoptose.

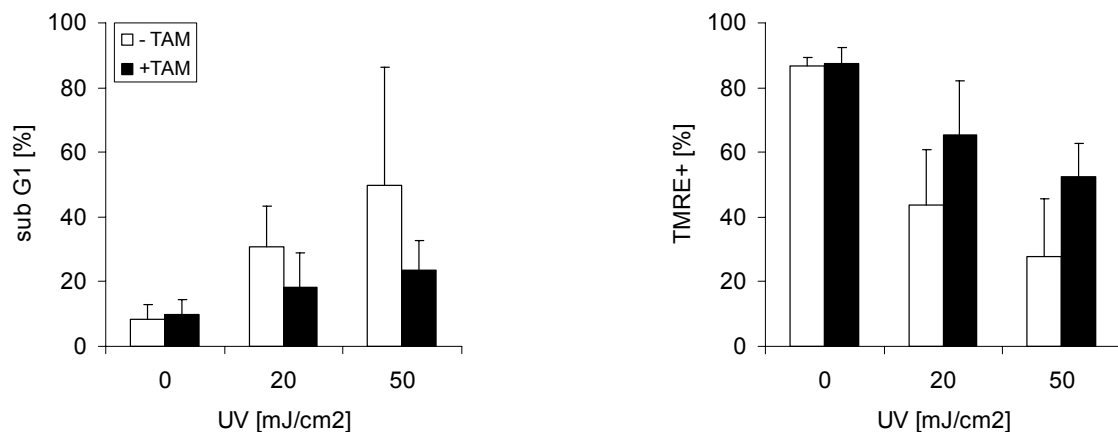


Abb. 3.11.: Konditionale Aktivierung von PKB/Akt-ER^{tam} hemmt vor UV-induzierter Apoptose.

CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Mef wurden in Anwesenheit (schwarze Balken) oder Abwesenheit (weiße Balken) von Tamoxifen (0,1 μ M) mit verschiedenen Dosen an UV-C (20 und 50 mJ/cm²) bestrahlt. 24 h später wurde der Anteil apoptotischen Zellen mit subgenomischer DNA durchflusszytometrisch bestimmt. Zellen mit erhaltenem mitochondrialen Transmembranpotential wurden mittels TMRE-Färbung durchflusszytometrisch detektiert. Es zeigte sich, dass konditionale Aktivierung des PKB/Akt-Signalweges vor UV-induzierter Apoptose schützt und dieser Schutz auf der Ebene der Mitochondrien oder darüber vermittelt wird. (Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD)

3.7. Einfluss konditional aktivierter PKB/Akt-ER^{tam} auf die Hemmung der durch HLA-A*0201-restringierten murinen ZTL vermittelten Wachstumshemmung *in vitro*

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die konditional aktive Mutante der PKB/Akt gegenüber Apoptosestimuli, die den intrinsischen Signalweg des programmierten

Zelltodes aktivieren (Vgl. 1.1.4.), Resistenz vermittelt. Im Weiteren sollte untersucht werden, ob dieser Resistenzmechanismus auch gegenüber ZTL-vermittelter Zytotoxizität schützt. Hierzu wurden CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam} mit Tam-aktiviertem sowie inaktivem PKB/Akt-ER^{tam}-Fusionsprotein mit alloreaktiven T-Zellen gegen HLA-A*0201 in verschiedenen Effektor- zu Zielzell-Verhältnissen kokultiviert. Nach einer fünfstündigen Kokultur wurden die Zellen bei niedriger Dichte ausgesät, um das klonogene Überleben im Langzeitkulturversuch zu überprüfen (Abb. 3.12.).

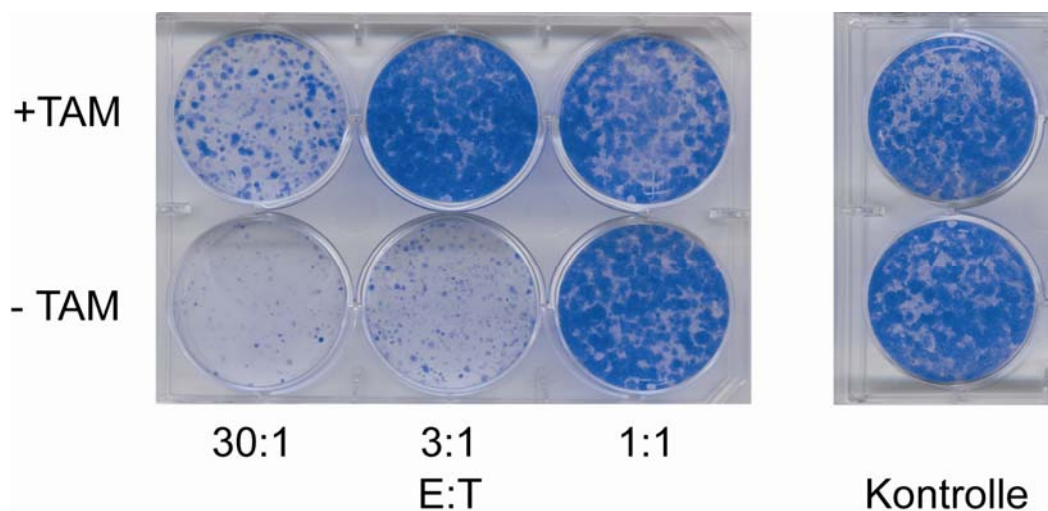


Abb. 3.12.: Konditionale Aktivierung von PKB/Akt schützt vor ZTL-induzierter Proliferationshemmung.

CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Mef wurden mit alloreaktiven T-Zellen in verschiedenen Effektor-zu-Zielzell-Verhältnissen für 5 h kokultiviert. Nach Kokultur wurde das klonogene Überleben der Zielzellen in der Langzeitkultur untersucht. Es zeigte sich, dass Zellen die während der Kokultur über konditional aktives PKB/Akt verfügten, gegenüber der ZTL-induzierter Zytotoxizität geschützt waren. Die Kontrolle wurde analog jedoch ohne ZTL-Kokultur behandelt. (dargestellt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten)

Hierbei ließ sich in verschiedenen E:T-Ratios ein Schutz durch konditional aktivierte PKB/Akt-ER^{tam} nachweisen.

Um zu überprüfen, ob PKB/Akt ebenfalls einen Schutz gegenüber ZTL-induzierter Zytotoxizität vermittelt, wurden ^{51}Cr -markierte $\text{CyA2K}^b\text{-PKB/Akt-ER}^{\text{tam}}$ -Mef (Vgl. 2.2.22.) mit aktivem bzw. inaktivem PKB/Akt- ER^{tam} -Fusionsprotein mit alloreaktiven T-Zellen für 5 ½ h in verschiedenen Effektor zu Zielzell-Verhältnissen kokultiviert. Nach erfolgter Inkubation wurde die spezifische Lyse anhand der in den Zellüberstand freigesetzten Radioaktivität berechnet. Als Kontrolle wurde eine gegen ein HLA-A*0201-restringiertes Epitop des Influenza-Matrizproteins 58-66 gerichtete Effektorpopulation verwendet.

Auch hier fand sich eine signifikante Hemmung der spezifischen ZTL-induzierten Zytotoxizität durch konditional aktivierte PKB/Akt- ER^{tam} (Abb. 3.13.).

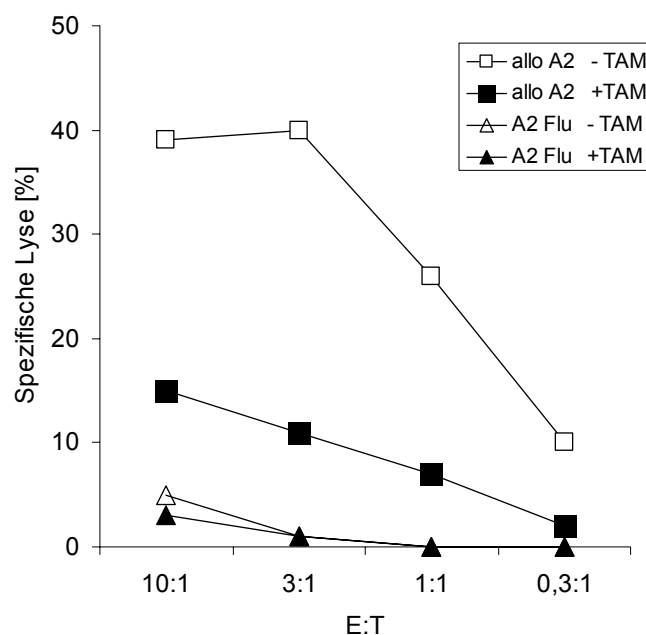


Abb. 3.13.: Konditionale PKB/Akt-Aktivierung schützt vor alloreativer ZTL-vermittelter Zytotoxizität im ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay.

Allo-A2K^b-reaktive T-Zellen wurden mit $\text{CyA2K}^b\text{-PKB/Akt-ER}^{\text{tam}}$ -Mef in verschiedenen E:T-Verhältnissen kokultiviert. Bei konditionaler Aktivierung des Fusionsproteins PKB/Akt- ER^{tam} war die spezifische Lyse durch die T-Zellen signifikant erniedrigt (schwarze Quadrate) verglichen mit Proben ohne Aktivierung des Fusionsproteins (weiße Quadrate). T-Zellen mit einer Reaktivität gegen ein HLA-A*0201-restringiertes Epitop des Influenza-Matrizproteins 58-66 dienen als Spezifitätskontrolle (schwarze und weiße Dreiecke). (dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen)

Dieser PKB/Akt-vermittelte Schutz war nicht auf alloreaktive ZTL beschränkt, sondern bestätigte sich ebenfalls in Versuchen mit einer gegen ein HLA-A*0201-restringierten p53-Epitop (264-272) gerichteten Effektorpopulation und peptidbeladenen Zielzellen (Abb. 3.14.).

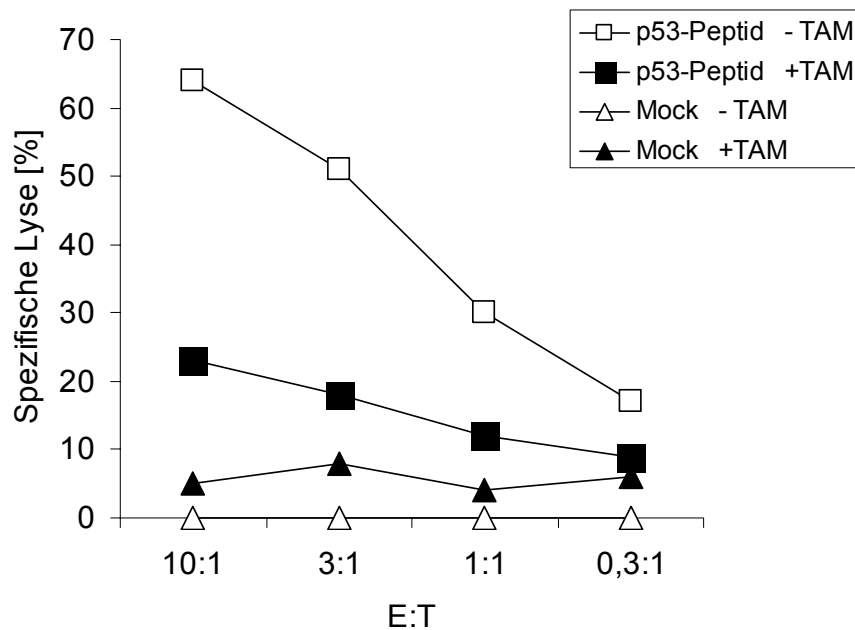


Abb. 3.14.: Konditional aktive PKB/Akt-ER^{tam} schützt gegenüber Zytotoxizität von HLA-A*0201-restringierten, p53-spezifischen ZTL.

CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Mef wurden mit humanem p53 Peptid 264-272 beladen und anschließend im ⁵¹Chrom-Freisetzung-Assay mit HLA-A*0201-restringierten, p53-spezifischen T-Zellen in verschiedenen E:T-Verhältnissen kokultiviert. Bei konditionaler Aktivierung des Fusionsproteins PKB/Akt-ER^{tam} (schwarze Quadrate) war die spezifische Lyse durch die T-Zellen signifikant niedriger verglichen mit Proben ohne Aktivierung des Fusionsproteins (weiße Quadrate). Peptid-unbeladene Fibroblasten dienen als Kontrolle und wurden nicht lysiert (schwarze und weiße Dreiecke). (dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen)

Um zu überprüfen, ob die PKB/Akt-ER^{tam} vermittelte Protektion gegenüber ZTL analog der Behandlung mit STS und UV auch auf der Ebene der Mitochondrien in die apoptotische Signaltransduktion eingreift, wurden CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Mef mit Effektorzellen für fünf Stunden kokultiviert und anschließend mit dem mitochondrialen Marker TMRE rot-fluoreszierend gefärbt. Um die beiden Zellpopulationen der Mischkultur während der durchflusszytometrischen Messung differenzieren zu können, wurden die CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Mef mit dem grün-fluoreszierenden Farbstoff CFDA gefärbt (Vgl. 2.2.18). Im Kontrollansatz konnten die Zielzellen als doppelt positive Zellen erkannt werden, die über ein intaktes Membranpotential verfügten. Bei Zugabe von alloreaktiven T-Zellen, zeigte sich ein Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$. Dieser Effekt der T-Zellen wurde durch Zugabe von Tamoxifen aufgehoben und die Zielzellen behielten die Integrität der äußeren mitochondrialen Membran (Abb. 3.15).

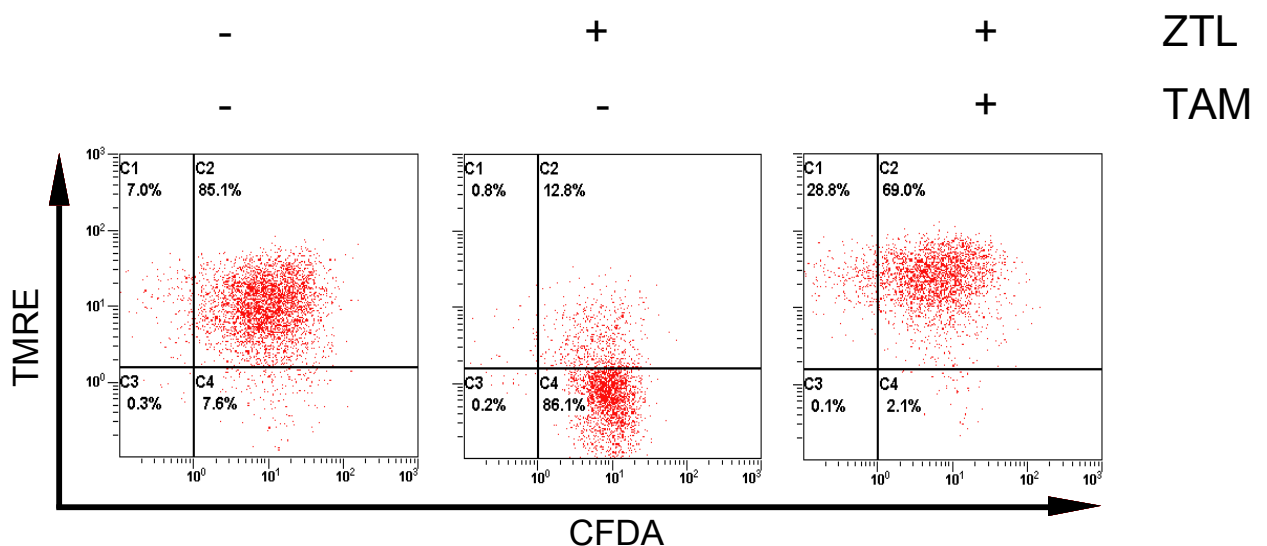


Abb. 3.15.: Konditionale Aktivierung des PKB/Akt-Signalweges schützt maligne Zellen gegenüber ZTL-induziertem Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials $\Delta\psi_m$.

Durchflusszytometrischer Nachweis des erhaltenen mitochondrialen Transmembranpotentials $\Delta\psi_m$ mittels TMRE-Färbung von CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Mef nach Kokultur mit alloreaktiven T-Zellen. Zur Identifikation der Zielzellen wurden diese vor Kokultur mit dem grünfluoreszierenden Farbstoff CFDA markiert. Die Kontrolle ohne T-Zellen ist als doppelt-positive Population im Dotplot erkennbar, in Kokultur mit T-Zellen verlieren die Zielzellen ihr mitochondriales Membranpotential. Ist in den Zielzellen durch Addition von Tamoxifen (0,1 μ M) ins Medium PKB/Akt konditional aktiv, ist die Zytotoxizität der T-Zellen aufgehoben.

3.8. Konditional aktivierte PKB/Akt-ER^{tam} hemmt die Tumorsuppression adoptiv transplantiertes zellulärer Immuneffektoren *in vivo*

Zur Überprüfung, ob diese immunprotektive Wirkung von PKB/Akt-ER^{tam} auch zu einem Schutz von Tumorzellen *in vivo* führt, wurden subletal bestrahlten NOD/SCID-Mäusen s.c. $1 \cdot 10^6$ CyAK^b-PKB/Akt-ER^{tam} appliziert. Nach Etablierung tastbarer Tumore wurde den Tieren jeweils $5 \cdot 10^7$ C57Bl/6-Splenozyten i.v. verabreicht und der Tumorverlauf durch Messen aufgenommen (Abb. 3.16). Dabei zeigte sich, dass konditional aktivierte PKB/Akt-ER^{tam} einen deutlichen Wachstumsvorteil vermittelte. Vor dem Hintergrund des fehlenden Einflusses von PKB/Akt auf das Tumorstadium *in vivo* (Abb. 3.7.), spricht dieses Ergebnis für eine Protektion gegenüber der durch Splenozyten vermittelten Wachstumshemmung.

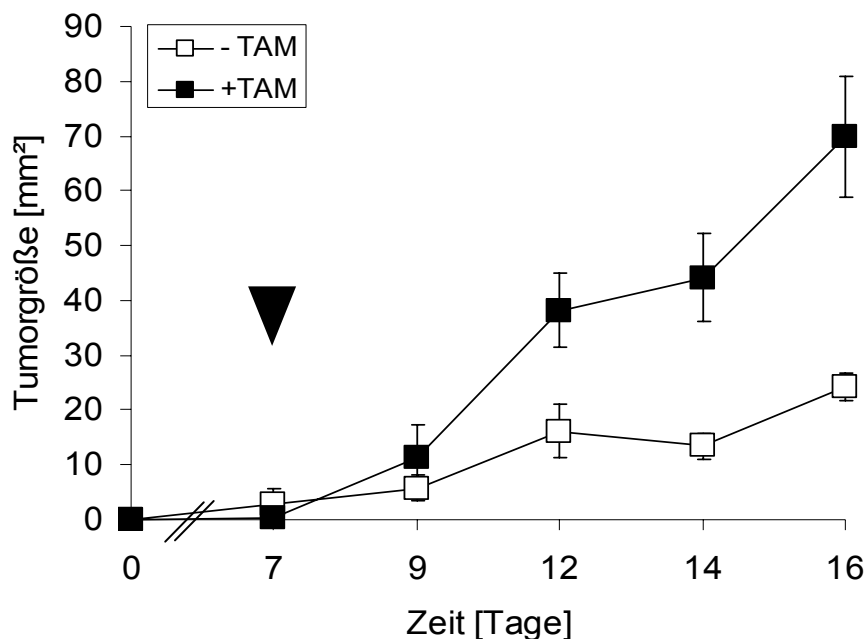


Abb. 3.16.: Konditionale Aktivierung des PKB/Akt-Signalweges schützt gegenüber Tumorsuppression durch transplantierte C57Bl/6- Splenozyten.

CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Mef wurden s.c. subletal bestrahlten (1,5 Gy) NOD/SCID-Mäusen in die Flanke gespritzt. Nach Ausbildung eines palpablen Flankentumors wurde den Tieren an Tag 7 $5 \cdot 10^7$ unbehandelte Splenozyten aus C57Bl/6-Mäusen i.v. appliziert (schwarzer Pfeil) und der weitere Tumorverlauf aufgenommen. Eine Gruppe verfügte durch interperitoneale Tamoxifen-Gabe über konditional aktives PKB/Akt-ER^{tam}, in der zweiten Gruppe war das Fusionsprotein inaktiv. Die transplantierten Immunzellen vermittelten eine Tumorsuppression (weiße Quadrate), dieser Effekt wurde durch konditional aktive PKB/Akt allerdings aufgehoben (schwarze Quadrate). (mittlere Tumorgöße \pm SD; n=4 je Gruppe)

3.9. Identifikation und Charakterisierung der Effektorpopulation *in vivo*

Zur näheren Charakterisierung der Effektorpopulation, die für den *in vivo* beobachteten Effekt der Tumorsuppression verantwortlich ist, wurden verschiedene Faktoren, die bei der Signalweiterleitung der extrinsisch bzw. über Perforin/Granzym B-vermittelten Apoptose eine tragende Rolle spielen, systematisch untersucht.

Um die Rolle der über Todesrezeptor- und Liganden-Interaktion (z.B. FasL, TRAIL) vermittelte Apoptose (Vgl. 1.1.2.) zu untersuchen, wurden die Zellen CyAK^b-PKB/Akt-ER^{tam} mit dominant negativen FADD (*dnFADD*) stabil transduziert. Bindet bei diesen Zellen FasL an den Fas-Rezeptor, kommt es zwar zur Rezeptortrimerisierung, allerdings ist die Signalweiterleitung durch das dominant negative FADD unterbrochen, da dieses die Ausbildung eines funktionellen DISC inhibiert.

12 NOD/SCID-Mäusen wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen CyAK^b-PKB/Akt-ER^{tam}-*dnFADD* s.c. gespritzt, wobei 6 Tieren nach Etablierung von tastbaren Tumoren an Tag 6 $5 \cdot 10^7$ Splenozyten aus C57Bl/6-Mäusen i.v. verabreicht und der weitere Tumorverlauf aufgenommen wurden. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einem Kontrollvektor transduziert worden waren. Der tumorsuppressive Effekt der C57Bl/6-Splenozyten war in gleicher Weise in der Kontrollgruppe und in der Versuchsgruppe nachweisbar im Vergleich zur Wachstumskurve ohne Splenozytenbehandlung (Abb. 3.17.).

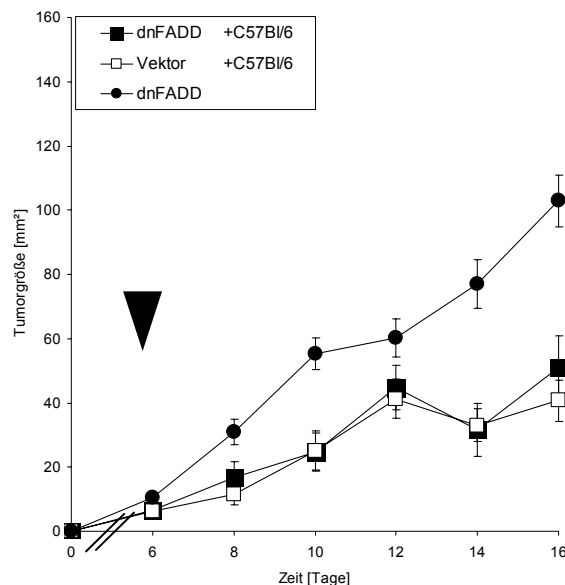


Abb. 3.17.: Die Tumorsuppression der adoptiv transplantierten C57Bl/6-Splenozyten wird nicht über Todesrezeptor-vermittelte Apoptose induziert.

Expression von *dnFADD* in CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Fibrosarkomen hemmt nicht den tumorsuppressiven Effekt der transplantierten C57Bl/6-Splenozyten (schwarze Quadrate). Das Tumorstadium ohne Splenozyten-Behandlung wurde durch die Expression von *dnFADD* nicht inhibiert (schwarze Kreise). (mittlere Tumorstadium \pm SD; n=6 je Gruppe)

Aus diesen Ergebnisse kann man ableiten, dass der Effektormechanismus der Tumorsuppression der Splenozyten nicht über den Todesrezeptor-vermittelten Signalweg der Apoptose abläuft.

In einem weiteren Versuch wurde die Bedeutung von Perforin in dem hier etablierten Modell untersucht. Hierfür wurden der Milzzellen Tiere des Perforin-Knockout-Stammes C57Bl/6-Pfr1 tm1Sdz/J (Vgl. 2.1.14.4.) mit denen von Perforin-profizienten Kontrollen verglichen. Je 5 Tieren wurden nach Etablierung eines tastbaren Tumors $5 \cdot 10^7$ Splenozyten aus C57Bl/6 bzw. C57Bl/6-Pfr1^{-/-} i.v. verabreicht und der weitere Tumorverlauf gemessen (Abb. 3.18. B)). Es war zu beobachten, dass der tumorsuppressive Effekt der Perforin-defizienten Splenozyten deutlich reduziert war. Da sowohl NK-Zellen als auch CD8⁺ T-Zellen in Perforin-abhängiger Weise Apoptose in Zielzellen auslösen, konzentrierten sich weitere Untersuchungen auf diese Zellpopulationen.

In einem weiteren Versuch wurden die Splenozyten vor dem Transfer über magnetische Zellseparation von der Fraktion der CD8⁺-Zellen depletiert (Vgl. 2.2.24.). Die so präparierten Zellen wurden wieder einer Gruppe von 5 Mäusen mit palpablem Tumor verabreicht, der Kontrollgruppe wurden undepletierte Splenozyten appliziert (Abb. 3.18. A)). Die unstimulierten Splenozyten aus C57Bl/6-Mäusen waren in der Lage, das Wachstum der Fibrosarkome signifikant zu hemmen, wogegen dieser Effekt bei den CD8-depletierten Splenozyten aus C57Bl/6-Mäusen aufgehoben war.

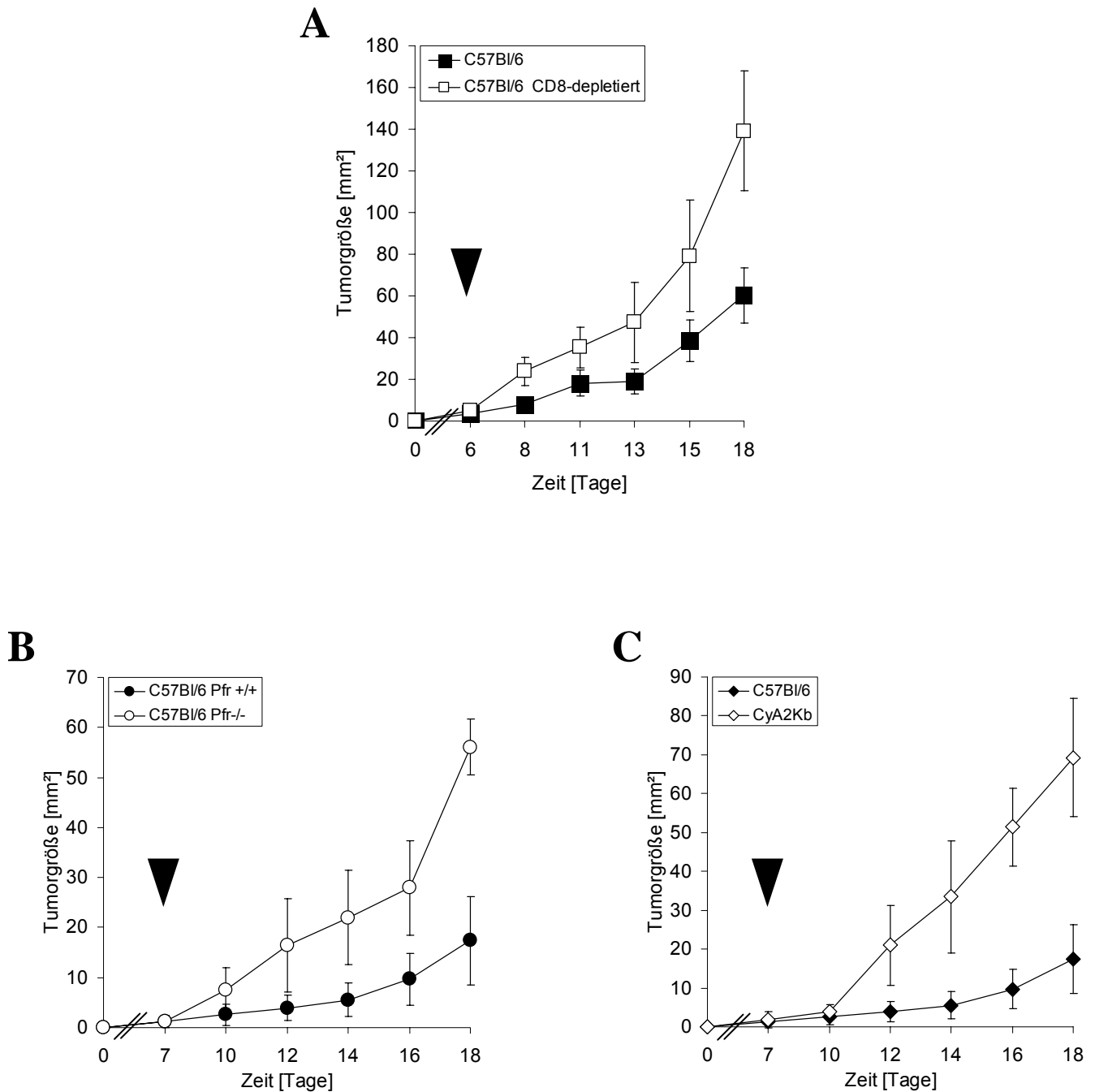


Abb. 3.18.: Untersuchungen zur Charakterisierung der Effektorpopulation *in vivo*.

Nach Aufwachsen tastbarer Flankentumore in subletal bestrahlen NOD/SCID-Mäusen wurden den Tieren unbehandelte Splenozyten aus C57Bl/6-Mäusen transplantiert ($5 \cdot 10^7$ Zellen) (schwarze Symbole, **A-C**). Weiteren Gruppen wurden CD8-depletierte (weiße Quadrate, **A**), Perforin-defiziente (weiße Kreise, **B**) oder HLA-A*0201-tolerante Splenozyten (weiße Rauten, **C**) mit genetischem Hintergrund C57Bl/6 transplantiert. Sowohl CD8-depletierte, als auch Perforin-defiziente Splenozyten waren nicht in der Lage, die Tumorphysion zu inhibieren. Dies trat auch auf bei Applikation von HLA-A*0201-tolerante Splenozyten aus CyA2K^b-Mäusen. Somit wird der Effekt der Tumorsuppression im hier etablierten Modell überwiegend durch CD8-positive alloreaktive Zellen durch einen Perforin-abhängigen Mechanismus vermittelt. (schwarze Pfeile geben den Zeitpunkt des Splenozyten-Transfers an) (mittlere Tumorgöße \pm SD; n=5 je Gruppe)

In einem weiteren Versuch konnte festgestellt werden, dass Splenozyten, die aus HLA-A*0201-transgenen CyA2K^b-Mäusen gewonnen wurden, ebenfalls nicht in der Lage waren, das Wachstum der HLA-A*0201-transgenen Tumore zu supprimieren. Dies weist auf eine Toleranz der Splenozyten aus HLA-A*0201 transgenen C57Bl/6-Mäusen hin (Abb. 3.18. C)).

3.10. Identifikation des molekularen Mechanismus der durch PKB/Akt vermittelten Apoptosehemmung

3.10.1. Charakterisierung des molekularen Mechanismus der durch PKB/Akt vermittelten Immunresistenz

Die vorangegangenen Ergebnisse weisen daraufhin, dass PKB/Akt in diesem Modell nicht durch verstärkte Zellproliferation wirkt, sondern eine Resistenz gegenüber immunologischer Tumorabstossung bedingt.

Die mit den Apoptoseinitiatoren STS und UV sowie mit ZTL *in vitro* gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass PKB/Akt auf der Ebene der Mitochondrien in die apoptotische Signaltransduktion eingreift. Diesen Effekt können anti-apoptotische Proteine der BCL-2-Familie, wie BCL-2, BCL-x_L und MCL-1, ausüben. Um die Expression dieser Proteine in Relation zur Aktivierung von PKB/Akt zu untersuchen, wurden Tumorlysate von Tamoxifen-behandelten Mäusen sowie mit Trägersubstanz-behandelten Mäusen mittels Immunoblot untersucht (Abb. 3.19.). Für die Expressionsstärke von BCL-2 sowie von BCL-x_L konnte keine Regulation durch konditional aktivierte PKB/Akt-ER^{tam} festgestellt werden. Allerdings fand sich eine Aufregulation des anti-apoptotischen Proteins MCL-1 in solchen Tumoren, die aus TAM-behandelten Mäusen gewonnen wurden.

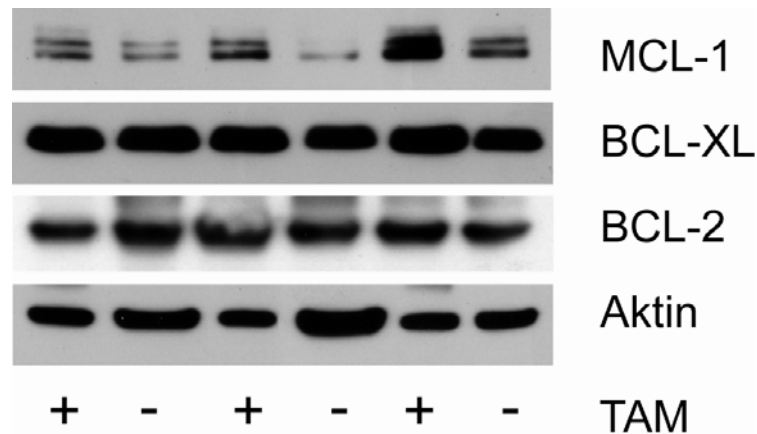


Abb. 3.19.: Immunoblotanalyse der Expression verschiedener anti-apoptotischer Mitglieder der BCL-2-Familie in Tumorlysaten.

Nach Aufwachsen von palpablen Flankentumoren wurden die Tumore explantiert und lysiert. Je drei Lysate aus Mäusen, die mit Tamoxifen (+ TAM) behandelt wurden und drei Lysate der Kontrollgruppe (- TAM) wurden mittels Immunoblot analysiert. Das anti-apoptotische Protein MCL-1 wird bei durch Tamoxifen aktiviertem PKB/Akt-Signalweg aufreguliert. Die Expressionshöhen von BCL-2 und BCL-x_L sind vom Aktivierungsstatus des Fusionsproteins PKB/Akt-ER^{tam} unbeeinflusst. (Aktin dient als Beladungskontrolle.)

3.10.2. Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation anti-apoptotischer Gene der BCL-2-Familie

Um den Mechanismus der Aufregulation von MCL-1 durch PKB/Akt-ER^{tam} zu charakterisieren, wurde in einem ersten Schritt die RNA-Expression überprüft. Dafür wurden die RNA-Expression von BCL-2, BCL-x_L und MCL-1 untersucht. Hierzu wurden die Zellen über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. Hierdurch konnte gewährleistet werden, dass die endogene PKB/Akt aufgrund des fehlenden Wachstumsfaktorsignaling weitestgehend inaktiviert ist (Vgl. 1.2.2.). Durch Zugabe von Tamoxifen in das Nährmedium wurde das Fusionsprotein PKB/Akt-ER^{tam} aktiviert und nach 1, 2, 3 und 24 h nach Zugabe von Tamoxifen die Zellen geerntet und RNA isoliert. Nach Umschreiben der mRNA in cDNA konnte mit Hilfe der qRT-PCR die Expression von MCL-1, BCL-X_L und BCL-2 in Relation zum stabil exprimierten Kontrollgen Aktin untersucht werden (Abb. 3.20.). Es zeigte sich, dass die Aktivierung des Fusionsproteins auf die relative Expression von MCL-1 keinen Einfluss hat. Die gleiche Beobachtung konnte für BCL-x_L und BCL-2 gemacht werden. Somit ist eine transkriptionelle Aufregulation von MCL-1 durch PKB/Akt-ER^{tam} unwahrscheinlich.

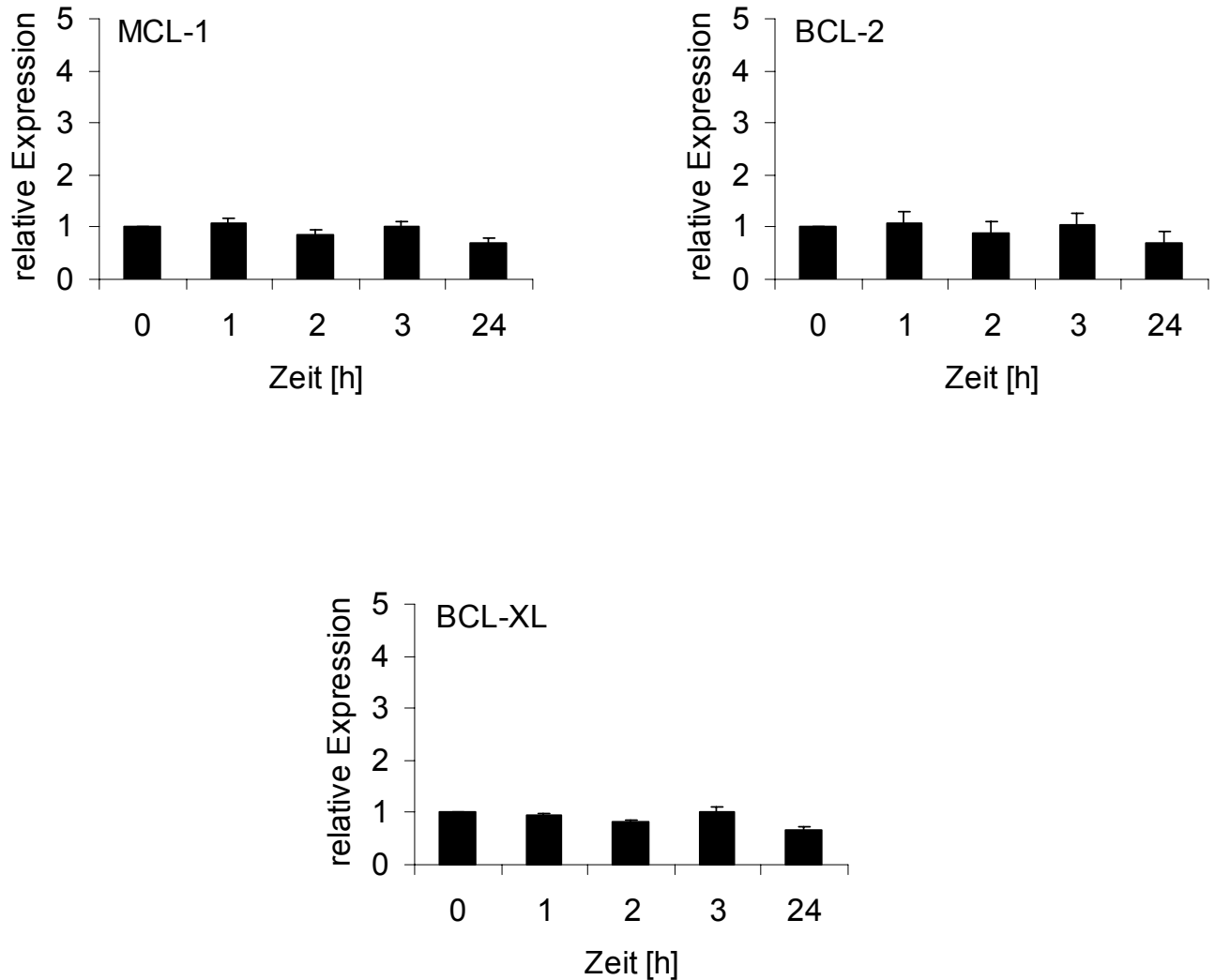


Abb. 3.20.: qRT-PCR-Analyse der RNA-Expression von BCL-2, MCL-1 und BCL-x_L in Abhängigkeit des Aktivierungsstatus von PKB/Akt-ER^{tam}.

