

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Innere Medizin
I. Medizinische Klinik und Poliklinik
Gastroenterologie, Hepatologie,
Infektiologie, Tropenmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. A. W. Lohse
Doktorvater: PD Dr. rer. nat. Johannes Herkel

Wirkungsmechanismus eines anti-apoptischen und anti- inflammatorischen Peptids zur Behandlung degenerativer Erkrankungen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der
Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Marcel Eduard James Brudet
aus Gießen

Hamburg, 2011

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 11.05.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. J. Herkel

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. H.-W. Mittrücker

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. A. W. Lohse

Für meine Eltern Carolina und James,
meine Schwester Sabine
und Maïke

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	3
1.1 <i>Stressin</i>	5
1.2 <i>Stressreize</i>	6
1.2.1 <i>Cisplatin</i>	6
1.2.2 <i>Lipopolysaccharid</i>	7
1.3 <i>Intrazelluläre Enzyme</i>	8
1.3.1 <i>Akt/Proteinkinase B</i>	8
1.3.2 <i>Glykogen Synthase Kinase 3</i>	9
1.3.3 <i>CREB</i>	10
2 Ziel der Untersuchung	12
3 Materialien	13
3.1 <i>Geräte & Materialien</i>	13
3.2 <i>Substanzen</i>	14
3.3 <i>Kits</i>	15
3.4 <i>Antikörper</i>	15
3.6 <i>Computerprogramme</i>	16
4 Methoden	17
4.1 <i>Zellkultur</i>	17
4.2 <i>Anfertigung der Proben für Phospho-Kinase Arrays</i>	18
4.2.1 <i>Cisplatin Ansatz</i>	18
4.2.2 <i>LPS-Ansatz</i>	20
4.3 <i>Human Phospho-Kinase Array</i>	22
4.4 <i>Anfertigung der Proben für Western Blots</i>	25
4.5 <i>Auftrennung der Proteine</i>	27
4.5.1 <i>Herstellung des Polyacrylamidgels</i>	28
4.5.2 <i>SDS-Page</i>	29
4.5.3 <i>Western Blot</i>	29
4.5.4 <i>Immundetektion der Proteine auf Nitrozellulosemembran</i>	29
4.5.5 <i>Stripping von Membranen</i>	30

4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	31
4.7 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	32
4.7.1 Human IL-6.....	32
4.8 MTT-Assay.....	33
4.9 Statistische Auswertung.....	35
5 Ergebnisse.....	36
5.1 Human Phospho-Kinase Array – LPS Ansatz.....	36
5.2 Human Phospho-Kinase Array – Cisplatin Ansatz.....	45
5.3 Western Blots.....	52
5.3.1 P38 α -Western Blots	53
5.3.2 AKT-Western Blots	54
5.3.3 β -Catenin-Western Blots	55
5.3.4 Src-Western Blots.....	56
5.3.5 CREB-Western Blots.....	57
5.4 Stressin Zeitkinetik.....	58
6 Diskussion.....	61
6.1 Wirkung des Stressins über Proteine der Bcl-2 Familie.....	61
6.2 Weitere zellprotektive Effekte von Akt und mögliche Ansatzpunkte für die Wirkungsweise des Stressins.....	63
6.3 Erklärungsmodell der antiinflammatorischen Komponente des Stressins.....	65
6.4 Human Phospho-Kinase Array – Cisplatin Ansatz.....	66
6.5 Zukunftsausblick	66
7 Zusammenfassung	68
8 Abkürzungsverzeichnis	69
9 Literaturverzeichnis	73
10 Danksagung	83
11 Eidesstattliche Versicherung	84

1 Einleitung

Apoptose beschreibt einen aktiv durchgeführten Prozess der Zelle, bei dem der eigene Zelltod unter kontrollierten Bedingungen stattfindet. Zuerst beschrieben wurde dieses Phänomen durch John Kerr, Andrew Wyllie and Alastair Currie im Jahre 1972. Sie prägten den Begriff „Apoptose“, abgeleitet aus dem Griechischen *apo* „weg“ und *ptosis* „Fall“, also „wegfallen“, was im antiken Griechenland auch zur Beschreibung des Fallens der Blätter im Herbst benutzt wurde (Kerr et al. 1972).

Lichtmikroskopisch zeigt sich die Apoptose durch eine Chromatinkondensation, Fragmentierung des Zellkerns und Schrumpfung der Plasmamembran. Die Zelle zerbricht in kleine membranumschlossene Teile, die durch Phagozyten eliminiert werden, ohne dass es zu einer Entzündungsreaktion kommt (Reed 2000). Dieser Mechanismus ist ein elementarer Bestandteil zur Existenz vielzelliger Lebens. Während der embryonalen Entwicklung und Morphogenese, zur Kontrolle der Zellzahl und als Verteidigungsstrategie bei infizierten, mutierten oder beschädigten Zellen kommt Apoptose zum Einsatz (Vaux et al. 1999).

Es gibt viele Auslöser einer solchen Reaktion. Einerseits stammen diese aus der Zelle selbst, andererseits aus ihrer extrazellulären Umgebung. Dabei führt das gleiche Signal nicht immer zum gleichen Ergebnis. Eine Zelle wird die Apoptose einleiten als Resultat aus Informationen, die sie aus ihrer Umgebung erhält, interpretiert im Kontext der inneren Informationen (Williams and Smith, 1993). Signale, die Apoptose bewirken können, führen unter anderen Gegebenheiten zu Proliferation und Differenzierung (Hale et al. 1996). Es sind komplexe Verschaltungen zwischen verschiedenen Signalwegen, die erst in ihrer Summation über Leben und Tod der Zelle entscheiden.