Nach Serumentzug über Nacht wurde Tamoxifen (0,1 μ M) in das Nährmedium der CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Mef zugesetzt und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe die RNA-Expressionshöhe für die anti-apoptotischen Proteine BCL-2, MCL-1 und BCL-x_L mittels qRT-PCR bestimmt. Aus den Daten ließ sich ablesen, dass der Aktivierungszustand des Fusionsprotein PKB/Akt-ER^{tam} keinen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation der untersuchten Proteine hat. (Mittelwerte aus Triplets \pm SD)

3.10.3. Untersuchungen zur PKB/Akt-abhängigen post-transkriptionellen Regulation anti-apoptotischer Proteine der BCL-2-Familie

Da die Aufregulation offensichtlich nicht auf eine transkriptionelle Regulation zurückzuführen ist, sollte die Stabilität von MCL-1 auf Proteinebene abhängig vom Aktivierungsstatus der PKB/Akt-ER^{tam} untersucht werden. Hierzu wurden CyAK^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Mef 16,5 h in FKS-freiem Medium mit 0,1 µM Tamoxifen kultiviert. Die Kontrollen erhielten serumfreies Medium mit Trägersubstanz. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen mit Cycloheximid, einem Antibiotikum, welches die Translation eukaryotischer Zellen inhibiert (Obrig et al., 1971), behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten Zellextrakte hergestellt (Abb. 3.21.).

Die Analyse mittels Immunoblot zeigte, dass aktive PKB/AKT-ER^{tam} die Stabilität von MCL-1, jedoch nicht von BCL-2 förderte. Hieraus lässt sich ableiten, dass die erhöhte Expression von MCL-1 durch einen post-transkriptionellen Mechanismus bedingt ist.

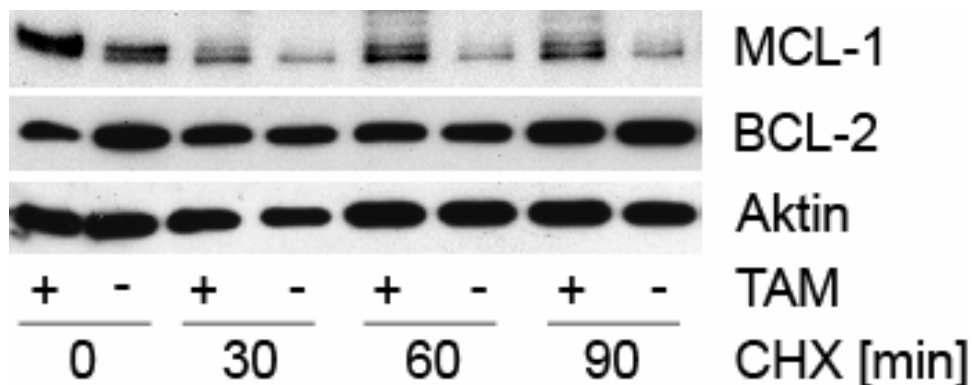


Abb. 3.21.: Immunoblotanalyse zur posttranskriptionellen Stabilisierung von MCL-1 in Abhängigkeit von konditionaler PKB/Akt-Aktivierung.

Nach Serumentzug über Nacht wurde das Fusionsprotein PKB/Akt-ER^{tam} durch Zugabe von Tamoxifen (0,1 µM) aktiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe des Translationshemmers Cycloheximid (CHX) (200 µg/ml) Extrakte aus den Zellen gewonnen. Im Immunoblot zeigte sich eine Stabilisierung des endogenen MCL-1, dies konnte bei BCL-2 nicht beobachtet werden. Konditionale PKB/Akt-Aktivierung stabilisiert somit die Expression des endogenen MCL-1 über einen post-transkriptionellen Mechanismus.

3.10.4. Untersuchungen zur Bedeutung von MCL-1 für die PKB/Akt-abhängige Immunresistenz

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Immunresistenz, die durch aktive PKB/Akt-ER^{tam} hervorgerufen wird, wirklich über MCL-1 vermittelt wird, wurde in CyA2K^b-Mef die endogene MCL-1-Expression unterdrückt. Hierfür wurde in den Zellen gegen MCL-1 gerichtete short-hairpin-RNA (*shRNA*) stabil exprimiert. Es wurden fünf Vektoren mit verschiedenen *shRNA*-Sequenzen überprüft, wobei mit Vektor 2 und 5 eine Repression der endogenen MCL-1-Expression erreicht werden konnte (Abb. 3.22.). Für weitere Versuche wurden CyA2K^b-Mef der Population 2 verwendet, als negative Kontrolle dienten Zellen der Population 3.

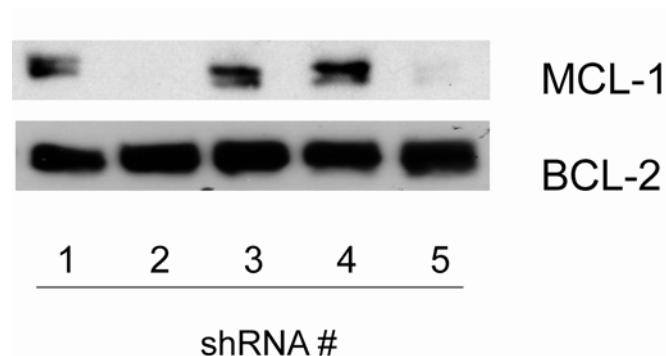


Abb. 3.22.: Immunoblotuntersuchung von CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Mef-Populationen mit Expression verschiedener gegen MCL-1 gerichteter *shRNA*.

Um die Expression des endogenen MCL-1 zu unterdrücken, wurden CyA2K^b-Mef mit fünf verschiedenen *shRNA*-Vektoren gerichtet gegen die murine MCL-1-Sequenz transduziert und mittels Immunoblot die Proteinexpression von endogenem MCL-1 untersucht. Population 2 und 5 exprimierten eine *shRNA*, die das endogene MCL-1 unterdrückt. Für weitere Studien wurde Population 2 verwendet; Population 3 diente als negative Kontrolle. Einen Einfluss der *shRNA* auf andere anti-apoptotische Mitglieder der BCL-2-Familie wurde nicht festgestellt (Vgl. Expression von BCL-2).

Nachdem die Zellpopulationen CyA2K^b-*shRNA*2 und CyA2 K^b-*shRNA*3 zusätzlich mit PKB/Akt-ER^{tam} stabil transduziert worden waren, wurden die die Zellen s.c. subletal bestrahlten NOD/SCID-Mäusen appliziert und den Tieren wiederum nach Aufwachsen eines tastbaren Tumors Splenozyten aus C57Bl/6-Mäusen transplantiert. Eine Gruppe aus je 10 Tieren erhielt Tamoxifen zur Aktivierung des Fusionsproteins PKB/Akt, die Kontrollgruppe bekam die Trägersubstanz verabreicht.

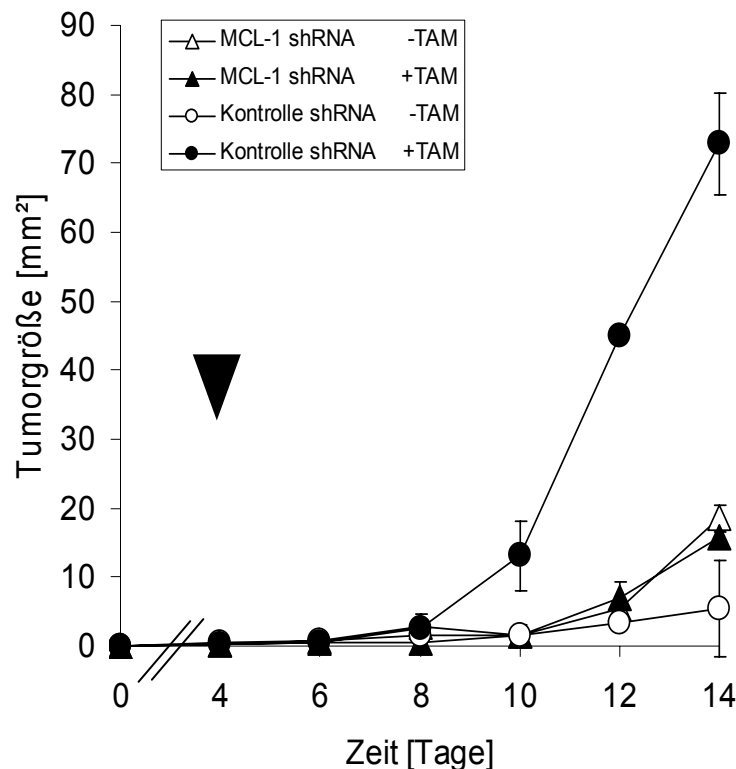


Abb. 3.23.: „Knock down“ der Expression von endogenem MCL-1 mittels shRNA hebt die PKB/Akt-vermittelte Resistenz gegenüber Immunzellen auf.

Tumorstadium von CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Fibrosarkomen mit MCL-1-Repression bzw. Kontrollen. Nach Aufwachen von tastbaren Tumoren wurde den Tieren an Tag 4 Splenozyten aus C57Bl/6-Mäusen transferriert (schwarzer Pfeil). Je eine Versuchsgruppe wurde zur Aktivierung der PKB/Akt-ER^{tam} mit Tamoxifen (1 mg/ 24 h) i.p. behandelt, der Kontrollgruppe wurde Trägersubstanz appliziert. Das Tumorstadium der Kontrollgruppe mit inaktiver PKB/Akt (weiße Kreise) war supprimiert, bei aktiviertem Fusionsprotein war der tumorsuppressive Effekt der Immunzellen aufgehoben (schwarze Kreise). Bei Repression des endogenen MCL-1 ist die Resistenz gegenüber der Tumorsuppression durch die transplantierten Immunzellen ebenfalls aufgehoben (schwarze Dreiecke). (mittlere Tumorstadium \pm SD; n=10 je Gruppe)

Das Tumorstadium wurde über 14 Tage verfolgt (Abb. 3.23.). Bei inhibierter Expression des endogenen MCL-1 war die durch konditional aktivierte PKB/Akt-ER^{tam} vermittelte Resistenz gegenüber transplantierten Immunzellen aufgehoben. In der Vektor-Kontrollgruppe CyA2K^b-shRNA3-PKB/Akt-ER^{tam} blieb der Effekt der Immunresistenz bei Tamoxifen-Gabe erhalten. Die Inhibition der endogenen MCL-1-Expression hatte keinen Einfluss auf das Tumorstadium, wie in einem Kontrollversuch ohne Splenozytentransfer gezeigt werden konnte (Abb. 3.24.).

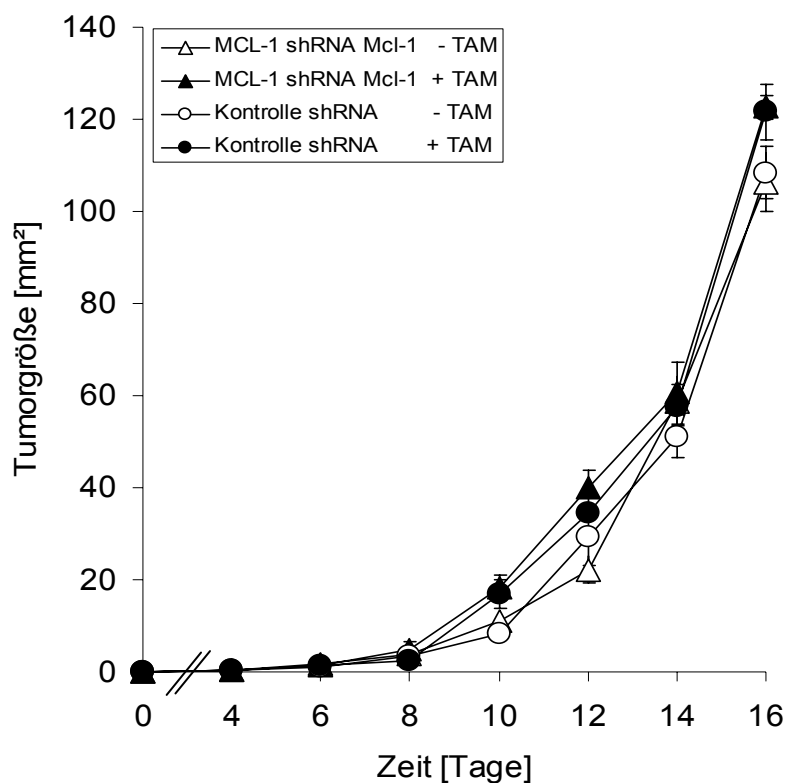


Abb. 3.24.: Wachstumsverhalten von PKB/Akt-ER^{tam} transduzierten HLA-A*0201-transgenen Fibroblasten mit MCL-1-Repression *in vivo*.

Die Repression des endogenen MCL-1 mittels shRNA-Technologie hat keinen Einfluss auf das Tumorstadium der HLA-A*0201-transgenen Fibrosarkome *in vivo*. Das Wachstum der Tumore mit MCL-1-Repression (schwarze und weiße Dreiecke) entspricht dem Tumorstadium der Kontrollen (weiße und schwarze Kreise). (mittlere Tumorstadium \pm SD; n=4 je Gruppe)

3.11. Untersuchungen zur Wirkung pharmakologischer Inhibitoren auf die PKB/Akt-abhängige Resistenz *in vitro* und *in vivo*

3.11.1. Untersuchung zur Wirkung von ABT-737 auf PKB/Akt-vermittelte Apoptosehemmung *in vitro*

Die molekulare Charakterisierung von PKB/Akt als Resistenzfaktor gegenüber immunologischer Tumorabstossung ermöglicht die Untersuchung pharmakologischer Strategien zum Überwinden dieser Resistenz. Hierzu wurde ABT-737, ein funktioneller Inhibitor anti-apoptotischer BCL-2 Proteine, und Rapamycin, ein Inhibitor der durch PKB/Akt aktivierten Kinase mTOR, untersucht.

ABT-737 ist ein pharmakologischer Inhibitor, der durch Bindung von anti-apoptotischen Mitgliedern der BCL-2-Familie eine Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber Zytostatika-induzierter Apoptose bewirkt (Oltersdorf et al., 2005). ABT-737 bindet in der hydrophoben Tasche von Bcl-2 und Bcl-x_L und kompetiert somit deren Bindung pro-apoptotischer Proteine wie Bax und Bak. Damit inhibiert ABT-737 anti-apoptotische Bcl-2 und es kann Apoptose eintreten.

Um die Wirkung von ABT-737 in dem hier etablierten Tumormodell genauer zu untersuchen, wurden CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Mef mit 12,5 µM ABT-737 für 24 h behandelt und verschiedenen Apoptosestimuli (Staurosporin, UV) ausgesetzt. Zur Auswertung wurde sowohl die Fraktion der apoptotischen Zellen mit subgenomischer DNA, als auch das mitochondriale Transmembranpotential $\Delta\psi_m$ durch TMRE-Färbung gemessen (Abb. 3.25.). Es zeigte sich, dass trotz Vorbehandlung der Zellen mit ABT-737 der durch aktivierte PKB/Akt-ER^{tam} vermittelte Schutz gegenüber Staurosporin bzw. UV-Behandlung bestehen blieb. Somit kann durch die zusätzliche Gabe von ABT-737 der Wirkung der durch PKB/Akt-vermittelten Resistenz nicht entgegen gewirkt werden.

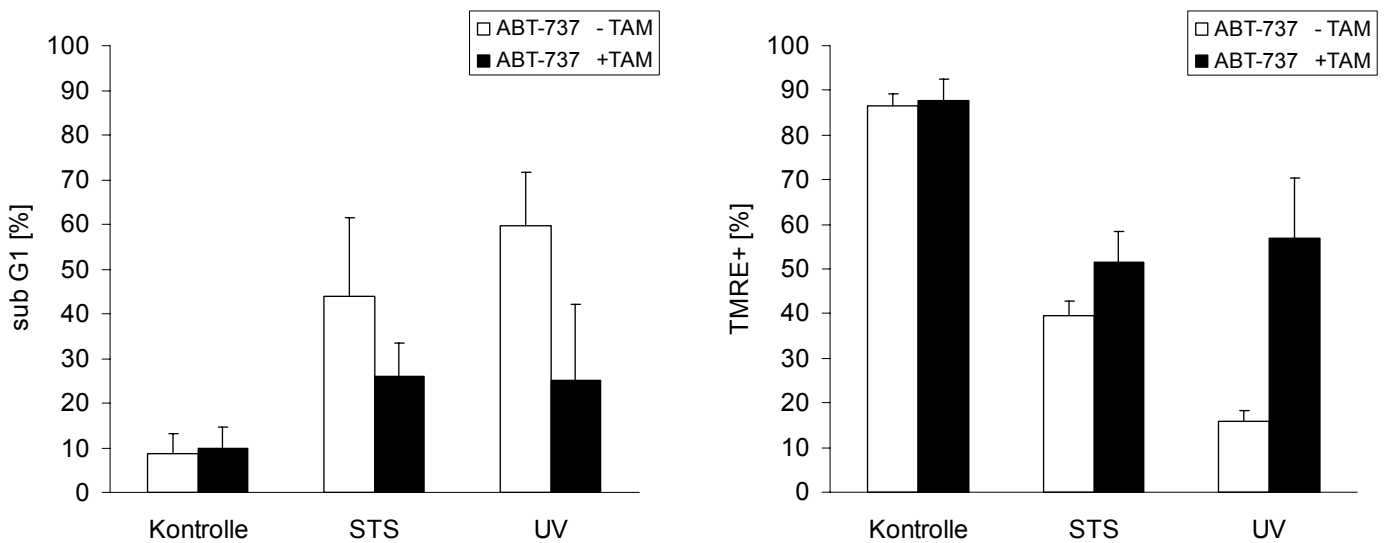


Abb. 3.25.: ABT-737 hebt die durch PKB/Akt-vermittelte Resistenz gegenüber Zytostatika-induzierter bzw. UV-induzierter Apoptose nicht auf.

CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Mef wurden mit dem Proteinkinaseinhibitor Staurosporin (31,25 nM) oder UV-Bestrahlung (50 mJ/cm²) in Kombination mit ABT-737 (12,5 μM) behandelt. Das Fusionsprotein PKB/Akt-Er^{tam} wurde durch Zugabe von Tamoxifen (0,1 μM) aktiviert (schwarze Balken). 24 h nach dem entsprechenden Apoptosestimuli wurde der Anteil an apoptotischen Zellen durch sub G1-Messung im Durchflusszytometer bestimmt bzw. Zellen mit erhaltenem mitochondrialen Transmembranpotential $\Delta\psi_m$ mittels TMRE-Färbung bestimmt. Durch zusätzliche Inkubation mit dem Inhibitor ABT-737 konnte die durch aktive PKB/Akt vermittelte Resistenz gegenüber Apoptosestimuli nicht aufgehoben werden. (Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen \pm SD)

Um im Weiteren sicherzustellen, dass die für ABT-737 in der Literatur beschriebenen Wirkmechanismen auch in dem hier verwendeten Modell funktionieren, wurden die obenbeschriebenen Versuche mit CyA2K^b-Mef wiederholt, die stabil das BCL-2-Protein BCL-x_L exprimieren. Wurden CyA2K^b-BCL-x_L-Mef UV-Bestrahlung bzw. Staurosporin-Behandlung, zeigten sich diese Zellen gegenüber den Apoptosestimuli resistent. Bei einer gleichzeitigen Behandlung von ABT-737 (12,5 μM) wurden die BCL-x_L-exprimierenden Zellen gegenüber UV-Bestrahlung und Staurosporin-Behandlung sensitiviert (Abb. 3.26.).

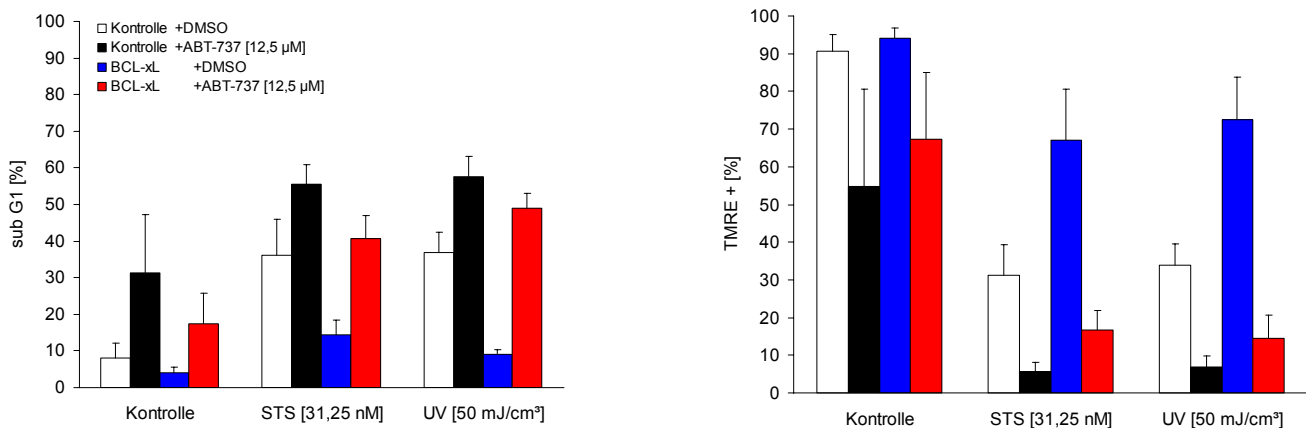


Abb. 3.26.: ABT-737 hebt die durch BCL-x_L-vermittelte Resistenz gegenüber Zytostatika-induzierter bzw. UV-induzierter Apoptose auf.

CyA2K^b-BCL-x_L-Mef (blaue und rote Balken) bzw. Mef mit Kontrollvektor (weiße und schwarze Balken) wurden mit dem Proteinkinaseinhibitor Staurosporin (31,25 nM) oder UV-Bestrahlung (50 mJ/cm²) in Kombination mit ABT-737 (12,5 µM) behandelt. 24 h nach dem entsprechenden Apoptosestimuli wurde der Anteil an apoptotischen Zellen durch sub G1-Messung im Durchflusszytometer bestimmt bzw. Zellen mit erhaltenem mitochondrialen Transmembranpotential $\Delta\psi_m$ mittels TMRE-Färbung bestimmt. Durch zusätzliche Inkubation mit dem Inhibitor ABT-737 konnte die durch BCL-x_L-vermittelte Resistenz gegenüber Apoptosestimuli aufgehoben werden. (Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen \pm SD)

3.11.2. Untersuchung zur Wirkung von Rapamycin auf PKB/Akt-vermittelte Resistenz *in vivo*

Bei Rapamycin handelt es sich um einen Inhibitor von mTOR, einem Substrat der PKB/Akt, das Einfluss auf RNA-Synthese und Proteintranslation nimmt (Amaravadi and Thompson, 2005). Rapamycin wird in der Klinik als Immunsuppressiva eingesetzt. Es zeigte sich aber auch, dass die Inhibition von mTOR Krebszellen gegenüber Zytostatika-Behandlung sensitivieren kann. Aktuell laufen klinische Studien mit verschiedenen Rapamycinanaloga, um deren Wirkung in der Krebstherapie zu prüfen. Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, ob Rapamycin die durch PKB/Akt-ER^{tam} vermittelte Immunresistenz in dem hier etablierten Modell überkommen kann.

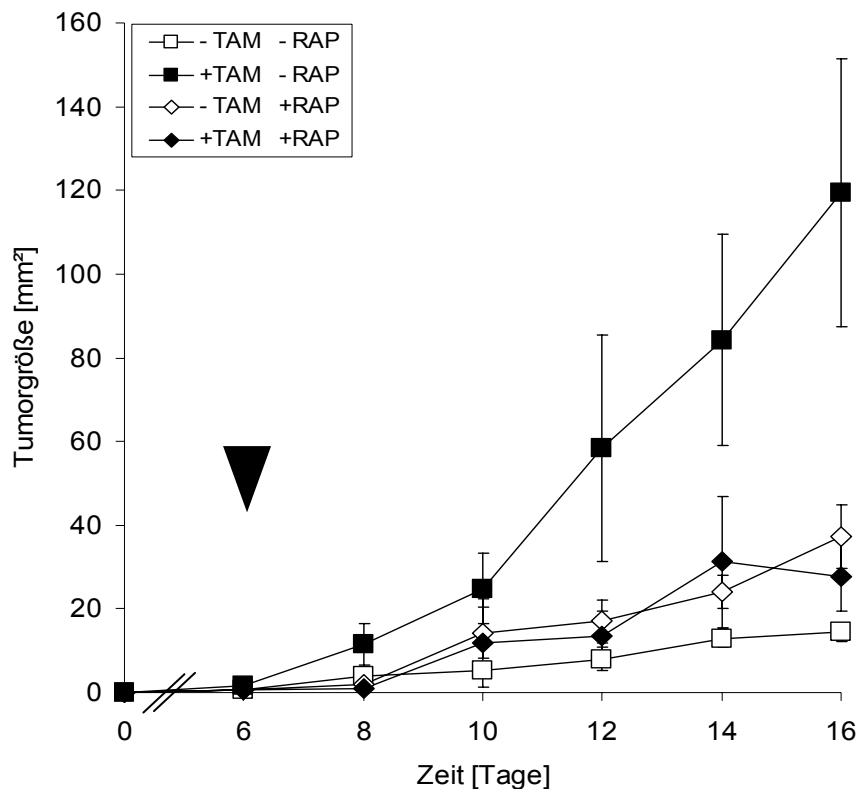


Abb. 3.27.: Rapamycin hebt durch PKB/Akt und MCL-1-vermittelte Resistenz auf und sensitiviert HLA-A*0201-transgene Tumorzellen gegenüber ZTL-vermittelter Zytotoxizität.

Wachstumskurve von HLA-A*0201-transgenen Fibrosarkomen in NOD/SCID-Mäusen, die mit einer Kombinationen aus Tamoxifen (schwarze Rauten und Quadrate) und Rapamycin (RAP) (4 mg/kg) (weiße Rauten und Quadrate) und/oder Trägersubstanz behandelt wurden. Nach Aufwachsen eines palpablen Tumors erhielten die Tiere an Tag 6 unbehandelte Splenozyten aus C57Bl/6-Mäusen (schwarzer Pfeil). Bei zusätzlicher Behandlung mit Rapamycin war der protektive Effekt konditional aktiver PKB/Akt aufgehoben. Somit kann durch Inhibition von mTOR und dem entsprechenden Signalweg die von PKB/Akt vermittelte Resistenz gegenüber Immunzellen aufgehoben werden. (mittlere Tumorgöße \pm SD; n=5 je Gruppe)

Hierzu wurden je 5 NOD/SCID-Mäuse pro Gruppe $1 \cdot 10^6$ Zellen CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam} s.c appliziert und nach Etablierung eines tastbaren Tumors mit $5 \cdot 10^7$ Splenozyten aus C57Bl/6-Mäusen behandelt. Zusätzlich erhielten zwei Gruppen eine Behandlung mit Rapamycin (4 mg/kg) i.p., wobei in einer Gruppe durch Tamoxifen-Gabe zusätzlich PKB/Akt-ER^{tam} aktiviert wurde, während die zweite Gruppe nur Trägersubstanz verabreicht bekam. Die Kontrollgruppen wurden analog, allerdings

ohne Rapamycin-Gabe behandelt. Der Tumorverlauf zeigte, dass durch Rapamycin-Gabe die durch PKB/Akt-ER^{tam} vermittelte Resistenz gegenüber den adoptiv transplantierten Splenozyten aufgehoben war (Abb. 3.27.).

Um Wechselwirkungen von Rapamycin auf das durch Tamoxifen induzierbare Expressionssystem auszuschließen, wurden Tumore aus Mäusen explantiert, die mit Kombinationen aus Tamoxifen, Rapamycin und/oder Trägersubstanz behandelt worden waren. Nach Herstellung von Tumorlysaten wurden diese mittels SDS-PAGE und Immunoblot auf die Expression verschiedener Proteine untersucht (Abb. 3.28.). Das Fusionsprotein PKB/Akt-ER^{tam} konnte in allen Tumorextrakten nachgewiesen werden. Anhand der Serin 473 und Threonin 308 von wt-PKB/Akt korrespondierenden Phosphoepitopen des Fusionsproteins PKB/Akt-ER^{tam} konnte festgestellt werden, dass die Applikation von Rapamycin keinen Einfluss auf den Aktivierungszustand des Fusionsproteins hatte und dieses nur bei Tamoxifen-Gabe aktiviert war. Analog verhielt es sich mit dem PKB-Substrat GSK-3 β . Auch dieses Substrat der PKB/Akt war nur in Tamoxifen-behandelten Mäusen phosphoryliert.

Im Weiteren zeigte sich, dass bei Behandlung mit Rapamycin die Phosphorylierung der p70S6-Kinase, einem Substrat von mTOR (Vgl. 1.2.3.), supprimiert war. Ebenso fand sich eine deutliche Reduktion der PKB/Akt-ER^{tam}-induzierten Aufregulation von MCL-1, während die Expressionsstärke von BCL-2 und BCL-x_L unbeeinflusst blieben. Somit kann Rapamycin durch Hemmung der mTOR-abhängigen Aufregulation von MCL-1 die PKB/Akt-ER^{tam}-induzierte Immunresistenz *in vivo* supprimieren.

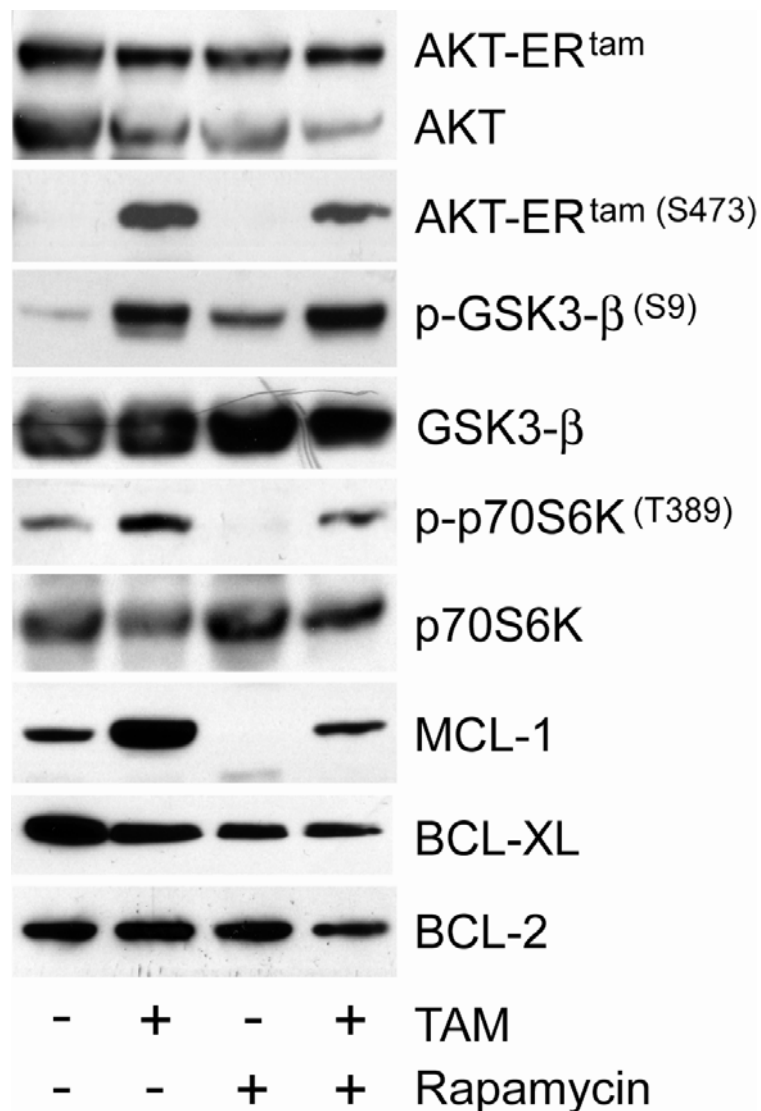


Abb. 3.28.: Immunoblotanalyse von CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Fibrosarkomen aus Mäusen behandelt mit Kombinationen aus Tamoxifen, Rapamycin und/oder Trägersubstanz.

Tumorextrakte von CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Fibrosarkomen analysiert mittels Immunoblot. Die Tumore wurden Tieren entnommen, die mit einer Kombinationen aus Tamoxifen (TAM) (1 mg/24 h) und Rapamycin (RAP) (4 mg/kg) und/oder Trägersubstanz behandelt worden waren. Das Fusionsprotein PKB/Akt-ER^{tam} war in allen Tumoren nachweisbar. Eine Phosphorylierung des Fusionsproteins an Serin 473- und Threonin 308-korrespondierenden Epitopen konnte nur in mit Tamoxifen behandelten Mäusen festgestellt werden. Analog verhielt es sich mit der Phosphorylierung des PKB/Akt-Substrates GSK-3β. Durch die Gabe des mTOR-Inhibitors Rapamycin konnte die Phosphorylierung des mTOR-Substrates p70S6Kinase inhibiert werden. Des Weiteren wurde durch Behandlung mit Rapamycin die PKB/Akt-vermittelte Aufregulation von MCL-1 aufgehoben.

Um auszuschließen, dass Rapamycin in diesem Modell eine anti-proliferative Wirkung ausweist, wurde der Versuch ohne Splenozytengabe wiederholt (Abb. 3.29). Der Verlauf des Tumorwachstums zeigte, dass in allen vier Gruppen keine Wachstumsunterschiede bestanden und Rapamycin somit keinen direkten tumorsuppressiven Effekt ausübte. Somit trägt die Inhibierung von mTOR und die damit einhergehende Suppression des sich anschließenden Signalweges nicht zu einer reduzierten Zellproliferation *in vivo* bei.

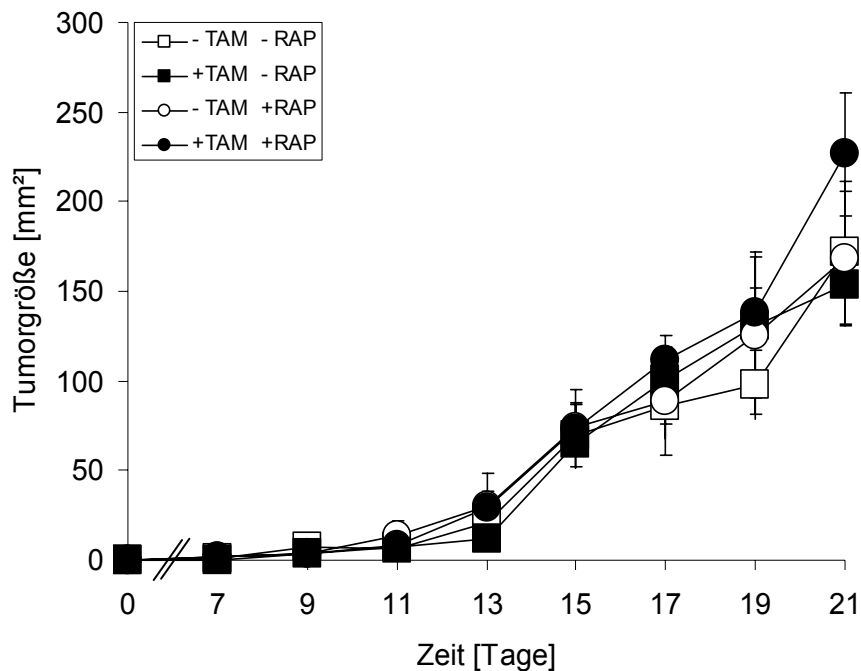


Abb. 3.29.: Wachstumsverhalten von PKB/Akt-ER^{tam} transduzierten HLA-A*0201-transgenen Fibroblasten von Rapamycin-Behandlung *in vivo*.

Wachstumskurve von HLA-A*0201-transgenen Fibrosarkomen bei Mäusen, die mit einer Kombinationen aus Tamoxifen (schwarze Kreise und Quadrate) und Rapamycin (RAP) (4 mg/kg) (weiße Kreise und Quadrate) und/oder Trägersubstanz behandelt worden sind. Die Applikation von Rapamycin alleine und in Kombination nimmt keinen Einfluss auf die Tumorprogression. (mittlere Tumorgröße \pm SD; n=5 je Gruppe)

3.12. Kinetische Untersuchungen zur Identifikation eines kritischen Zeitfensters für die PKB/Akt-induzierte Immunresistenz

Das hier etablierte, konditionale Modell ermöglichte zu untersuchen, in welchem Zeitfenster nach Transfer der Splenozyten die PKB/Akt aktiv sein muss, um Resistenz gegenüber den transferierten Immunzellen zu vermitteln.

Durch die Verwendung eines pharmakologisch regulierbaren Expressionssystems kann die Aktivität der PKB/Akt-ER^{tam} durch Gabe von Tamoxifen „angeschaltet“ und durch Entzug wieder „ausgeschaltet“ werden. Hierdurch lässt sich eine pharmakologische Inhibition der PKB/Akt-ER^{tam} durch Entzug von Tamoxifen simulieren, da dadurch das Fusionsprotein inaktiviert wird.

Hierfür wurden CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Mef s.c. in sublethal bestrahlte NOD/SCID-Mäuse implantiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfer der Immunzellen wurde den Mäusen das Tamoxifen entzogen und somit die PKB/Akt-ER^{tam} inaktiviert. Mäuse, die durchgehend mit Tamoxifen behandelt wurden und somit dauerhaft über eine aktive PKB/Akt verfügten, zeigten ein deutliches Tumorstadium (Abb. 3.30.). Tiere, denen an Tag 1 nach Transfer der Immunzellen das Tamoxifen entzogen wurde, zeigten ein deutlich vermindertes Tumorstadium. Analog verhielt sich die Gruppe, bei denen an Tag 2 nach Transplantation die PKB/Akt-ER^{tam} inaktiviert wurde. Wurde die PKB/Akt allerdings erst an Tag 4 durch Tamoxifen-Entzug inaktiviert, zeigte sich ein Tumorstadium, das sich von dem der dauerhaft mit TAM-behandelten Kontrolltiere nicht unterschied. Somit konnte als kritisches Zeitfenster, in dem PKB/Akt-ER^{tam} in diesem Modell Resistenz gegenüber transferierten Splenozyten vermittelt, die ersten vier Tage nach Transfer definiert werden.

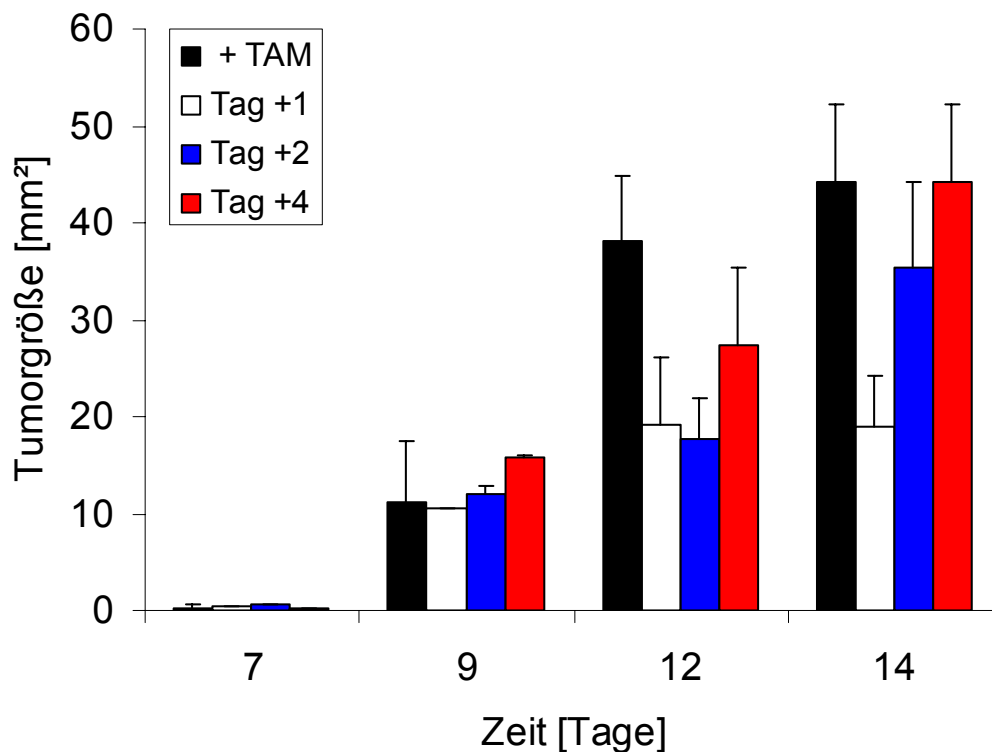


Abb. 3.30.: Identifikation eines kritischen Zeitfensters für die PKB/Akt-induzierte Immunresistenz.

Nach Etablierung tastbarer CyA2K^b-PKB/Akt-ER^{tam}-Fibrosarkome in NOD/SCID-Mäusen, wurden die Tiere mit Splenozyten aus C57Bl/6-Mäusen ($5 \cdot 10^7$ Zellen) behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Splenozytentransfer die PKB/Akt-ER^{tam} durch Entzug des Tamoxifens inaktiviert. Die Kontrollgruppe erhielt das gesamte Experiment durch Tamoxifen i.p. appliziert; hier zeigte sich eine ansteigende Tumorprogression (schwarze Balken). Bei Inaktivierung der PKB/Akt an Tag 1 (weiße Balken) oder Tag 2 (blaue Balken) konnte der durch die C57Bl/6-Splenozyten vermittelte tumorsuppressive Effekt beobachtet werden. Wurde das Fusionsprotein erst an Tag 4 nach Splenozytentransfer durch Tamoxifen-Entzug (rote Balken) inaktiviert, war der tumorsuppressive Effekt der Splenozyten aufgehoben. Somit vermittelt in diesem Modell PKB/Akt in den ersten vier Tagen die kritische Resistenz gegenüber adoptiv transplantierten Immunzellen. (dargestellt ist die Tumorgröße in Abhängigkeit zum Zeitpunkt des Tamoxifen-Entzuges, mittlere Tumorgröße \pm SD; n=4 je Gruppe)

4. Diskussion

4.1. PKB/Akt als Resistenzfaktor gegenüber immunologischen Effektormechanismen

Während der malignen Transformation entwickeln Zellen Eigenschaften, die es ihnen ermöglichen, den Mechanismen der körpereigenen Immunantwort zu entgehen. Ferner ermöglicht die tumorinhärente genetische Instabilität die Ausbildung von Resistenzmechanismen gegenüber zytotoxischen Behandlungen, wie Chemo- und Strahlentherapien. Immuntherapeutische Ansätze haben zum Ziel, solche resistenten Tumorzellen zu eradizieren. Allerdings treten trotz teilweiser Behandlungserfolge auch nach Immuntherapien Rezidive auf. Ursächlich hierfür kann eine gestörte Immunerkennung der Tumorzellen sein, aber auch deren Resistenz gegenüber den immunologischen Effektormechanismen. Wesentliche Effektoren der zellulären Immunantwort sind ZTL und NK-Zellen, welche durch Induktion von Apoptose die Tumorzellen eliminieren.

Zentrale Mediatoren der Apoptose sind Caspasen, die über zwei verschiedene Signalwege aktiviert werden können: Die Aktivierung durch den extrinsischen Signalweg erfolgt über Interaktionen von Todesrezeptoren mit ihren entsprechenden Liganden. Dies führt zur Ausbildung des DISC-Komplexes und damit einhergehend zu einer Aktivierung der Initiatorcaspase-8 und anschließend der Effektorcaspasen-3 und -7, welche den apoptotischen Phänotyp auslösen. Wird die Zelle Stressreizen z.B. wie DNA-Strangbrüchen oder dem Entzug von Wachstumsfaktoren ausgesetzt, kann über den intrinsischen Signalweg Apoptose ausgelöst. Eine zentrale Bedeutung in der Regulation dieses Signalweges kommt den Mitochondrien zu. Die Desintegration der äußeren Mitochondrienmembran hat die Freisetzung von Cytochrom C und anderen apoptogenen Faktoren zur Folge. Dies ermöglicht die Ausbildung des APAF-1-Apoptosom-Komplexes, welcher essentiell für die Aktivierung der Initiatorcaspase-9 ist. Aktive Caspase-9 führt wiederum zur Aktivierung der Effektorcaspase. Beide Signalwege, der intrinsische und der extrinsische, interagieren durch die Spaltung von BID durch die DISC-aktivierte Caspase-8; gespaltenes BID permeabilisiert die Mitochondrienmembran.

Immunzellen aktivieren die Apoptose-Signalkaskade über verschiedene Wege: Zum einen können Immunzellen Liganden exprimieren, die durch Interaktion mit den entsprechenden Todesrezeptoren den extrinsischen Signalweg der Apoptose

aktivieren. Zum anderen kommt es durch Translokation von Granzym B und Perforin zu einer Spaltung des BH3-Proteins BID und damit zum Auslösen der Apoptose über den intrinsischen Signalweg. Ferner können weitere Granzyme in Perforin-abhängiger Weise alternative Apoptosewege induzieren (Revell et al., 2005).

Beobachtungen, dass die Leukämien von Patienten, die gegen konventionelle Therapieformen wie Radio- und Chemotherapie resistent sind, auch ein erhöhtes Rezidivrisiko nach einer allogenen Stammzelltransplantation aufweisen, werfen die Frage auf, ob Resistenzmechanismen, die Tumorzellen vor konventionellen Therapien schützen, auch eine Resistenz gegenüber immuntherapeutischen Therapieansätzen vermitteln. In verschiedenen experimentellen Systemen konnte gezeigt werden, dass eine Blockade des intrinsischen Signalweges der Apoptose eine immunologische Caspasenaktivierung verhindert und zu Immunresistenz von Tumorzellen führt (Huber et al., 2005; Ravi et al., 2006). Ebenso kann eine Immunresistenz von Tumorzellen durch die Inhibition der Granzyme durch Serpine, metastabile Proteaseinhibitoren, hervorgerufen werden (Medema et al., 2001;). Daher können Deregulationen in der Apoptose-Signalkaskade zur Immunresistenz von Tumoren gegenüber immuntherapeutischen Ansätzen führen.

Eine Deregulation und Überexpression der PKB/Akt wurde in vielen Krebsarten beschrieben und kann zu Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli führen. PKB/Akt ist ein zentraler Regulator von Signalwegen der Zellproliferation und des Zellüberlebens. Substrate der PKB/Akt umfassen Regulatoren der Proteinbiosynthese, des Zellzyklus und der Apoptose; daher stellt PKB/Akt ein interessantes Zielprotein für therapeutische Interventionen bei Krebsbehandlungen dar. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob eine konstitutive Aktivierung der PKB/Akt Resistenz von Tumoren gegenüber Immuneffektoren vermittelt.

4.2. PKB/Akt vermittelt Apoptoseresistenz *in vitro*

Zur Untersuchung, ob konstitutiv aktive PKB/Akt einen Einfluss auf die Apoptose-Signalkaskade ausübt, wurde mit einer pharmakologisch regulierbaren Mutante der PKB/Akt gearbeitet. Diese konstitutiv aktive Form der PKB/Akt war mit einer mutierten Ligandenbindungsstelle des murinen Östrogenrezeptors fusioniert und konnte durch Zugabe des Liganden 4-Hydroxy-Tamoxifen binnen weniger Minuten *in vitro* wie *in vivo* aktiviert werden. Murine embryonale Fibroblasten, die mit den Onkogenen Myc und H-Ras transformiert worden waren, zeigten nach retroviraler

Transduktion eine physiologische Expressionsstärke des regulierbaren PKB/Akt-Konstruktes. Anhand des Nachweises von Phosphoepitopen der PKB/Akt-ER^{tam} konnte sowohl *in vitro* wie *in vivo* die Funktionalität des Expressionssystems verifiziert werden. So war nur in Anwesenheit von Tamoxifen eine Phosphorylierung der entsprechenden Epitope feststellbar. Ebenso konnte nur in Anwesenheit von Tamoxifen eine verstärkte Phosphorylierung des PKB/Akt-Substrates GSK-3 β beobachtet werden. Die Funktionalität des Fusionsproteins wurde zur weiteren Verifikation des Expressionssystems mit Hilfe eines Kinase-Assay *in vitro* bestätigt. Diese Ergebnisse erlauben den Schluss, dass der Aktivierungsstatus der PKB/Akt-ER^{tam} *in vitro* wie *in vivo* durch die Gabe von Tamoxifen reguliert werden kann.

Zur Untersuchung des Einflusses von PKB/Akt auf die Suszeptibilität von Tumorzellen gegenüber ZTL-induzierter Zytotoxizität, wurden diese mit ZTL-Populationen, die sowohl gegen ein HLA-A*0201-restringiertes p53-Epitop (264-272) gerichtet waren, als auch mit alloreaktiven ZTL kokultiviert. Tumorzellen, die in Anwesenheit von Tamoxifen mit ZTL kokultiviert wurden, zeigten eine signifikant gesteigerte Resistenz gegen die ZTL-vermittelte Zytotoxizität. Diese setzte sich in ein gesteigertes klonogenes Überleben kokultivierter Tumorzellen um. Zellen, die in Abwesenheit von Tamoxifen und somit mit inaktiver PKB/Akt-ER^{tam} in die Kokulturrexperimente eingesetzt wurden, waren gegenüber der ZTL-vermittelten Zytotoxizität relativ sensitiviert. In Kontrollexperimenten wurde ausgeschlossen, dass die beobachteten Effekte auf den Einfluss von Tamoxifen zurückzuführen waren.

4.3. PKB/Akt vermittelt Immunresistenz gegenüber ZTL-vermittelter Zytotoxizität *in vivo*

Um die Relevanz dieser Ergebnisse im Rahmen einer adoptiven Immunzelltransfers zu überprüfen, wurde ein geeignetes Mausmodell etabliert. Die HLA-A*0201-transgenen, PKB/Akt-ER^{tam}-exprimierenden Mef wurden s.c. in NOD/SCID-Mäuse appliziert. Das Wachstum der Fibrosarkome wurde durch konditionale Aktivierung von PKB/Akt-ER^{tam} über Tamoxifengabe alleine nicht beeinflusst. Erhielten die Tiere nach Entwicklung palpabler Tumoren einen Transfer unstimulierter Splenozyten aus C57Bl/6-Mäusen sowie eine subkutane Injektion Interleukin-2, ließ sich das Tumorstadium signifikant hemmen. Dieses HLA-A*0201-transgene murine Tumormodell simuliert somit die Situation ähnlich einer allogenen Stammzelltransplantation oder Applikation von Spenderlymphozyten, wie sie heute

als Standardtherapie von Leukämien und im Rahmen von Studien bei Tumoren eingesetzt werden (Appelbaum, 2001).

Untersuchungen zur Charakterisierung und Identifikation der Effektorpopulation dieses Transplantationsmodells zeigten, dass der tumorsuppressive Effekt der C57Bl/76-Splenozyten überwiegend durch CD8-positive, alloreaktive Zellen über einen Perforin-abhängigen Mechanismus vermittelt wurde. Effektorpopulationen, aus denen die Fraktion der CD8-positiven Zellen depletiert war, sowie Perforin-defiziente Immunzellen, zeigten eine stark reduzierte Aktivität. Immunzellen, die aus HLA-A*0201-transgenen CyA2K^b-Mäusen stammten, waren gegenüber den HLA-A*0201-transgenen, PKB/Akt-ER^{tam}-exprimierenden Fibrosarkomen tolerant. Diese Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen früherer Arbeiten in einem vergleichbaren Modell, in dem alloreaktive ZTL Granula-anhängige Zytotoxizität vermittelten (Huber et al., 2005).

Mit Hilfe dieses Modells konnten die Ergebnisse der *in vitro*-Kokulturrexperimente *in vivo* bestätigt werden. Die konditionale Aktivierung von PKB/Akt-ER^{tam} schützte etablierte Fibrosarkome gegenüber der durch adoptiv transplantierte zelluläre Immuneffektoren vermittelten Tumorsuppression. Durch kinetische Untersuchungen des Tamoxifen-Entzuges und damit einhergehender Inaktivierung der PKB/Akt-ER^{tam} konnten die ersten vier Tage nach Splenozytentransfer als kritisches Zeitfenster für die PKB/Akt-induzierte Immunresistenz bestimmt werden. Dies erlaubt den Umkehrschluss, dass eine pharmakologische Suppression der PKB/Akt in den ersten vier Tagen nach Transfer der Immunzellen die Effektivität einer solchen Therapie signifikant verbessern könnte.

4.4. PKB/Akt-abhängige posttranskriptionelle Stabilisierung von MCL-1 vermittelt Immunresistenz

Da die Aktivität der PKB/Akt-ER^{tam} alleine keinen Einfluss auf das Tumorwachstum ausübte und ein tumorprotektiver Effekt erst in Zusammenhang mit einer Splenozytentransplantation beobachtet werden konnte, stellte sich die Frage, auf welche Weise PKB/Akt Immunresistenz verursachte. Neben dem Zellstoffwechsel und der Zellzyklusregulation nimmt PKB/Akt auch regulatorischen Einfluss auf die apoptotische Signaltransduktion (Vgl. 1.2.3.). Somit könnte die von PKB/Akt-vermittelte Immunresistenz in diesem Modell durch Inhibition der Apoptose ausgelöst werden.

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen in Anwesenheit von Tamoxifen und damit einhergehender Aktivierung der PKB/Akt-ER^{tam} vor Staurosporin oder UV-Bestrahlung geschützt waren. Dieser Schutz erfolgte auf oder oberhalb der apoptotischen Desintegration der Mitochondrien, da Zellen mit aktiver PKB/Akt-ER^{tam} das mitochondriale Transmembranpotential $\Delta\Psi_m$ aufrecht erhalten konnten.

Eine identische Beobachtung konnte nach Kokultur von Tumorzellen mit antigenspezifischen ZTL gemacht werden, was darauf hinwies, dass die beobachtete Immunresistenz auf eine Blockade der apoptotischen Signaltransduktion zurückzuführen ist. Dies konnte durch weitere Versuche bestätigt werden, in denen eine gleichzeitige Expression des anti-apoptotischen BCL-2-Proteins BCL-x_L keinen weiteren Schutz der Tumorzellen gegenüber Apoptosestimuli vermittelte, wenn PKB/Akt-ER^{tam} aktiv war.

Die Integrität der Mitochondrien wird durch die Wechselwirkung verschiedener anti-apoptotischer Mitglieder der BCL-2-Familie reguliert (Green and Kroemer, 2004). Vor diesem Hintergrund wurden verschiedene Proteine der BCL-2-Familie in Relation zur Aktivierung von PKB/Akt untersucht. Hierbei konnte eine Aufregulation des anti-apoptotischen MCL-1-Proteins in Tumorextrakten beobachtet werden, die aus mit Tamoxifen-behandelten Mäusen gewonnen worden waren.

4.5. MCL-1 und mTOR sind kritische Effektoren in der PKB/Akt-vermittelten Immunresistenz

4.5.1. MCL-1 als Regulator von Zellüberleben

MCL-1 spielt als anti-apoptotisches Mitglied der BCL-2-Proteinfamilie eine entscheidende Rolle in den Signalwegen, die Zellüberleben und Zelltod regulieren. MCL-1 ist ein Protein mit einer relativ kurzen Halbwertszeit von ca. 90 min, was es von anderen BCL-2-Familienmitgliedern unterscheidet (Liu et al., 2005). Nach Aktivierung der Apoptosesignalwege konnte beobachtet werden, dass der MCL-1-Abbau beschleunigt wird: So führen UV-Bestrahlung und Entzug von Wachstumsfaktoren zu einer Inhibition der MCL-1-Synthese (Nijhawan et al., 2003; Chao et al., 1998), wohingegen durch eine Adenovirus-Infektion der proteasomale Abbau von MCL-1 gefördert wird (Cuconati et al., 2003). Als entscheidendes Enzym im Signalweg, über den der proteasomale Abbau von MCL-1 reguliert wird, konnte die E3-Ligase Mule/ARF-BP1 identifiziert werden (Zhong et al., 2005; Warr et al.,

2005). Ob die Aktivität dieser Ligase in Abhängigkeit zu Todessignalwegen in der Zelle steht, konnte bisher noch nicht geklärt werden.