Auf enzymatischer Ebene unterscheidet man bei der Einleitung der Apoptose zwischen einem extrinsischen und einem intrinsischen Signalweg. Das extrinsische System wird durch sog. Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche gesteuert (Ashkenazi et al. 1998). Hierzu gehören unter anderem Fas (Nagata 1999), TNF-R (Baker et al. 1998) oder TRAIL-R (Kim et al. 2003). Ligandenbindung bewirkt eine Oligomerisation der Rezeptoren und Anlagerung von Adapterproteinen wie „Fas-associated death domain“ (FADD) und Caspase-8, die zusammen einen „death-inducing signaling complex“ (DISC) bilden (Thorburn 2004; Kirchkegel et al. 1995). Das intrinsische System ist gekennzeichnet durch den zentralen Schritt der

Permeabilisation der äußeren Mitochondrienmembran und Abgabe von Cytochrom-c aus dem Mitochondrium in das Cytosol (Green et al. 2004; Lucken-Ardjomande et al. 2005). Cytochrom-c verbindet sich mit den Adapterproteinen „Apoptosis protease-activating factor 1“ (Apaf1) und Procaspase-9, die zusammen einen DISC-ähnlichen Komplex, das sog. Apoptosom bilden (Li et al. 1997).

Die Regulation und Ausführung der Permeabilisation der Mitochondrienmembran erfolgt über Proteine der Bcl-2 Familie (Adams et al. 2001). Diese Gruppe teilt sich in pro- und antiapoptotische Mitglieder, die gegeneinander fungieren. Signale aus der Zelle können auf die Homeostase dieser zwei Fraktionen einwirken und so selbst Apoptose fördern wie die Aktivierung des Zellzyklus-Wächers p53 (Wu et al. 2002) oder das Stresssignal „unfolded protein response“ aus dem endoplasmatischen Retikulum (Breckenridge et al. 2003), oder Apoptose hemmen wie die Phosphorylierung der Proteinkinase AKT (Nicholson et al. 2002).

Beide Wege zur Einleitung der Apoptose, extrinsisch und intrinsisch, führen zu einer gemeinsamen Endstrecke, der Aktivierung der zur Familie der Cystein Proteasen gehörenden Caspasen (Kidd et al. 2000). Sie sind die zentralen Initiatoren und Effektoren der Apoptose. Mittlerweile gibt es 14 bekannte Mitglieder dieser Familie. Sie werden als inaktive Zymogene synthetisiert und können durch Spaltung aktiviert werden. Als ausführendes Organ der Apoptose sind sie für die Spaltung vieler zellulärer Substrate, wie Mediatoren und Regulatoren der Apoptose, Strukturproteine, DNS-Reparaturproteine und Zellzyklus Proteine verantwortlich (Degterev et al. 2003). Dieses komplexe System, welches die Apoptose reguliert, funktioniert nicht immer störungsfrei. Dysregulationen der Apoptose, bedingt durch Funktionsstörungen einzelner Proteine, können zu schwerwiegenden pathologischen Gegebenheiten wie Entwicklungsdefekte, Autoimmunerkrankungen, degenerative Erkrankungen oder Neoplasien führen. (Jin et al. 2005). Auch in Stresssituationen können Überreaktionen dieses Systems entstehen. Externe Stressreize wie Hypoxie, Inflammation, nutritive Deprivation, freie Radikale oder ionisierende Strahlung können Auslöser für übermäßigem Zelltod durch Apoptose darstellen. Dies kann zu einem erhöhten substanziellen Verlust an Gewebefunktion führen. Zu beobachten sind solche Reaktionen beispielsweise bei der Amyotrophen Lateralsklerose (Sathasivam et al. 2005), oder nach einem Schlaganfall in den Übergangszonen des Infarktgebiets (Broughton et al. 2009). Hier ist festzustellen, dass die Apoptose den Krankheitsprozess verschlimmert.

Es gibt eindeutige Hinweise, dass ein spezifisches Peptid in den Mechanismus der Apoptose eingreifen und diese unterbinden kann, sodass die Gewebefunktion erhalten bleibt und der Krankheitsprozess verzögert oder aufgehalten wird.

1.1 Stressin

Hierbei handelt es sich um ein synthetisch hergestelltes Peptid, zusammengesetzt aus 7 Aminosäuren, welches einen nachgewiesenen antiapoptotischen und antiinflammatorischen Effekt aufweist. Die Entwicklung des Peptids war ein Zufallsprodukt während des Versuches ein Peptid zu selektieren, welches die carboxy-terminale DNS-Bindungsdomäne des p53-Wächterproteins binden und dessen Funktion beeinflussen kann. Es wurde ein Antikörper erstellt, welcher der räumlichen Struktur dieser Bindungsdomäne entsprach. Dieser wurde auf eine ELISA-Platte gecoatet und mit einer Phagenbibliothek inkubiert, die Millionen unterschiedlich kurzkettige Peptidreste enthielt. Ein Phage mit einem zum Antikörper komplementären Peptidrest konnte selektiert und kloniert werden. In vitro kann das von diesem Phagen abgeleitete Peptid den zytotoxischen Effekt von Cisplatin effektiv unterdrücken und die entzündliche Zytokinsekretion von aktivierten Makrophagen hemmen. In vivo konnte eine Behandlung mit dem Peptid eine autoimmune Neuroinflammation verhindern, sowie Mäuse vor einer letalen Strahlendosis schützen (12% vs. 66% Mortalität; $P=0,0255$). In einem spontanen Mausmodell der Amyotrophen Lateralsklerose konnte das Peptid den Zelltod von Motoneuronen soweit hemmen, dass das Überleben der Mäuse beträchtlich verlängert werden konnte (74% höheres Überlebensintervall; $P=0,004$; im Vergleich: Riluzole nur 8% höheres Überlebensintervall).