Als Interaktionspartner von MCL-1 sind diverse Proteine beschrieben worden; in der Hauptsache handelt es sich hierbei um Proteine der BCL-2-Familie. So sind Interaktionen mit den pro-apoptotischen „Multidomänen“-Proteinen BAX und BAK, ebenso wie mit den BH3-only-Protein BIM, PUMA und NOXA belegt (Opferman et al., 2003; Chen et al., 2005; Acehan et al., 2002; Wang et al., 1998). In einer aktuellen Untersuchung zeigte sich, dass MCL-1 zusammen mit BCL-x_L, einem weiteren anti-apoptischen Protein der BCL-2-Familie, BAK komplexiert und somit inaktiviert. Kommt es zur Aktivierung der apoptotischen Signaltransduktion, wird der inhibierende Effekt von MCL-1 auf BAK durch das BH3-only Protein NOXA aufgehoben, welches MCL-1 bindet und somit aus dessen Bindung an BAK kompetiert (Willis et al., 2005).

Neben der Interaktion mit pro-apoptischen Proteinen der BCL-2-Familie, interagiert MCL-1 mit einer Reihe weiterer Proteine z.B. PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) und CDK1 (*Cyclin Dependent Kinase 1*), wobei die physiologische Bedeutung dieser Komplexe unklar ist (Fujise et al., 2000; Jamil et al., 2005).

Die zelluläre Verteilung von MCL-1 korreliert stark mit dem Zellzyklusstatus: Während der exponentiellen Wachstumsphase ist MCL-1 an den Mitochondrien der Zelle lokalisiert, wogegen in der stationären Phase die überwiegende Menge von MCL-1 im Nukleus zu finden ist. Im Nukleus konnte eine Interaktion mit PCNA nachgewiesen werden, welches das Fortschreiten des Zellzyklus inhibiert, jedoch nicht für die anti-apoptotische Funktion von MCL-1 verantwortlich ist (Fujise et al., 2000). In Mausmodellen wurde gezeigt, dass MCL-1 in der Entwicklung und Reifung von B und T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle spielt. MCL-1-defiziente Mäuse zeigen eine peri-implantationale Letalität der Embryonen (Rinkenberger et al., 2000).

Die Beobachtung, dass eine erhöhte Expression von MCL-1 in Leukämie-Zellen mit deren Chemoresistenz einher geht, zeigt, dass MCL-1 auch eine Rolle in der Resistenz gegenüber Tumorthérapien spielen kann (Kaufmann et al., 1998).

Ähnliche Beobachtungen konnten in den hier durchgeführten Experimenten gewonnen werden. Nähere Untersuchungen zum Mechanismus, der zur PKB/Akt-abhängigen Aufregulation von MCL-1 führte, zeigten, dass es sich um einen transkriptionsunabhängigen Prozess handelt.

Dagegen konnte eine erhöhte Stabilität des MCL-1-Proteins in Anwesenheit von aktiver PKB/Akt-ER^{tam} festgestellt werden. Die proteasomale Degradation von MCL-1 wird neben der E3-Ligase Mule/ARF-BP1 von NOXA und GSK-3 β , einem Substrat der PKB/Akt, reguliert. So führt eine Inhibition von GSK-3 β über PKB/Akt-vermittelte Phosphorylierung oder pharmakologischer Inhibition, zu einer Stabilisierung von MCL-1 (Maurer et al., 2006).

Zur Überprüfung, ob die beobachtete PKB/Akt-vermittelte Immunresistenz wirklich auf eine Aufregulation und Stabilisierung von MCL-1 zurückzuführen ist, wurde in den HLA-A*0201-transgenen Tumorzellen endogenes MCL-1 mittels shRNA-Technologie supprimiert. Fibrosarkome mit supprimiertem endogenem MCL-1 zeigten sich trotz konditionaler Aktivierung des PKB/Akt-Signalweges sensitiv gegenüber der durch adoptiven Splenozytentransfer vermittelten Tumorsuppression. Somit konnte geschlossen werden, dass die in diesem Modell beobachtete Immunresistenz durch eine Aufregulation von MCL-1 und eine damit einhergehende Inhibition des Apoptose-Signalweges PKB/Akt-abhängig vermittelt wird.

4.5.2. Pharmakologische Regulation von MCL-1

Die Identifikation des Mechanismus, der die durch PKB/Akt-vermittelte Immunresistenz in diesem Modell vermittelt, zog die Fragestellung nach sich, ob diese Resistenz auch pharmakologisch moduliert werden kann. Die Immuntherapie an sich wird heute noch weitestgehend als Alternative zur klassischen Therapieformen wie Chemo- oder Bestrahlungstherapie angesehen. Man hofft, mittels immuntherapeutischer Ansätze, Resistenzen zu überkommen, die nach der Behandlung mit Chemotherapeutika bzw. Bestrahlung aufgetreten sind. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen jedoch, dass gerade diese Resistenzmechanismen auch zu einer Resistenz gegenüber immuntherapeutischen Ansätzen führen können. So stellt sich die Frage, ob nicht eine Kombination mit pharmakologischen Therapien diese Blockade überwinden und so die Effektivität von Immuntherapien steigern kann. Hierzu wurden verschiedene Substanzen ausgetestet.

Da die Immunresistenz mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Aufregulation und Stabilisierung des anti-apoptotischen BH3-Proteins MCL-1 zurückzuführen ist, wurde die Substanz ABT-737 geprüft. ABT-737 ist eine Agens, welches an der hydrophoben Tasche anti-apoptotischer Proteine bindet und dadurch deren Bindung

an pro-apoptotische Proteine wie BAX und BAK kompetiert. ABT-737 wurde als BH3-Mimetic entwickelt und zeigt als einziges Compound dieser Klassee therapeutischer Substanzen einen spezifischen Wirkmechanismus, der über die Bindung an anti-apoptotische Proteine der BCL-2-Familie funktioniert (van Delft et al., 2006). Vor diesem Hintergrund wurde die Wirkung von ABT-737 auf die in diesem Tumormodell beobachtete Immunresistenz untersucht. Es zeigte sich, dass durch Gabe von ABT-737 die durch PKB/Akt vermittelte Resistenz nicht überwunden werden kann und die Tumorzellen gegenüber Apoptosestimuli (UV, STS) nicht sensitiviert werden. Da der Mechanismus der durch PKB/Akt vermittelte Resistenz gegenüber diesen Apoptosestimuli auch die Resistenz gegenüber Immunzellen bedingt, können die Beobachtungen übertragen werden. So dürfte eine Applikation von ABT-737 in Kombination mit einem Splenozytentransfer den tumorsuppressiven Effekt der Immunzellen auch *in vivo* nicht wiederherstellen.

Wurde in dem hier etablierten Tumormodell das anti-apoptotische BH3-Protein BCL-x_L exprimiert, konnte die hieraus resultierende Resistenz durch Gabe von ABT-737 bei den gleichen Apoptosestimuli (UV, STS) überwunden werden. Dies bestätigt das in der Literatur beschriebene Wirkungsspektrum von ABT-737, welches BCL-2, BCL-x_L und BCL-w bindet. Mit den weiteren anti-apoptotischen Mitglieder der BCL-2-Familie, A1 und MCL-1, wechselwirkt ABT-737 augenscheinlich nicht (Konopleva et al., 2006).

Diese Ergebnisse erhärten ebenfalls die Beobachtung, dass die durch PKB/Akt vermittelte Resistenz auf der Aufregulation von MCL-1 beruht.

4.5.3. Inhibition des mTOR-Signalweges sensitiviert Tumorzellen gegenüber der ZTL-vermittelten Zytotoxizität

Rapamycin ist ein Makrolidantibiotikum, welches als makrozyklisches Immunsuppressivum eingesetzt wird, z.B. um eine Organabstossung nach Transplantation zu verhindern. Neuere Arbeiten zeigen, dass vor allem CD4-abhängige Immunantworten Rapamycin-sensitiv sind (Salerno et al., 1998), wogegen CD8⁺-T-Zellen gegenüber Rapamycin resistent sind (Slavik et al., 2001). So konnten CD8⁺-T-Zellen auch in Anwesenheit von Rapamycin expandiert werden und zeigten normales Wachstum und Funktion (Fox et al., 2005). Aufgrund seiner antiproliferativen Effekte wird Rapamycin auch als Wirksubstanz in der Krebstherapie untersucht. Behandlungen mit Rapamycin oder Rapamycin-Analoga zeigten bei einer

Reihe von Tumorzelllinien, die z.B. aus Mammakarzinom, Ewing-Sarkom, Kleinzelliges Lungenkarzinom gewonnen wurden, antiproliferative Wirkung und führten teilweise zur Apoptose (Bjornsti and Houghton, 2004). So wurden Plasmozytom-Zelllinien gegenüber einer Dexamethason-Behandlung durch zusätzliche Rapamycin-Behandlung *in vitro* wie *in vivo* sensitiviert (Yan et al., 2006). Funktionell ist Rapamycin ein Inhibitor der mTOR-Kinase, einem Substrat der PKB/Akt. Eine endogene Aktivierung des mTOR-Signalweges kann abhängig von der Krebsart variieren, allerdings ist die Aktivierung dieses Signalweges in vielen Fällen auf eine Deregulation des PI3K-Signalweges und/oder eine konstitutive Aktivierung der PKB/Akt zurückzuführen. So wurde bei 40% der untersuchten Ovarialkarzinome eine Amplifikation der Genregion festgestellt, die für die p110-Untereinheit der PI3K kodiert (Shayesteh et al., 1999). Ebenso kann eine Inaktivierung des negativen Regulators der PI3K, PTEN, durch Mutation oder Deletion in vielen Krebsarten eine dauerhafte Aktivierung des PI3K-Signalweges und damit des mTOR-Signalweges zur Folge haben (Li et al., 1997). Weitere Deregulationen, die den mTOR-Signalweg betreffen, wurden im Kontext des Peutz-Jeghers-Syndromes beschrieben (Giardiello et al., 1987). Hierbei kommt es zu inaktivierenden Mutationen der STK11 (Serin/Threonin-Kinase 11), welche wiederum AMPK (Adenosin Monophosphatase (AMP)-dependent Kinase) aktiviert. AMPK inhibiert mTOR über TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex Protein 2) bei ungünstigen Energieverhältnissen in der Zelle (Shaw et al., 2004). Für weitere Substrate der mTOR-Kinase wurden mit Krebserkrankungen assoziierte Veränderungen beobachtet: So ist die S6K1 in einigen Tumorzelllinien (z.B. Mammakarzinom) konstitutiv aktiv oder zeigt eine Überexpression; damit einher geht eine Aufregulation des S6K1-Proteins (Couch et al., 1999). Des Weiteren wurde für ein weiteres Protein, eIF4E (eukaryotic Initiation Factor-4E), das von mTOR reguliert wird, eine gesteigerte Expression in Kolonkarzinomen, Mammakarzinomen und weiteren Tumorentitäten festgestellt (Sorrells et al., 1999). Eine erhöhte Expression von eIF4E ist meist mit einer schlechten Prognose bei Brustkrebsarten assoziiert (Li et al., 2002).

Diese Befunde deuten daraufhin, dass einer Deregulation des mTOR-Signalweges bei der Krebsentstehung und der Tumorprogression eine entscheidende Bedeutung zu kommen kann. Entsprechend stellte sich die Frage, ob neben der Splenozytengabe *in vivo* eine gleichzeitige Behandlung mit Rapamycin den

tumorsuppressiven Effekt der Immunzellen gegenüber PKB/Akt-aktivierten Fibrosarkomen wieder herstellen kann. Die Analyse explantierter Tumorextrakte aus Mäusen, die mit Rapamycin behandelt worden waren, zeigte deutlich, dass Rapamycin die Phosphorylierung des mTOR-Substrates p70S6-Kinase hemmt. Rapamycin selbst hatte jedoch keinen Einfluss auf das konstitutive Tumorstadium. In weiteren Analysen zeigte sich, dass es bei der Applikation von Rapamycin zu keiner Wechselwirkung mit dem konstitutiv regulierbaren PKB/Akt-ER^{tam} Expressionssystem kam. So konnte unabhängig von Rapamycin in Anwesenheit von Tamoxifen die Aktivität des Fusionsproteins PKB/Akt-ER^{tam} anhand der Phosphorylierung der GSK-3 β nachgewiesen werden.

Bei gleichzeitiger Gabe von Immunzellen und Rapamycin zeigte sich, dass Rapamycin den PKB/Akt-abhängige Schutz des Tumors vor den Immunzellen aufhebt. Damit einher geht eine Herabregulation des anti-apoptotischen MCL-1 in Tumoren, die mit Rapamycin in Anwesenheit von aktiver PKB/Akt-ER^{tam} behandelt wurden. Somit führt eine pharmakologische Inhibition des mTOR-Signalweges auch bei konstitutiv aktiver PKB/Akt-ER^{tam} zu einer Herabregulation von MCL-1 und somit zu einer Sensitivierung der Tumoren gegenüber adoptiv transferierten Splenozyten. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass eine Inhibition des mTOR über die Modulation der Expression anti-apoptotischer Proteine der BCL-2-Familie (hier MCL-1) die Inhibition der Apoptose aufhebt.

Eine mTOR-abhängige Regulation weiterer BCL-2-Proteine, BCL-2 und BCL-x_L, wurde im Zusammenhang mit ALCL (*Anaplastic Large Cell Lymphoma*) beschrieben. Auch hier konnte Herabregulation verschiedener anti-apoptotischer BCL-2-Proteine durch Rapamycin-Behandlung beobachtet werden (Vega et al., 2006). Zu ähnlichen Ergebnissen kommt die Gruppe um Wei et al.: Glukokortikoid-resistente ALL-Zelllinien konnten gegenüber Chemotherapie sensitiviert werden, wenn gleichzeitig eine Behandlung mit Rapamycin erfolgte. Damit assoziiert war eine Herabregulation des Proteins MCL-1. In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass MCL-1 mit dem pro-apoptotischen Protein BIM interagiert und diese Hemmung von BIM die Resistenz gegen Chemotherapeutika zur Folge hat. BIM-Knock-down-Zellen zeigten in diesem Modell ebenfalls eine erhöhte Resistenz gegen Glukokortikoide, so dass der Mechanismus der Resistenz eventuell durch die Hemmung von MCL-1 auf BIM erklärt werden könnte (Wei et al., 2006).

4.6. Ausblick

Die in der vorgelegten Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass eine Deregulation des PKB/Akt-Signalweges zur Immunresistenz gegenüber ZTL-vermittelter Zytotoxizität führen kann. Da PKB/Akt in vielen Krebsarten überaktiviert ist, kann dieser Mechanismus die Effektivität von immuntherapeutischen Ansätzen stark einschränken. Diesem kann durch die pharmakologische Inhibierung des PKB/Akt-Signalweges entgegengewirkt werden. Dies wurde am Beispiel des von PKB/Akt-regulierten mTOR-Signalweges erfolgreich gezeigt, dessen Inhibition mit Rapamycin die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber der ZTL-vermittelten Zytotoxizität wiederherstellen konnte.

Eine konstitutive Aktivierung von PKB/Akt ist oftmals mit einem gesteigertem mTOR-Signaling verbunden. Daher könnten Rapamycin bzw. dessen Analoga eine vielversprechende Komplementierung der immunologischen Krebstherapie darstellen. mTOR kommt in der Zelle in zwei unterschiedlichen Komplexen vor: dem Rapamycin-sensitiven Komplex mTOR-Raptor (*Regulatory-associated Protein of mTOR*) und dem Rapamycin-insensitiven Komplex mTOR-Rictor (*Rapamycin-insensitive Companion of mTOR*) (Loewith et al., 2002; Kim et al., 2002). Der Rapamycin-sensitive Komplex mTOR-Raptor kontrolliert Vorgänge des zellulären Wachstums durch Regulation der Proteinbiosynthese. Diese Regulation steht in Abhängigkeit zur Energieversorgung der Zelle und läuft hauptsächlich über S6K1 ab, welche von mTOR-Raptor gemeinsam mit PDK1 phosphoryliert und somit aktiviert wird (Fingar and Blenis, 2004).

Die Regulation des mTOR-Raptor-Komplexes ist bisher noch nicht endgültig aufgeklärt. Allerdings gibt es Hinweise, dass eine PKB/Akt-abhängige Regulation über TSC2 abläuft. PKB/Akt wirkt inhibierend auf TSC2, was im Weiteren in einer Aktivierung des Rapamycin-sensitiven mTOR-Raptor-Signalweges mündet (McManus and Alessi, 2002). Die damit einhergehende Aktivierung der Proteinbiosynthese könnte Tumorzellen einen Wachstumsvorteil bringen, der durch Rapamycin durchbrochen werden kann. So könnten durch gleichzeitige Chemo- oder Immuntherapie und Inhibition des mTOR-Signalweges synergistische Effekte erzielt werden (Sarbasov et al., 2006).

Da der hier identifizierte Mechanismus in einem artifiziellen System von Bedeutung ist, stellt sich die Frage, inwieweit die gewonnenen Ergebnisse auf andere Zellsysteme übertragbar sind. Diese Fragestellung könnte mit weiteren

Untersuchungen in etablierten Krebszelllinien und/oder zusätzlichen Mausmodellen geklärt werden.

Die hier beobachtete Immunresistenz lässt sich in diesem Modell auf eine posttranskriptionelle Stabilisierung des anti-apoptotischen Mitglieds der BCL-2-Familie, MCL-1, zurückführen. Da die Aufregulation von MCL-1 durch Rapamycin-Gabe und Inhibition des mTOR-Signalweges aufgehoben werden kann, könnten sich weitere Untersuchungen anschließen, die den genauen Zusammenhang der Wirkung von mTOR auf die MCL-1-Stabilisierung aufklären.

In der hier vorgelegten Arbeit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass eine Deregulation des PKB/Akt-Signalweges zur Resistenz gegenüber zellulären Immuntherapien *in vitro* und *in vivo* führt. Des Weiteren konnte eine pharmakologische Suppression des PKB/Akt-Signalweges (simuliert durch den Entzug von Tamoxifen) oder eine Repression wichtiger Effektoren der Resistenz (simuliert durch die shRNA-medierte Suppression von endogenem MCL-1 bzw. Rapamycin-Behandlung) Wege aufweisen, wie die Effektivität zellulärer Krebsimmuntherapien verbessert werden kann.

5. Literaturverzeichnis

- 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.
- Adrain,C., Murphy,B.M., and Martin,S.J. (2005). Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. *J. Biol. Chem.* *280*, 4663-4673.
- Ahmed,N.N., Franke,T.F., Bellacosa,A., Datta,K., Gonzalez-Portal,M.E., Taguchi,T., Testa,J.R., and Tschlis,P.N. (1993). The proteins encoded by c-akt and v-akt differ in post-translational modification, subcellular localization and oncogenic potential. *Oncogene* *8*, 1957-1963.
- Alessi,D.R., Andjelkovic,M., Caudwell,B., Cron,P., Morrice,N., Cohen,P., and Hemmings,B.A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* *15*, 6541-6551.
- Altomare,D.A., Guo,K., Cheng,J.Q., Sonoda,G., Walsh,K., and Testa,J.R. (1995). Cloning, chromosomal localization and expression analysis of the mouse Akt2 oncogene. *Oncogene* *11*, 1055-1060.
- Altomare,D.A., Lyons,G.E., Mitsuuchi,Y., Cheng,J.Q., and Testa,J.R. (1998). Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the AKT2 kinase is activated by insulin. *Oncogene* *16*, 2407-2411.
- Amaravadi,R. and Thompson,C.B. (2005). The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J. Clin. Invest.* *115*, 2618-2624.
- An,S. and Knox,K.A. (1996). Ligation of CD40 rescues Ramos-Burkitt lymphoma B cells from calcium ionophore- and antigen receptor-triggered apoptosis by inhibiting activation of the cysteine protease CPP32/Yama and cleavage of its substrate PARP. *FEBS Lett.* *386*, 115-122.
- Anderson,K.E., Coadwell,J., Stephens,L.R., and Hawkins,P.T. (1998). Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr. Biol.* *8*, 684-691.
- Andjelkovic,M., Alessi,D.R., Meier,R., Fernandez,A., Lamb,N.J., Frech,M., Cron,P., Cohen,P., Lucocq,J.M., and Hemmings,B.A. (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J. Biol. Chem.* *272*, 31515-31524.
- Andrade,F., Casciola-Rosen,L.A., and Rosen,A. (2004). Granzyme B-induced cell death. *Acta Haematol.* *111*, 28-41.
- Aoki,M., Batista,O., Bellacosa,A., Tschlis,P., and Vogt,P.K. (1998). The akt kinase: molecular determinants of oncogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 14950-14955.
- Appelbaum,F.R. (2001). Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* *411*, 385-389.
- Balendran,A., Casamayor,A., Deak,M., Paterson,A., Gaffney,P., Currie,R., Downes,C.P., and Alessi,D.R. (1999). PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2. *Curr. Biol.* *9*, 393-404.
- Baxter,A.G. and Cooke,A. (1993). Complement lytic activity has no role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* *42*, 1574-1578.
- Bellacosa,A., Testa,J.R., Staal,S.P., and Tschlis,P.N. (1991). A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* *254*, 274-277.

- Bennink, J.R., Anderson, R., Bacik, I., Cox, J., Day, P., Deng, Y., Lapham, C., Link, H., Russ, G., and Yewdell, J.W. (1993). Antigen processing: where tumor-specific T-cell responses begin. *J. Immunother.* *14*, 202-208.
- Bjornsti, M.A. and Houghton, P.J. (2004). The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 335-348.
- Blattman, J.N. and Greenberg, P.D. (2004). Cancer Immunotherapy: A Treatment for the Masses. *Science* *305*, 200-205.
- Boldin, M.P., Goncharev, T.M., Goltsev, Y.V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor-induced cell death. *Cell* *85*, 803-815.
- Bosma, M., Schuler, W., and Bosma, G. (1988). The scid mouse mutant. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *137*, 197-202.
- Botto, M. (2004). Phosphatidylserine receptor and apoptosis: consequences of a non-ingested meal. *Arthritis Res. Ther.* *6*, 147-150.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248-254.
- Brenner, C., Nakayama, N., Goebel, M., Tanaka, K., Toh-e A, and Matsumoto, K. (1988). CDC33 encodes mRNA cap-binding protein eIF-4E of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *8*, 3556-3559.
- Brodbeck, D., Cron, P., and Hemmings, B.A. (1999). A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. *J. Biol. Chem.* *274*, 9133-9136.
- Browne, K.A., Blink, E., Sutton, V.R., Froelich, C.J., Jans, D.A., and Trapani, J.A. (1999). Cytosolic delivery of granzyme B by bacterial toxins: evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of perforin. *Mol. Cell Biol.* *19*, 8604-8615.
- Chai, J., Wu, Q., Shiozaki, E., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., and Shi, Y. (2001). Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding. *Cell* *107*, 399-407.
- Chao, J.R., Wang, J.M., Lee, S.F., Peng, H.W., Lin, Y.H., Chou, C.H., Li, J.C., Huang, H.M., Chou, C.K., Kuo, M.L., Yen, J.J., and Yang-Yen, H.F. (1998). mcl-1 is an immediate-early gene activated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) signaling pathway and is one component of the GM-CSF viability response. *Mol. Cell Biol.* *18*, 4883-4898.
- Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C.S. (2005). Differential Targeting of Prosurvival Bcl-2 Proteins by Their BH3-Only Ligands Allows Complementary Apoptotic Function. *Mol. Cell* *17*, 393-403.
- Chen, W.S., Xu, P.Z., Gottlob, K., Chen, M.L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., Kadowaki, T., and Hay, N. (2001). Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev.* *15*, 2203-2208.
- Cheng, J.Q., Godwin, A.K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T.F., Hamilton, T.C., Tsichlis, P.N., and Testa, J.R. (1992). AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 9267-9271.
- Cho, H., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Feng, F., and Birnbaum, M.J. (2001a). Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J. Biol. Chem.* *276*, 38349-38352.

- Cho,H., Mu,J., Kim,J.K., Thorvaldsen,J.L., Chu,Q., Crenshaw,E.B., III, Kaestner,K.H., Bartolomei,M.S., Shulman,G.I., and Birnbaum,M.J. (2001b). Insulin Resistance and a Diabetes Mellitus-Like Syndrome in Mice Lacking the Protein Kinase Akt2 (PKBbeta). *Science* 292, 1728-1731.
- Coffer,P.J. and Woodgett,J.R. (1991). Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur. J. Biochem.* 201, 475-481.
- Couch,F.J., Wang,X.Y., Wu,G.J., Qian,J., Jenkins,R.B., and James,C.D. (1999). Localization of PS6K to chromosomal region 17q23 and determination of its amplification in breast cancer. *Cancer Res.* 59, 1408-1411.
- Cuconati,A., Mukherjee,C., Perez,D., and White,E. (2003). DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes Dev.* 17, 2922-2932.
- Datta,S.R., Brunet,A., and Greenberg,M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *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.
- De,B.A., Joshi-Barve,S., Rinker-Schaeffer,C., and Rhoads,R.E. (1991). Expression of antisense RNA against initiation factor eIF-4E mRNA in HeLa cells results in lengthened cell division times, diminished translation rates, and reduced levels of both eIF-4E and the p220 component of eIF-4F. *Mol. Cell Biol.* 11, 5435-5445.
- 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.
- Deprez,J., Vertommen,D., Alessi,D.R., Hue,L., and Rider,M.H. (1997). Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *J. Biol. Chem.* 272, 17269-17275.
- 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.
- 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.
- Ellis,R.E., Yuan,J.Y., and Horvitz,H.R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 663-698.
- 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.
- Fingar,D.C. and Blenis,J. (2004). Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 23, 3151-3171.
- Fox,C.J., Hammerman,P.S., and Thompson,C.B. (2005). The Pim kinases control rapamycin-resistant T cell survival and activation. *J. Exp. Med.* 201, 259-266.
- Froelich,C.J., Orth,K., Turbov,J., Seth,P., Gottlieb,R., Babior,B., Shah,G.M., Bleackley,R.C., Dixit,V.M., and Hanna,W. (1996). New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. *Target*

cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271, 29073-29079.

Fujise, K., Zhang, D., Liu, J., and Yeh, E.T. (2000). Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* 275, 39458-39465.

Garofalo, R.S., Orena, S.J., Rafidi, K., Torchia, A.J., Stock, J.L., Hildebrandt, A.L., Coskran, T., Black, S.C., Brees, D.J., Wicks, J.R., McNeish, J.D., and Coleman, K.G. (2003). Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J. Clin. Invest.* 112, 197-208.

Gelinas, C. and White, E. (2005). BH3-only proteins in control: specificity regulates MCL-1 and BAK-mediated apoptosis. *Genes Dev.* 19, 1263-1268.

Giardiello, F.M., Welsh, S.B., Hamilton, S.R., Offerhaus, G.J., Gittelsohn, A.M., Booker, S.V., Krush, A.J., Yardley, J.H., and Luk, G.D. (1987). Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *N. Engl. J. Med.* 316, 1511-1514.

Graham, F.L. and van der Eb, A.J. (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 54, 536-539.

Green, D.R. (1998). Apoptotic pathways: Roads to ruin. *Cell* 94, 695-698.

Green, D.R. (2000). Apoptotic Pathways: Paper Wraps Stone Blunts Scissors. *Cell* 102, 1-4.

Green, D.R. and Kroemer, G. (2004). The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. *Science* 305, 626-629.

Heibein, J.A., Goping, I.S., Barry, M., Pinkoski, M.J., Shore, G.C., Green, D.R., and Bleackley, R.C. (2000). Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members Bid and Bax. *J. Exp. Med.* 192, 1391-1402.

Hennessy, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y., and Mills, G.B. (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 988-1004.

Hresko, R.C. and Mueckler, M. (2005). mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 40406-40416.

Huber, C., Bobek, N., Kuball, J., Thaler, S., Hoffarth, S., Huber, C., Theobald, M., and Schuler, M. (2005). Inhibitors of apoptosis confer resistance to tumour suppression by adoptively transplanted cytotoxic T lymphocytes *in vitro* and *in vivo*. *Cell Death Differ.* 12, 317-325.

Igney, F.H. and Krammer, P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* 2, 277-288.

Jacobson, M.D., Weil, M., and Raff, M.C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* 88, 347-354.

Jamil, S., Sobouti, R., Hojabrpour, P., Raj, M., Kast, J., and Duronio, V. (2005). A proteolytic fragment of Mcl-1 exhibits nuclear localization and regulates cell growth by interaction with Cdk1. *Biochem. J.* 387, 659-667.

Ju, S.T., Cui, H., Panka, D.J., Ettinger, R., and Marshak-Rothstein, A. (1994). Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4+ Th1 and CD8+ cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 4185-4189.

Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K.J., Podack, E.R., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1994a). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369, 31-37.

- Kagi,D., Ledermann,B., Burki,K., Seiler,P., Odermatt,B., Olsen,K.J., Podack,E.R., Zinkernagel,R.M., and Hengartner,H. (1994b). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369, 31-37.
- Kagi,D., Vignaux,F., Ledermann,B., Burki,K., Depraetere,V., Nagata,S., Hengartner,H., and Golstein,P. (1994c). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 265, 528-530.
- Kataoka,S., Satoh,J., Fujiya,H., Toyota,T., Suzuki,R., Itoh,K., and Kumagai,K. (1983). Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity. *Diabetes* 32, 247-253.
- Kataoka,T. (2005). The caspase-8 modulator c-FLIP. *Crit Rev. Immunol.* 25, 31-58.
- Kaufmann,S.H., Karp,J.E., Svingen,P.A., Krajewski,S., Burke,P.J., Gore,S.D., and Reed,J.C. (1998). Elevated expression of the apoptotic regulator Mcl-1 at the time of leukemic relapse. *Blood* 91, 991-1000.
- Kerr,J.F., Wyllie,A.H., and Currie,A.R. (1972). Apoptosis: A basic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.
- Kim,D.H., Sarbassov,D.D., Ali,S.M., King,J.E., Latek,R.R., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., and Sabatini,D.M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163-175.
- Klippel,A., Escobedo,M.A., Wachowicz,M.S., Apell,G., Brown,T.W., Giedlin,M.A., Kavanaugh,W.M., and Williams,L.T. (1998). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient for cell cycle entry and promotes cellular changes characteristic of oncogenic transformation. *Mol. Cell Biol.* 18, 5699-5711.
- Konopleva,M., Contractor,R., Tsao,T., Samudio,I., Ruvolo,P.P., Kitada,S., Deng,X., Zhai,D., Shi,Y.-X., Sneed,T., Verhaegen,M., Soengas,M., Ruvolo,V.R., McQueen,T., Schober,W.D., Watt,J.C., Jiffar,T., Ling,X., Marini,F.C., Harris,D., Dietrich,M., Estrov,Z., McCubrey,J., May,W.S., Reed,J.C., and Andreeff,M. (2006). Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 10, 375-388.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lavrik,I., Krueger,A., Schmitz,I., Baumann,S., Weyd,H., Krammer,P.H., and Kirchhoff,S. (2003). The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death. Differ.* 10, 144-145.
- Li,B.D., Gruner,J.S., Abreo,F., Johnson,L.W., Yu,H., Nawas,S., McDonald,J.C., and DeBenedetti,A. (2002). Prospective study of eukaryotic initiation factor 4E protein elevation and breast cancer outcome. *Ann. Surg.* 235, 732-738.
- Li,H., Zhou,H., Xu,C.-J., and Yuan,J. (1998). Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Li,J., Yen,C., Liaw,D., Podsypanina,K., Bose,S., Wang,S.I., Puc,J., Miliareis,C., Rodgers,L., McCombie,R., Bigner,S.H., Giovanella,B.C., Ittmann,M., Tycko,B., Hibshoosh,H., Wigler,M.H., and Parsons,R. (1997a). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943-1947.
- Li,P., Nijhawan,D., Budihardjo,I., Srinivasula,S.M., Ahmad,M., Alnemri,E.S., and Wang,X. (1997b). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Liaw,D., Marsh,D.J., Li,J., Dahia,P.L., Wang,S.I., Zheng,Z., Bose,S., Call,K.M., Tsou,H.C., Peacocke,M., Eng,C., and Parsons,R. (1997). Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat. Genet.* 16, 64-67.

- Lichtenheld, M.G. and Podack, E.R. (1989). Structure of the human perforin gene. A simple gene organization with interesting potential regulatory sequences. *J. Immunol.* **143**, 4267-4274.
- Littlewood, T.D., Hancock, D.C., Danielian, P.S., Parker, M.G., and Evan, G.I. (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucl. Acid. Res.* **23**, 1686-1690.
- Liu, H., Peng, H.W., Cheng, Y.S., Yuan, H.S., and Yang-Yen, H.F. (2005). Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. *Mol. Cell Biol.* **25**, 3117-3126.
- 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.
- Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell* **104**, 487-501.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschlegel, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., and Hall, M.N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell* **10**, 457-468.
- Lowe, S.W., Cepero, E., and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**, 307-315.
- Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A.S., Dejardin, E., and Green, D.R. (2006). Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Apoptosis by Destabilization of MCL-1. *Mol. Cell* **21**, 749-760.
- Mayo, L.D. and Donner, D.B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 11598-11603.
- McManus, E.J. and Alessi, D.R. (2002). TSC1-TSC2: a complex tale of PKB-mediated S6K regulation. *Nat. Cell Biol.* **4**, E214-E216.
- Medema, J.P., de Jong, J., Peltenburg, L.T.C., Verdegaal, E.M.E., Gorter, A., Bres, S.A., Franken, K.L.M.C., Hahne, M., Albar, J.P., Melief, C.J.M., and Offringa, R. (2001). Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 11515-11520.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology* **24**, 17-27.
- Muzio, M., Chinnayan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Peter, M.E., Krammer, P.H., and Dixit, V.M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (APO-1/Fas) death inducing signaling complex. *Cell* **85**, 817-827.
- Nakatani, K., Thompson, D.A., Barthel, A., Sakaue, H., Liu, W., Weigel, R.J., and Roth, R.A. (1999). Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J. Biol. Chem.* **274**, 21528-21532.
- Nguyen, M., Millar, D.G., Yong, V.W., Korsmeyer, S.J., and Shore, G.C. (1993). Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J. Biol. Chem.* **268**, 25265-25268.
- Nijhawan, D., Fang, M., Traer, E., Zhong, Q., Gao, W., Du, F., and Wang, X. (2003). Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev.* **17**, 1475-1486.

- Nishikawa,S. and Sasaki,F. (1996). Phagocytotic processing of apoptotic bodies of transitional ameloblasts by MHC Class II-expressing macrophages in rat incisor. *J. Histochem. Cytochem.* **44**, 1459-1467.
- Obrig,T.G., Culp,W.J., McKeehan,W.L., and Hardesty,B. (1971). The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J. Biol. Chem.* **246**, 174-181.
- Oltersdorf,T., Elmore,S.W., Shoemaker,A.R., Armstrong,R.C., Augeri,D.J., Belli,B.A., Bruncko,M., Deckwerth,T.L., Dinges,J., Hadjuk,P.J., Joseph,M.K., Kitada,S., Korsmeyer,S.J., Kunzer,A.R., Letai,A., Li,C., Mitten,M.J., Nettesheim,D.G., Ng,S., Nimmer,P.M., O'Connor,J.M., Oleksijew,A., Petros,A.M., Reed,J.C., Shen,W., Tahir,S.K., Thompson,C.B., Tomaselli,K.J., Wang,B., Wendt,M.D., Zhang,H., Fesik,S.W., and Rosenberg,S.H. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* **435**, 677-681.
- Opferman,J.T., Letai,A., Beard,C., Sorcinelli,M.D., Ong,C.C., and Korsmeyer,S.J. (2003). Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* **426**, 671-676.
- 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.
- Peng,X.D., Xu,P.Z., Chen,M.L., Hahn-Windgassen,A., Skeen,J., Jacobs,J., Sundararajan,D., Chen,W.S., Crawford,S.E., Coleman,K.G., and Hay,N. (2003). Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev.* **17**, 1352-1365.
- Persad,S., Attwell,S., Gray,V., Mawji,N., Deng,J.T., Leung,D., Yan,J., Sanghera,J., Walsh,M.P., and Dedhar,S. (2001). Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J. Biol. Chem.* **276**, 27462-27469.
- Pinkoski,M.J., Hobman,M., Heibein,J.A., Tomaselli,K., Li,F., Seth,P., Froelich,C.J., and Bleackley,R.C. (1998). Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. *Blood* **92**, 1044-1054.
- Podack,E.R., Young,J.D., and Cohn,Z.A. (1985). Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**, 8629-8633.
- Ravi,R., Fuchs,E.J., Jain,A., Pham,V., Yoshimura,K., Prouser,T., Jalla,S., Zhou,X., Garrett-Mayer,E., Kaufmann,S.H., Schulick,R.D., Pardoll,D.M., and Bedi,A. (2006). Resistance of cancers to immunologic cytotoxicity and adoptive immunotherapy via X-linked inhibitor of apoptosis protein expression and coexisting defects in mitochondrial death signaling. *Cancer Res.* **66**, 1730-1739.
- Revell,P.A., Grossman,W.J., Thomas,D.A., Cao,X., Behl,R., Ratner,J.A., Lu,Z.H., and Ley,T.J. (2005). Granzyme B and the Downstream Granzymes C and/or F Are Important for Cytotoxic Lymphocyte Functions. *J. Immunol.* **174**, 2124-2131.
- Rinkenberger,J.L., Horning,S., Klocke,B., Roth,K., and Korsmeyer,S.J. (2000). Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev.* **14**, 23-27.
- Rodriguez,J. and Lazebnik,Y.A. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* **13**, 3179-3184.
- Salerno,A., Bonanno,C.T., Caccamo,N., Cigna,D., Dominici,R., Ferro,C., Sireci,G., and Dieli,F. (1998). The effect of cyclosporin A, FK506 and rapamycin on the murine contact sensitivity reaction. *Clin. Exp. Immunol.* **112**, 112-119.