1.2 Stressreize

Um die Wirksamkeit und Wirkungsweise des Stressins in vitro untersuchen zu können, habe ich in dieser Arbeit Zellen in unterschiedlichen Ansätzen mit zwei verschiedenen Substanzen vorbehandelt, die als äußerer Stressreiz auf die Zellen einwirken. Zum einen war dies Cisplatin als proapoptotische Substanz, zum anderen LPS als proinflammatorische Substanz.

1.2.1 Cisplatin

Cisplatin (Cis-Diammindichloridplatin, Cis-DDP) ist ein anorganisches Chemotherapeutikum, welches zur Therapie verschiedener Tumorerkrankungen eingesetzt wird. Hauptanwendungsgebiete sind Tumore des Urogenitaltraktes, besonders Hoden- und Ovarialtumore, Bronchialkarzinome sowie Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Halsbereich (Aktories et al. 2005). Es handelt sich um ein planares Molekül, welches an seinem zentralen Platinatom zwei cis-ständige Chloridliganden und zwei Amin-Gruppen aufweist (Aktories et al. 2005). Die zytostatische Wirkung von Cisplatin wurde zuerst durch Barnett Rosenberg im Jahre 1965 entdeckt (Rosenberg et al. 1965). Hier wurde eine Hemmung der Zellteilung von *Escherichia coli* Bakterien beschrieben. Im Jahre 1969 konnte dieser auch einen antitumorösen Effekt des Cisplatins im Mausmodell nachweisen (Rosenberg et al. 1969). Die zytotoxische Wirkung des Cisplatins beruht auf der Interaktion des Moleküls mit DNA, was letztendlich zur Einleitung des programmierten Zelltods, der Apoptose, führt (Eastman 1999). Zunächst muss Cisplatin in seine aktive Form überführt werden. Dies geschieht intrazellulär, wo eine geringe Chloridkonzentration herrscht. Dadurch können die Chloridliganden durch Wassermoleküle substituiert werden und es entsteht ein reaktiver Aqua-Cisplatin-Komplex (Davies et al. 2000). Dieser greift an den Basen der DNA an und führt zu Intra- und Interstrang-Quervernetzungen (Trimmer et al. 1999). Verschiedene DNA-Bindungsproteine erkennen diese Veränderung und versuchen den Defekt zu reparieren. Ist dies nicht möglich, wird die Apoptose eingeleitet (Jamieson et al. 1999; Kartalou et al. 2001).

1.2.2 Lipopolysaccharid

Im Gegensatz zu den sezernierten thermolabilen Exotoxinen von Bakterien entdeckte vor über 100 Jahren Richard Pfeiffer, ein Mitarbeiter von Robert Koch, thermostabile Toxine, die Bestandteil der Zelloberfläche von Bakterien sind. Diese nannte er Endotoxine (Pfeiffer 1892). Heutzutage bezeichnet man die Endotoxine auch als Lipopolysaccharid (LPS). Sie sind Hauptbestandteil der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien und spielen eine zentrale Rolle bei schweren Gram-negativen Infektionen, Trauma und Schock (Rietschel et al. 1992; Schettler et al. 1994). Eine große Menge an freigesetztem LPS kann bis zum Vollbild des septischen Schocks führen mit den diversen pathophysiologischen Reaktionen wie Hyper-, Hypothermie, Leukozytose, Leukopenie, Tachykardie, Tachypnoe, Hypotension, disseminierte intravasale Koagulation und Multiorganversagen (Nogare 1991). Die allgemeine Reaktion des menschlichen Körpers auf LPS wird indirekt über die Stimulation von hauptsächlich Monozyten und Makrophagen ausgeübt, indem es zur Ausschüttung von immunmodulierenden Molekülen wie Tumornekrosefaktor α ($\text{TNF}\alpha$), Mitglieder der Interleukinfamilie (IL-1, IL6, IL-8, IL12) und anderen kommt (Galanos et al. 1992). Viele verschiedene körpereigene Zellen reagieren auf diese Mediatoren und es kommt zu typischen Entzündungsreaktionen in Form von Proliferation und Chemotaxis weiterer Immunzellen, erhöhter Gefäßpermeabilität und Temperaturerhöhung. Die Erkennung von LPS durch Monozyten und Makrophagen erfolgt wesentlich über den Membranrezeptor CD14 (Haziot et al. 1996). Die Affinität dieses Rezeptors wird deutlich verstärkt durch die Anwesenheit des im Serum gelösten sog. Lipopolysaccharide-binding protein (LBP) (Schumann et al. 1990; Wright et al. 1990). CD14 mit gebundenem Liganden interagiert über ein weiteres Membranmolekül MD-2 mit dem Toll-like-Rezeptor TLR4 (Opal 2010), einem zu den sog. Mustererkennungsrezeptoren gehörenden Oberflächenrezeptor von Zellen des angeborenen Immunsystems. Über diesen TLR4 Rezeptor erfolgt die weitere intrazelluläre Signalkaskade bis zur Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine.

1.3 Intrazelluläre Enzyme

Durch die Untersuchungen dieser Arbeit haben sich drei verschiedene Kinasen bzw. Transkriptionsfaktoren als relevant für den Wirkmechanismus des Stressins herausgestellt. Deren allgemein bekannte Funktionen sollen in diesem Abschnitt erörtert werden.

1.3.1 Akt/Proteinkinase B

Die Kinase Akt/Proteinkinase B spielt eine zentrale Rolle in vielen verschiedenen Signalwegen einer Zelle. Unter anderem greift das Enzym in die Regulation von Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Metabolismus ein (Nicholson et al. 2002). Es ist eine Serin/Threonin-Kinase, von der drei bekannte Isoformen namens Akt1(PKB α), Akt2(PKB β) und Akt3(PKB γ) bestehen, welche sich in etwa 80% ihrer strukturellen Aminosäuresequenz gleichen (Yang et al. 2004). Am N-terminalen Ende befindet sich die sog. PH-Domäne (Pleckstrin Homology), welche für die Rekrutierung des Enzyms zur Zellmembran und die Interaktion mit Phosphatidylinositoltrisphosphat (PIP3) verantwortlich ist. In der Mitte der Aminosäuresequenz liegt die Kinase-Domäne und am C-terminalen Ende folgt die regulatorische Domäne (Osaki et al. 2004). Ein bekannter Weg zur Aktivierung von Akt läuft über die Phosphoinositol-3 Kinase (PI-3K) (Brazil et al 2001). Über Stimulation von Tyrosinkinase Rezeptoren oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kommt es zur Phosphorylierung/Aktivierung von PI-3K. PI-3K wandelt an der Innenseite der Zellmembran Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP2) in PIP3 um. Dies führt zur Rekrutierung und Anlagerung von Akt an die Zellmembran. Hier wird Akt durch Phosphorylierung an Threonin 308 und Serin 473 aktiviert. Die Phosphorylierung an Thr308 erfolgt über die Phosphoinoside-dependent Kinase-1 (PDK-1), wohingegen die Phosphorylierung an S473 noch unklar ist. Im aktiven Status phosphoryliert Akt viele andere Proteine sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern und greift so in die Regulation der Zelle ein. Zum Beispiel wird durch Akt das Überleben einer Zelle durch Hemmung der Apoptose gefördert, indem verschiedene Ziele wie BAD (del Peso et al 1997; Datta et al. 1997), Mitglieder der Forkhead

Familie (Brunet et al. 1999), c-Raf (Zimmermann et al. 1999) oder Procaspase 9 (Cardone et al. 1998) direkt phosphoryliert und inhibiert werden. Der Glukosemetabolismus und das Zellwachstum werden durch die Anwesenheit von Akt über die Regulation der Glykogen-Synthase-Kinase 3 mitbeeinflusst (Cross et al. 1995; Garofalo et al. 2003), welche durch Akt phosphoryliert und inhibiert wird. Auch die insulinabhängige Translokation von Glukosetransporten scheint durch Akt vermittelt zu sein (Hajdich et al. 2003). Zusätzlich nimmt Akt Einfluss auf das Zellwachstum über die direkte Phosphorylierung von mTor, was zur Stimulation der Translation von Proteinen führt (Navé et al. 1999). Einer der Haupt-Gegenspieler von Akt ist die Phosphatase PTEN. Diese dephosphoryliert PIP3 zu PIP2 und unterbindet so die Rekrutierung von Akt zur Zellmembran und damit auch deren Aktivierung (Cantley et al. 1999).

1.3.2 Glykogen Synthase Kinase 3

Die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) ist eine Serin/Threonin Kinase, von der zwei verschiedene Isoformen - GSK3 α und GSK3 β - existieren (Woodgett 1990). Im Vergleich zu anderen Kinasen übt diese eine eher ungewöhnliche Funktion aus, weil sie im dephosphorylierten Zustand aktiv ist und auf ihre meisten Zielenzyme durch Phosphorylierung inhibitorisch wirkt (Woodgett 2001). Ihren Namen hat die GSK3 aus ihrer Funktion bei der Glykogensynthese. Nach Stimulation des Insulinrezeptors wird GSK3 über den PI-3K/Akt Signalweg phosphoryliert und inhibiert. Dadurch wird die Phosphorylierung und damit die inhibitorische Wirkung von GSK3 auf die Glykogensynthase aufgehoben, sodass Glykogen entstehen kann (Welsh et al. 1996). GSK3 α wird an der Stelle Serin 21 und GSK3 β an der Stelle Serin 9 phosphoryliert. Eine zentrale Rolle spielt GSK3 im Wnt-Signalweg, der unter anderem für die Differenzierung von Zellen während der Embryonalentwicklung mitverantwortlich ist (Forde et al. 2007). Im unstimulierten Zustand befindet sich GSK3 mit Axin, einem Gerüstprotein, und dem APC Protein (adenomatous polyposis coli), einem Adapterprotein, in einem Proteinkomplex, der β -Catenin bindet und phosphoryliert. Dadurch wird β -Catenin zur proteolytischen Degradation markiert, so dass die zytosolischen Spiegel gering bleiben. Bei Aktivierung des Signalwegs durch

das Wnt-1 Protein kommt es über den Transmembranrezeptor Frizzled zur Aktivierung des Proteins dishevelled, was die Kinaseaktivität von GSK3 herunter reguliert. Es kommt zur Anreicherung von β -Catenin im Zytosol. Daraufhin erfolgt die Translokation in den Zellkern, Interaktion mit dem TCF/LEF DNS-Bindungsprotein und Einleitung der Gen-Transkription (Ali et al. 2001). Veränderungen einzelner Komponenten des Wnt-Signalwegs sind mit verschiedenen malignen Entartungen vergesellschaftet wie dem kolorektalen Karzinom (Doucas et al. 2005), dem hepatozellulären Karzinom (Lee et al. 2005), dem Prostatakarzinom (Yardy et al. 2005) oder anderen (Herbst et al. 2007). Außer der Glykogensynthese und β -Catenin gibt es noch viele andere bekannte Proteine, die unter dem Einfluss von GSK3 stehen, wie z. B. c-Jun, CREB, Cyclin D1 oder Tau (Woodgett 2001).