- 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.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.-H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., and Sabatini, D.M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell* 22, 159-168.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.
- Shaw, R.J., Bardeesy, N., Manning, B.D., Lopez, L., Kosmatka, M., DePinho, R.A., and Cantley, L.C. (2004). The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* 6, 91-101.
- Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W.L., Baldocchi, R., Godfrey, T., Collins, C., Pinkel, D., Powell, B., Mills, G.B., and Gray, J.W. (1999). PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat. Genet.* 21, 99-102.
- Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell* 9, 459-470.
- Shinkai, Y., Takio, K., and Okumura, K. (1988). Homology of perforin to the ninth component of complement (C9). *Nature* 334, 525-527.
- Shultz, L.D., Schweitzer, P.A., Christianson, S.W., Gott, B., Schweitzer, I.B., Tennent, B., McKenna, S., Mobraaten, L., Rajan, T.V., Greiner, D.L., and . (1995). Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J. Immunol.* 154, 180-191.
- Slavik, J.M., Lim, D.G., Burakoff, S.J., and Hafler, D.A. (2001). Uncoupling p70(s6) kinase activation and proliferation: rapamycin-resistant proliferation of human CD8(+) T lymphocytes. *J. Immunol.* 166, 3201-3209.
- Sorrells, D.L., Meschonat, C., Black, D., and Li, B.D. (1999). Pattern of amplification and overexpression of the eukaryotic initiation factor 4E gene in solid tumor. *J. Surg. Res.* 85, 37-42.
- 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.
- Staal, S.P., Huebner, K., Croce, C.M., Parsa, N.Z., and Testa, J.R. (1988). The AKT1 proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32. *Genomics* 2, 96-98.
- Stennicke, H.R. and Salvesen, G.S. (2000). Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 299-306.
- Swannie, H.C. and Kaye, S.B. (2002). Protein kinase C inhibitors. *Curr. Oncol. Rep.* 4, 37-46.
- Talanian, R.V., Yang, X., Turbov, J., Seth, P., Ghayur, T., Casiano, C.A., Orth, K., and Froelich, C.J. (1997). Granule-mediated killing: pathways for granzyme B-initiated apoptosis. *J. Exp. Med.* 186, 1323-1331.
- Theobald, M., Biggs, J., Dittmer, D., Levine, A.J., and Sherman, L.A. (1995). Targeting p53 as a general tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 11993-11997.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76, 4350-4354.
- Tschopp, O., Yang, Z.Z., Brodbeck, D., Dummler, B.A., Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., Michaelis, T., Frahm, J., and Hemmings, B.A. (2005). Essential role of protein kinase B gamma (PKB

gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* 132, 2943-2954.

van Delft, M.F., Wei, A.H., Mason, K.D., Vandenberg, C.J., Chen, L., Czabotar, P.E., Willis, S.N., Scott, C.L., Day, C.L., Cory, S., Adams, J.M., Roberts, A.W., and Huang, D.C.S. (2006). The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* 10, 389-399.

Vanhaesebroeck, B. and Alessi, D.R. (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* 346 Pt 3, 561-576.

Vega, F., Medeiros, L.J., Leventaki, V., Atwell, C., Cho-Vega, J.H., Tian, L., Claret, F.X., and Rassidakis, G.Z. (2006). Activation of mammalian target of rapamycin signaling pathway contributes to tumor cell survival in anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Res.* 66, 6589-6597.

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.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N. (2005). Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann. Hematol.* 84, 627-639.

Vitiello, A., Marchesini, D., Furze, J., Sherman, L.A., and Chesnut, R.W. (1991). Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex. *J. Exp. Med.* 173, 1007-1015.

Walczak, H. and Krammer, P.H. (2000). The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp. Cell Res.* 256, 58-66.

Wang, K., Gross, A., Waksman, G., and Korsmeyer, S.J. (1998). Mutagenesis of the BH3 domain of BAX identifies residues critical for dimerization and killing. *Mol. Cell Biol.* 18, 6083-6089.

Warr, M.R., Acoca, S., Liu, Z., Germain, M., Watson, M., Blanchette, M., Wing, S.S., and Shore, G.C. (2005). BH3-ligand regulates access of MCL-1 to its E3 ligase. *FEBS Lett.* 579, 5603-5608.

Wei, G., Twomey, D., Lamb, J., Schlis, K., Agarwal, J., Stam, R.W., Opferman, J.T., Sallan, S.E., den Boer, M.L., Pieters, R., Golub, T.R., and Armstrong, S.A. (2006). Gene expression-based chemical genomics identifies rapamycin as a modulator of MCL1 and glucocorticoid resistance. *Cancer Cell* 10, 331-342.

Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., and Huang, D.C. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 19, 1294-1305.

Wymann, M.P., Zvelebil, M., and Laffargue, M. (2003). Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 366-376.

Yan, H., Frost, P., Shi, Y., Hoang, B., Sharma, S., Fisher, M., Gera, J., and Lichtenstein, A. (2006). Mechanism by which mammalian target of rapamycin inhibitors sensitize multiple myeloma cells to dexamethasone-induced apoptosis. *Cancer Res.* 66, 2305-2313.

Zhong, Q., Gao, W., Du, F., and Wang, X. (2005). Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* 121, 1085-1095.

Zinkernagel, R.M. and Doherty, P.C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701-702.

6. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. _____ für die Überlassung des interessanten Themas und die intensive Betreuung. Besonders möchte ich _____ für seine fortwährende Unterstützung während des Verlaufs der Arbeit weit über das Fachliche hinaus, seine Geduld und sein großes Engagement für die Arbeitsgruppe danken.

Herrn Prof. Dr. _____ möchte ich herzlich für die Möglichkeit, in seiner Gruppe zu arbeiten, und die Mitbetreuung der Forschungsarbeit danken.

Herrn Prof. _____ danke ich herzlich für die Übernahme der Betreuung meiner Promotionsarbeit am Fachbereich Biologie.

_____ kann ich gar nicht genug danken: Zum einen für die fachliche Hilfe und Unterstützung, zum anderen für die vielen lustigen und verrückten Augenblicke im Labor, die Aufmunterung, wenn mal wieder was nicht so lief, wie es sollte und das Korrekturlesen. Ohne _____ wäre der Umzug und der Abschied von unserem Kellerlabor noch schwerer gewesen.

_____ und _____ möchte ich für die tolle Stimmung und die Unterstützung besonders in den letzten Monaten danken.

Bei Frau Dr. _____ möchte ich mich für die fachliche Unterstützung und für die Gesellschaft an so manch langen Laborabenden bedanken.

Ebenso möchte ich allen anderen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe ganz herzlich für die tolle Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die stetige Diskussionsbereitschaft danken.

_____ möchte ich ganz besonders für die Arbeitsgruppen-übergreifende Hilfe bei vielen fachlichen Fragen, die herzliche Aufnahme in die „Kellergemeinschaft“ und die vielen schönen Momente danken.

und danke ich ganz, ganz herzlich für die intensive Einarbeitung in viele interessante Methoden.

Ebenso möchte ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der AG für die Hilfsbereitschaft und die Möglichkeit, in ihrem Labor zu arbeiten, danken.

und möchte ich ganz herzlich für die Hilfe am FACS danken; besonders für Tipps und Tricks, das Alte wieder zum Laufen zu kriegen und für die Möglichkeit, auch mal „zwischen durch“ am Neuen zu messen.

Den Mitarbeitern des TVZ der III. Med. Klinik möchte ich für die Einarbeitung an den Geräten, die fachliche Unterstützung und die Hilfsbereitschaft danken.

Bei allen Mitarbeitern des ZVTE bedanke ich mich für die Unterstützung und die fachliche Kompetenz bei der Tierhaltung.

und danke ich für viele aufmunternde Gespräche und Mails, in denen es ständig um die Arbeit ging.

möchte ich ganz besonders für seine unendliche Geduld und seine Rücksichtnahme in den letzten Monaten danken.

Meiner Mutter danke ich ganz besonders für die Ermöglichung meiner Ausbildung und die fortwährende, liebevolle Unterstützung auf meinem Lebensweg.

1. Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
4E-BP1	4E-Binding Protein1
Akt	Acute transforming retrovirus thymoma
ALCL	Anaplastic Large Cell Lymphoma
AMPK	Adenosin Monophosphatase (AMP)-depent Kinase
APAF-1	Apoptotic protease activating factor 1
Apo-1	Apoptosis-1
Aqua dest.	Aqua destillata
BAD	BCL-2/BCL-x _L -antagonist, causing cell death
BAK	BCL-2 antagonist Killer-1
BAX	BCL-2 associated X-Protein
BCL	B-cell CLL/lymphoma
BH	BCL-2 Homologie
BID	BCL-2 interacting domain
BIK	BCL2-interacting killer
BIM	BCL-2-like 11
BIR	Baculoviral-IAP-Repeats
BLK	BIK-like killer
BOK	BCL-2 related ovarian killer
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
Ca	Kalzium
CAD	caspase-activated DNase
CD	Cluster of Differentiation
CDK1	Cyclin Dependent Kinase 1
CFDA	carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
c-FLIP	cellular FLICE-inhibitory protein
DED	Death Effector Domain
DIABLO	direct IAP-binding protein with low. pl
DISC	Deah Inducing Signaling Complex
DLI	Donor Lymphocyte Infusion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dnFADD	dominat negatives FADD
dNTP	Deoxynukleosidtriphoshat
E:T	Effektor zu Target
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF4E	eukaryotic Initiation Factor-4E
ER	Östrogen-Rezeptor-Bindungsdomäne
FADD	Fas associated death domain
Fas	fibroblast associated
FasL	Fas Ligand
FKS	Fötales Kälberserum
G	Gramm
GPCR	G-protein coupled receptor
GSK3-β	Glucose-Synthase-Kinase 3-β
Gy	Gray
H	Stunde

HA	Hämagglutinin
HCl	Salzsäure
HLA	Human Leukocyte Antigen
i.p.	Interperitoneal
i.v.	intravenös
IAP	Inhibitors of Apoptosis Proteine
ICAD	Inhibitor of caspase-activated DNase
IGFBP-1	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1
IP	Immunpräzipitation
KCl	Kalziumchlorid
kD	Kilodalton
Kg	Kilogramm
LOH	loss of heterozygosity
M	Molar
MCL-1	myeloid cell leukemia sequence 1
Mdm2	mouse-double-minute 2
Mef	Murine embryonale Fibroblasten
Mg	Magnesium
MHC I	Major-Histocompatibility-Complex I
Min	Minute
mLST8	mammalian ortholog of LST8
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
mTOR-Raptor	Regulatory-associated Protein of mTOR
mTOR-Rictor	Rapamycin-insensitive Companion of mTOR
NaCl	Natriumchlorid
NF-kappaB	nuclear factor-KappaB
NK	Natural Killer
nM	Nanomolar
Nm	Nanometer
NOD/SCID	Non Obese Diabetic / Severe Combined Immundeficiency
NOXA	Damage protein, a pro-apoptotic BH3-containing protein
p21/Waf1/Cip1	Protein21 CDK-interacting protein1/Wildtype p53-activated fragment 1
p27/Kip2	Protein27/ kinase inhibitor protein 2
p53	Protein 53
p70S6K	p70-ribosomale-Protein-S6-Kinase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Protein
PBS	Phosphat-buffered saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDK1	Pyruvate dehydrogenase kinase 1
PFK2	6-Phosphofruktose 2-Kinase
PH	Plekstrin Homologie
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis

RAP	Rapamycin
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction
S	Sekunde
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	Short hairpin Ribonucleic acid
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspase
β -MSH	β -Mercaptoethanol
STK11	Serin/Threonin-Kinase 11
STS	Staurosporin
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
TAM	Tamoxifen
tBID	trunkiertes BID
Thr	Threonin
TMRE	Tetramethylrhodaminethylesterperchlorat
TNF-r1	Tumor Necrosis Faktor Rezeptor 1
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex Protein 2
U/minute	Umdrehungen pro minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
wt	wildtypisch
ZTL	Zytotoxische T-Zellen
Z-VAD-FMK	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Aspfluoromethylketon

Für Mengen-, Größen-, Zeit- und weitere physikalische Angaben wurden SI-Einheiten benutzt.

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.:	Granzym B-vermittelte Aktivierung der Apoptose	7
Abbildung 1.2.:	Schematische Darstellung der Caspasenaktivierung	9
Abbildung 1.3.:	Regulation der PKB/Akt	13
Abbildung 1.4.:	ausgewählte Substrate der PKB/Akt	15
Abbildung 3.1.:	Detektion des Fusionsproteins PKB/Akt-ER ^{tam} mittels Immunoblot.	59
Abbildung 3.2.:	A) Schematische Darstellung des PKB/Akt-ER ^{tam} -Fusionsproteins sowie des konditional induzierbaren Expressionssystem. B) Verifikation des konditionalen Expressionssystems <i>in vitro</i> .	60
Abbildung 3.3.:	Kinetik zur Aktivierung des Fusionsproteins PKB/Akt-ER ^{tam} nach Zugabe von Tamoxifen (TAM).	61
Abbildung 3.4.:	<i>in vitro</i> Kinase Assay mit PKB/Akt-ER ^{tam} -Fusionsprotein immunpräzipitiert aus 6 verschiedenen Tumoren.	62
Abbildung 3.5.:	Wachstumsverhalten der mit PKB/Akt-ER ^{tam} transduzierten HLA-A*0201-transgenen Fibroblasten <i>in vitro</i> .	63
Abbildung 3.6.:	Etablierung eines HLA-A*0201-transgenen murinen Tumormodells.	64
Abbildung 3.7.:	Wachstumsverhalten der mit PKB/Akt-ER ^{tam} transduzierten HLA-A*0201-transgenen Fibroblasten <i>in vivo</i> .	65
Abbildung 3.8.:	Verifikation des konditionalen Expressionssystems <i>in vivo</i> .	66
Abbildung 3.9.:	Konditionale Aktivierung von PKB/Akt-ER ^{tam} hemmt vor Staurosporin-induzierter Apoptose.	68
Abbildung 3.10.:	Analyse des von PKB/Akt vermittelten Schutzes im Vergleich zu BCL-x _L .	69
Abbildung 3.11.:	Konditionale Aktivierung von PKB/Akt-ER ^{tam} hemmt vor UV-induzierter Apoptose.	70

Abbildung 3.12.:	Konditionale Aktivierung von PKB/Akt schützt vor ZTL-induzierter Proliferationshemmung.	71
Abbildung 3.13.:	Konditionale PKB/Akt-Aktivierung schützt vor alloreativer ZTL-vermittelter Zytotoxizität im ⁵¹ Chrom-Freisetzungs-Assay.	72
Abbildung 3.14.:	Konditional aktive PKB/Akt-ER ^{tam} schützt gegenüber Zytotoxizität von HLA-A*0201-restringierten, p53-spezifischen ZTL.	73
Abbildung 3.15.:	Konditionale Aktivierung des PKB/Akt-Signalweges schützt maligne Zellen gegenüber ZTL-induziertem Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials $\Delta\Psi_m$.	74
Abbildung 3.16.:	Konditionale Aktivierung des PKB/Akt-Signalweges schützt gegenüber Tumorsuppression durch transplantierte C57Bl/6- Splenozyten.	75
Abbildung 3.17.:	Die Tumorsuppression der adoptiv transplantierten C57Bl/6-Splenozyten wird nicht über Todesrezeptor-vermittelte Apoptose induziert.	76
Abbildung 3.18.:	Untersuchungen zur Charakterisierung der Effektorpopulation <i>in vivo</i> .	78
Abbildung 3.19.:	Immunoblotanalyse der Expression verschiedener anti-apoptotischer Mitglieder der BCL-2-Familie in Tumorlysaten.	80
Abbildung 3.20.:	qRT-PCR-Analyse der RNA-Expression von BCL-2, MCL-1 und BCL-x _L in Abhängigkeit des Aktivierungsstatus von PKB/Akt-ER ^{tam} .	81
Abbildung 3.21.:	Immunoblotanalyse zur posttranskriptionellen Stabilisierung von MCL-1 in Abhängigkeit von konditionaler PKB/Akt-Aktivierung.	82
Abbildung 3.22.:	Immunoblotuntersuchung von CyA2K ^b -PKB/Akt-ER ^{tam} -Mef-Populationen mit Expression verschiedener gegen MCL-1 gerichteter shRNA.	83
Abbildung 3.23.:	„Knock down“ der Expression von endogenem MCL-1 mittels shRNA hebt die PKB/Akt-vermittelte Resistenz gegenüber Immunzellen auf.	84
Abbildung 3.24.:	Wachstumsverhalten von PKB/Akt-ER ^{tam} transduzierten HLA-A*0201-transgenen Fibroblasten mit MCL-1-Repression <i>in vivo</i> .	85

Abbildung 3.25.:	ABT-737 hebt die durch PKB/Akt-vermittelte Resistenz gegenüber Zytostatika-induzierter bzw. UV-induzierter Apoptose nicht auf.	87
Abbildung 3.26.:	ABT-737 hebt die durch BCL-x _L -vermittelte Resistenz gegenüber Zytostatika-induzierter bzw. UV-induzierter Apoptose auf.	88
Abbildung 3.27.:	Rapamycin hebt durch PKB/Akt und MCL-1-vermittelte Resistenz auf und sensitiviert HLA-A*0201-transgene Tumorzellen gegenüber ZTL-vermittelter Zytotoxizität.	89
Abbildung 3.28.:	Immunoblotanalyse von CyA2K ^b -PKB/Akt-ER ^{tam} -Fibrosarkomen aus Mäusen behandelt mit Kombinationen aus Tamoxifen, Rapamycin und/oder Trägersubstanz.	91
Abbildung 3.29.:	Wachstumsverhalten von PKB/Akt-ER ^{tam} transduzierten HLA-A*0201-transgenen Fibroblasten von Rapamycin-Behandlung <i>in vivo</i> .	92
Abbildung 3.30.:	Identifikation eines kritischen Zeitfensters für die PKB/Akt-induzierte Immunresistenz.	94

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1.1.:	Verwendete Lösungen und Puffer	20
Tabelle 2.1.2.:	Verwendete Olikonukleotide für RT-PCR	24
Tabelle 2.1.3.:	Verwendete Plasmide	25
Tabelle 2.1.4.:	verwendete Zelllinien	27
Tabelle 2.1.5.:	verwendete Antikörper	29
Tabelle 2.2.1.:	Reaktionsansatz zur qRT-PCR	39
Tabelle 2.2.2.:	PCR-Programm zur RT-PCR am Light Cycller	39
Tabelle 2.2.3.:	Reaktionsansatz zur Genotypisierung des KO-PFR1-Mausstammes	51
Tabelle 2.2.4.:	PCR-Bedingungen zur Genotypisierung des KO-PFR1-Mausstammes	51
Tabelle 2.2.5.:	Zusammensetzung des Trenngels	55
Tabelle 2.2.6.:	Zusammensetzung des Sammelgels	55

4. shRNA-Sequenzen

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten shRNA-Sequenzen dargestellt.

Bezeichnung	TRC-Nr.	Clone-ID	Accession-Nr.	Sequenz 5' - 3'
shRNA#1	TRCN 00000 04691	NM_0085 62.2- 2992s1c1	NM_008562.2	CCGGCCAGCTCACAAAGGGTG AAATCTCGAGATTTACCCCTTT GTGAGCTGGTTTTT
shRNA#2	TRCN 00000 04692	NM_0085 62.2- 842s1c1	NM_008562.2	CCGGCCAAACACTTAAAGAGC GTA ACTCGAGTTACGCTCTTTA AGTGTTTGGTTTTT
shRNA#3	TRCN 00000 04693	NM_0085 62.2- 803s1c1	NM_008562.2	CCGGGCAGGATTGTGACTCTT ATTTCTCGAGAAATAAGAGTCA CAATCCTGCTTTTT
shRNA#4	TRCN 00000 04694	NM_0085 62.2- 1049s1c1	NM_008562.2	CCGGGTCTGGCATATCTAATAA GATCTCGAGATCTTATTAGATA TGCCAGACTTTTT
shRNA#5	TRCN 00000 04695	NM_0085 62.2- 735s1c1	NM_008562.2	CCGGCGAAGGCGATGTAAAT CTTTCTCGAGAAAGATTTAACA TCGCCTTCGTTTTT

Erklärung:

Hiermit versichere ich, Patricia Serena Hähnel, geboren am 23. Juli 1977 in Mainz, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne Verwendung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die sinngemäß aus veröffentlichten und unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche gekennzeichnet. Die vorgelegte Arbeit wurde weder als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung noch als Dissertation bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich eingereicht.

Mainz, den 15.05.2007

(Patricia Serena Hähnel)