1.3.3 CREB

CREB steht für „cAMP response element binding“ und ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Phosphorylierung reguliert wird (Mayr et al. 2001). Er gehört zur gleichen Transkriptionsfaktorenfamilie wie CREM (cAMP response element modulator) oder ATF1 (activating transcription factor 1) (Lee et al. 1993). Ihnen gemeinsam ist eine „basic leucine zipper domain“, mit der sie an der sog. CRE-Sequenz (cAMP response element) - ein Pallindrom-Motiv in der DNS (5'-TGACGTCA-3'), welches in bestimmten Promoter-Regionen von Genen zu finden ist (Mayr et al. 2001) - binden können. Die Bindung erfolgt über eine Homo- oder Heterodimerisierung der Transkriptionsfaktoren. Durch eine vielfältige Kombinationsmöglichkeit entsteht dabei eine unterschiedliche Expression von Genen (Hai et al. 1991). Als Co-Faktor für die Promoter-Bindung wird das CREB-binding-protein (CBP) benötigt, welches die CREB vermittelte Transkription verstärkt (Chrivia et al. 1993; Arias et al. 1994). Unter anderem wird die Phosphorylierung von CREB über den second messenger cAMP (cyclic adenosine monophosphate) reguliert, der aufgrund von Stimulation bestimmter extrazellulärer Rezeptoren freigesetzt wird (Lameh et al. 1990). cAMP führt zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), deren katalytische Untereinheit in den Zellkern diffundiert und CREB an dem Aminosäurerest Serin 133 phosphoryliert (Gonzales et al. 1989). Auch Akt/PKB kann CREB direkt an Ser133 phosphorylieren (Du et al. 1998). Der Transkriptionsfaktor CREB hat bekannte Funktionen in der

Glukose Homöostase (Herzig et al. 2001; Canettieri et al. 2005), im Überleben der Zelle (Du et al. 1998), bei der T-Zell Entwicklung (Muthusami et al. 1998), in der Spermatogenese (Don et al. 2002) und dem menschlichen Gehirn (Carlezon et al. 2005).

2 Ziel der Untersuchung

Das Ziel dieser Arbeit war es, den primären Wirkungsmechanismus des Peptids Stressin aufzudecken. Dabei wurden verschiedene Zelllinien unterschiedlichen Stressreizen ausgesetzt, die ohne Peptidbehandlung zur inflammatorischen Aktivierung bzw. zum Zelltod führten. In Phospho-Kinase Arrays und Western Blots wurde untersucht, welche Signalwege mit und ohne Peptidzugabe differentiell aktiviert wurden. So sollte eine Hypothese entstehen, die die charakteristischen Eigenschaften des Stressins erklärt.

3 Materialien

3.1 Geräte & Materialien

Blotgestell	BioRad, München
Blotkammer	BioRad, München
Brutschrank	Sanyo, München
ELISA-Reader	TECAN, Crailsheim
Eppendorf Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Tubes 1,5ml, 2ml	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Filmkammer	Agfa, Berlin
Fuji Medical X-Ray Film	Fujifilm, Düsseldorf
Heizblock	Thechne, Staffordshire
Kunststoffröhrchen 15ml, 50ml	Greiner, Frickenhausen
Maxisorb-ELISA-Platten	Nunc, Wiesbaden
Mikroskop	Leica, Wetzlar
Mikrozentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Nitrozellulosemembran	Whatman, Dassel
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Scanner	BioRad, München
Schüttler	Edmund Bühler, Hechingen
Serologische Pipetten 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sonoplus Ultraschall-Homogenisator	Bandelin, Berlin
Sterilarbeitsbank	Thermo Fisher, Bonn
T175 Zellkultur Flaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Tissue Culture Plate 6, 12, 96 Well	Sarstedt, Nümbrecht
Versiegelungsfolie	Roth, Karlsruhe
Vier-Felder-Kammer nach Neubauer	Labotec, Wiesbaden
Vortexer	Janke&Kunkel, Staufen
Wärmebad	Wilke&Witzel, Hamburg

Whatman-Filterpapier
Zellschaber
Zellzentrifuge

Whatman, Dassel
Sarstedt, Nümbrecht
Heraeus, Hanau

3.2 Substanzen

2-Mercaptoethanol
Acrylamid
Aprotinin
APS (Amoniumperoxodisulfat)
Bromphenolblau
BSA (Bovines Serumalbumin)
Cisplatin
DMF (Dimethylformamid)
DMEM Kulturmedium
DMSO (Dimethylsulfoxid)
DTT (Dithiothreitol)
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)
FCS (Fetales Kälberserum)
Glycerol
Glycin
HCl (Salzsäure)
Hepes (2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-
ethansulfonsäure)
Leupeptin
LPS (Lipopolysaccharid)
Methanol
Milchpulver
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-
2,5-diphenyltetrazoliumbromid)
NaCl (Natriumchlorid)
NaF (Natriumfluorid)
Orthovanadat

Merck, Darmstadt
Roth, Karlsruhe
Sigma-Aldrich, München
Sigma-Aldrich, München
Sigma-Aldrich, München
PAA, Pasching
Sigma-Aldrich, München
Merck, Darmstadt
Gibco/Invitrogen, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
PAA, Pasching
Sigma-Aldrich, München
Roth, Karlsruhe
Roth, Karlsruhe
Merck, Darmstadt

Sigma-Aldrich, München
Sigma-Aldrich, München
J.T.Baker, Deventer
Roth, Karlsruhe
Invitrogen, Darmstadt

Roth, Karlsruhe
Roth, Karlsruhe
Sigma-Aldrich, München

PageRuler Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Rot
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Gibco/Invitrogen, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco/Invitrogen, Darmstadt
PMSF (Phenylmethylsulfonfluorid)	Sigma-Aldrich, München
H ₂ SO ₄ (Schwefelsäure)	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
Stressin	PolyPeptide Lab., San Diego
Temed (Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich, München
TMB Plus	Kem-En-Tec Diagnostics, Köln
Trisbase	Sigma-Aldrich, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypanblau	Gibco/Invitrogen, Darmstadt
Trypsin	Gibco/Invitrogen, Darmstadt
Tween	Merck, Darmstadt

3.3 Kits

BCA Protein Assay Kit	Pierce / Thermo Fisher, Bonn
Human IL-6	R&D Systems, Wiesbaden
Human Phospho-Kinase Array Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Proteome Profiler™	
Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	Pierce / Thermo Fisher, Bonn

3.4 Antikörper

Actin (I-19): sc1616	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, # 7074	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
p-β-Catenin (Ser33)-R: sc-16743-R	Santa Cruz, Heidelberg
p-Akt (Ser473) Antibody, # 4058	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
p-CREB (S133) Antibody, # AF2510	R&D Systems, Wiesbaden

p-GSK-3 β (Ser9) Antibody, # 9323	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
p-P38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Antibody, # 9211	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
p-Src-family (Tyr416) Antibody, # 2101	Cell Signaling, Frankfurt a. M.

3.6 Computerprogramme

Excel	Microsoft, Unterschleißheim
KC4	BioTek, Bad Friedrichshall
Quantity one	BioRad, München
GraphPad Prism	GraphPad Software, La Jolla

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Die gezeigten Versuche wurden mit adhärenenten Primärzellen durchgeführt. Dabei handelte es sich um Humane Fibroblasten. Diese waren Zellen aus der 12-20. Generation. Die HF wurden in T175 Kulturflaschen kultiviert. Es wurde als Kulturmedium DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's medium) mit den Zusätzen 10% FCS (Fetales Kälberserum) und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet. Pro Flasche wurden 25ml Nährmedium benötigt. Die Kultivierung fand im Brutschrank bei 37°C statt. Ab einer Zellrasendichte von ca. 80% wurden die Zellen 1:10 gesplittet. Ein genereller Wechsel des Nährmediums erfolgte nach 3 Tagen. Beim Splitten der Zellen wurde das Nährmedium abgesaugt, 5ml Trypsin hinzugefügt und die Kulturflasche für 5min in den Brutschrank gestellt. Nach dem Ablösen der adhärenenten Zellen, wurde die Zellsuspension abpipettiert und ein Zehntel davon in neues Nährmedium in die Zellkulturflasche zurückgegeben. Zur Aussaat von Zellen für Versuchsansätze wurde zunächst das Medium aus der Kulturflasche abgesaugt, 5ml Trypsin hinzugefügt und diese für 5min in den Brutschrank bei 37°C gestellt. Danach wurde die Zellsuspension in ein 50ml Falcon überführt und weitere 5ml Nährmedium dazugegeben, um die Trypsin-Reaktion abzustoppen. Als Nächstes wurden die Zellen bei 1300rpm für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10ml frischem Nährmedium resuspendiert. Zur Zellzählung wurden 10µl Zellsuspension und 10µl Trypanblau gemischt. Dieses wird nur von Zellen mit zerstörter Zellmembran aufgenommen und dient so zur Abgrenzung von vitalen und toten Zellen. In einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen gezählt und nach folgender Formel ausgerechnet, um die Zellzahl pro ml zu erhalten.

$$\frac{\text{Zellzahl} \times 2 \times 10.000}{4}$$

Danach konnten die Zellen mit der gewünschten Zellzahl pro Well ausgesät werden.

4.2 Anfertigung der Proben für Phospho-Kinase Arrays

4.2.1 Cisplatin Ansatz

Lösungen:

Cisplatin Stock (10 μ M)

- 3mg Cisplatin
- 100 μ l Dimethylformamid
- 900 μ l PBS

Cisplatin Stock (1 μ M)

- 100 μ l Cisplatin Stock (10 μ M)
- 90 μ l Dimethylformamid
- 810 μ l PBS

Vier verschiedene Proben sollten erstellt werden.

- Unbehandelte Zellen
- Mit Cisplatin behandelte Zellen
- Mit Stressin behandelte Zellen
- Mit Stressin und Cisplatin behandelte Zellen

Es wurden in 6-Well Schalen je 400.000 humane Fibroblasten pro Well ausgesät, wobei für eine Probe je 2 Wells beansprucht wurden. Die Zellen waren in 2ml DMEM Kulturmedium pro Well suspendiert. Nach 24h im Brutschrank bei 37°C wurden die jeweiligen Substanzen hinzugefügt.

Tabelle 1: Konzentration von Stressin und Cisplatin der Proben im Cisplatin Ansatz

Probe	Zusätze
Unbehandelte Zellen	/
Mit Cisplatin behandelte Zellen	40 μ M Cisplatin
Mit Stressin behandelte Zellen	60 μ g/ml Stressin
Mit Stressin und Cisplatin behandelte Zellen	60 μ g/ml Stressin u. 40 μ M Cisplatin

Hier wurden die Zellen für 24h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Nährmedium abgesaugt, die adhärenen Zellen mit PBS gewaschen und danach je 100µl pro Well des Lysis Buffer 6 aus dem Human Phospho-Kinase Array Kit hinzugefügt.

Es folgte eine 30-minütige Einwirkzeit bei 2-8°C auf einem Schüttler. Ab diesem Zeitpunkt verblieben die Proben immer unter Kühlung auf Eis. Das entstandene Lysat wurde in 1,5ml Reaktionsgefäße pipettiert, wobei der Inhalt der 2 Wells mit den gleichen Proben in jeweils dasselbe Reaktionsgefäß überführt werden konnte. Die Zelllysate wurden bei 14.000 x g für 5min mikrozentrifugiert. Die Überstände wurden erneut in saubere Reaktionsgefäße überführt und konnten einer Proteinbestimmung unterzogen werden. Diese wurde nach dem in Abschnitt 4.6 beschriebenen Verfahren mit dem BCA-Protein-Assay-Kit der Firma Pierce durchgeführt.

Tabelle 2: Proteinbestimmung der Proben im Cisplatin Ansatz

Probe	Proteingehalt (Durchschnitt)	Standardabweichung in %
Unbehandelte Zellen	2,039µg/µl	0,846
Mit Cisplatin behandelte Zellen	1,892µg/µl	0,304
Mit Stressin behandelte Zellen	1,786µg/µl	0,322
Mit Stressin und Cisplatin behandelte Zellen	1,713µg/µl	0,335

Für das weitere Vorgehen wurden pro Probe insgesamt 180µg Protein verwendet.

Tabelle 3: Tabelle zur Errechnung des Lysatvolumens im Cisplatin Ansatz

Probe	Proteingehalt (Durchschnitt)	verwendete Proteinmenge	errechnetes Lysatvolumen
Unbehandelte Zellen	2,039µg/µl	180µg	88,28µl
Mit Cisplatin behandelte Zellen	1,892µg/µl	180µg	95,14µl
Mit Stressin behandelte Zellen	1,786µg/µl	180µg	100,78µl
Mit Stressin und Cisplatin behandelte Zellen	1,713µg/µl	180µg	105,08µl

Die jeweils errechneten Lysatvolumina wurden in separate Reaktionsgefäße überführt und auf 334µl mittels Lysis Buffer 6 aufgefüllt. Es wurden zusätzlich 1666µl des Array Buffer 1 aus dem Human Phospho-Kinase Array Kit zu jeder Probe hinzugegeben, um auf ein Gesamtvolumen von 2ml zu kommen, so dass jeweils für die Membran Part A und die Membran Part B 1ml Lysat zur Verfügung stand.

4.2.2 LPS-Ansatz

Vier verschiedene Proben sollten erstellt werden.

- Unbehandelte Zellen
- Mit LPS behandelte Zellen
- Mit Stressin behandelte Zellen
- Mit Stressin und LPS behandelte Zellen

Es wurden in 6-Well Schalen je 400.000 Humane Fibroblasten pro Well ausgesät, wobei für eine Probe je 2 Wells beansprucht wurden. Die Zellen waren in 2ml DMEM Kulturmedium pro Well suspendiert. Nach 24h im Brutschrank bei 37°C wurden die jeweiligen Substanzen hinzugefügt.

Tabelle 4: Konzentration von Stressin und LPS der Proben im LPS Ansatz

Probe	Zusätze
Unbehandelte Zellen	/
Mit LPS behandelte Zellen	10ng/ml LPS
Mit Stressin behandelte Zellen	60µg/ml Stressin
Mit Stressin und LPS behandelte Zellen	60µg/ml Stressin u. 10ng/ml LPS

Hier wurden die Zellen für 1h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Nährmedium abgesaugt, die adhärenen Zellen mit PBS gewaschen und danach je 100µl pro Well des Lysis Buffer 6 aus dem Human Phospho-Kinase Array Kit hinzugefügt.

Es folgte eine 30-minütige Einwirkzeit bei 2-8°C auf einem Schüttler. Ab diesem Zeitpunkt verblieben die Proben immer unter Kühlung auf Eis. Das entstandene Lysat wurde in 1,5ml Reaktionsgefäße pipettiert, wobei der Inhalt der 2 Wells mit den gleichen Proben in jeweils dasselbe Reaktionsgefäß überführt werden konnte. Die Zelllysate wurden bei 14.000 x g für 5min mikrozentrifugiert. Die Überstände wurden erneut in saubere Reaktionsgefäße überführt und konnten einer Proteinbestimmung unterzogen werden. Diese wurde nach dem in Abschnitt 4.6 beschriebenen Verfahren mit dem BCA-Protein-Assay-Kit der Firma Pierce durchgeführt.

Tabelle 5: Proteinbestimmung der Proben im LPS Ansatz

Probe	Proteingehalt (Durchschnitt)	Standardabweichung in %
Unbehandelte Zellen	1,291µg/µl	0,689
Mit LPS behandelte Zellen	1,448µg/µl	1,228
Mit Stressin behandelte Zellen	1,476µg/µl	0,202
Mit Stressin und LPS behandelte Zellen	1,546µg/µl	0

Für das weitere Vorgehen wurden pro Probe insgesamt 180µg Protein verwendet.

Tabelle 6: Tabelle zur Errechnung des Lysatvolumens im LPS Ansatz

Probe	Proteingehalt (Durchschnitt)	Benötigte Proteinmenge	errechnetes Lysatvolumen
Unbehandelte Zellen	1,291µg/µl	180µg	139,43µl
Mit LPS behandelte Zellen	1,448µg/µl	180µg	124,31µl
Mit Stressin behandelte Zellen	1,476µg/µl	180µg	121,95µl
Mit Stressin und LPS behandelte Zellen	1,546µg/µl	180µg	116,43µl

Die jeweils errechneten Lysatvolumina wurden in separate Reaktionsgefäße überführt und auf 334µl mittels Lysis Buffer 6 aufgefüllt. Es wurden zusätzlich 1666µl

des Array Buffer 1 aus dem Human Phospho-Kinase Array Kit zu jeder Probe hinzugegeben, um auf ein Gesamtvolumen von 2ml zu kommen, sodass jeweils für die Membran Part A und die Membran Part B 1ml Lysat zur Verfügung stand.

4.3 Human Phospho-Kinase Array

Dies ist ein Verfahren zur parallelen Analyse der Phosphorylierungsprofile von 46 verschiedenen Kinasen und Transkriptionsfaktoren. Das Prinzip des Arrays beruht auf in Doppelspots auf Nitrozellulosemembranen aufgetragenen spezifischen Antikörpern. Diese Membranen werden mit entsprechenden Lysaten inkubiert. Nicht gebundenes Protein wird abgewaschen. Anschließend wird ein Cocktail aus biotinylierten Zweitantikörpern hinzugegeben. Mittels Streptavidin-HRP und Chemilumineszenzreagenz werden gebundene Proteine auf einem Belichtungsfilm sichtbar gemacht.

Folgende Komponenten sind im Kit enthalten:

- 8 Nitrozellulosemembranen (davon 4 x Part A mit 28 verschiedenen Antikörpern als Spots aufgetragen und 4 x Part B mit 18 verschiedenen Antikörpern als Spots aufgetragen)
- Array Buffer 1
- Array Buffer 2 (5 x Konzentrat)
- Array Buffer 3
- Lysis Buffer 6
- Wash Buffer (25 x Konzentrat)
- Detection Antibody Cocktail A
- Detection Antibody Cocktail B
- Streptavidin-HRP
- 8-Well Multi-Schale

Tabelle 7: Im Array untersuchte Kinasen und Transkriptionsfaktoren mit deren spezifischen Phosphorylierungsstellen

Zielprotein	Phosphorylierungsstelle	Zielprotein	Phosphorylierungsstelle
p38 α	Thr180/Tyr182	p27	Thr157
ERK1/2	Thr202/Tyr204, Thr185/Tyr187	p27	Thr198
JNK pan	Thr183/Tyr185, Thr221/Tyr223	p70 S6 Kinase	Thr229
c-Jun	S63	p70 S6 Kinase	Thr389
GSK-3 α/β	S21/S9	p70 S6 Kinase	Thr421/S424
MEK1/2	S218/S222, S222/S226	Src	Tyr419
MSK1/2	S376/S360	Lyn	Tyr397
AMPK α 1	Thr174	Lck	Tyr394
AMPK α 2	Thr172	Fyn	Tyr420
Akt	Thr308	Yes	Tyr426
Akt	S473	Fgr	Tyr412
TOR	S2448	Hck	Tyr411
RSK1/2	S221	Chk-2	Thr68
RSK1/2/3	S380	FAK	Tyr397
eNOS	S1177	Pyk2	Tyr402
CREB	S133	STAT1	Tyr701
HSP27	S78/S82	STAT2	Tyr689
β -Catenin	S33	STAT3	Tyr705
PLC γ -1	Tyr783	STAT4	Tyr693
p53	S15	STAT5a	Tyr699
p53	S46	STAT5b	Tyr699
p53	S392	STAT5a/b	Tyr699
Paxillin	Tyr118	STAT6	Tyr641

Mit einem Human Phospho-Kinase Array Kit konnten 4 verschiedene Proben von Zelllysaten gleichzeitig untersucht werden. Die 8-Well Multi-Schale wurde dabei mit je 1ml Array Buffer 1 pro Well befüllt, worin die 8 Nitrozellulosemembranen für 1h bei Raumtemperatur blocken konnten.

Nach Entfernen des Array Buffer 1 aus den Wells wurden pro Probe jeweils eine Membran Part A und eine Membran Part B mit je 1ml eines verdünnten Lysats über Nacht bei 2-8°C auf einem Schüttler inkubiert. Dabei sollte 1ml Lysat mindestens 80 μ g Protein enthalten. Am folgenden Tag wurden zur Entfernung des nichtgebundenen Proteins die Membranen in separaten Schalen gewaschen. Dies wurde mittels 1 x konzentriertem Wash Buffer für 3 x 10min durchgeführt. Die 8-Well Multi-Schale wurde mit destilliertem Wasser ausgespült. Als Nächstes wurden die im Detection Antibody Cocktail A und B lyophilisierten Antikörper mit je 100 μ l

destilliertem Wasser gelöst. Sowohl 80µl des Detection Antibody Cocktail A als auch 80µl des Detection Antibody Cocktail B wurden in je 4ml Array Buffer 2/3 verdünnt (Mischverhältnis von Array Buffer 2 zu Array Buffer 3 1:5). Diese Gemische wurden zu je 1ml auf die 8-Well Multi-Schale verteilt. Anschließend wurden die Nitrozellulosemembranen aus dem Wash Buffer herausgenommen und in den ihnen zugehörigen Antikörperlösungen für 2h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert (Membranen A in Detection Antibody Cocktail Lösung A; Membranen B in Detection Antibody Cocktail Lösung B).

Zur Entfernung der nichtgebundenen Antikörper erfolgte ein erneuter Waschschrift in separaten Schalen für 3 x 10min. Die 8-Well Multi-Schale wurde mit destilliertem Wasser ausgespült. Streptavidin-HRP wurde mit dem Faktor 1:2000 in 8ml Array Buffer 2/3 verdünnt (Mischverhältnis von Array Buffer 2 zu Array Buffer 3 1:5), um zu je 1ml auf die 8-Well Multi-Schale verteilt zu werden. Daraufhin wurden die Nitrozellulosemembranen aus dem Wash Buffer entfernt und zur Inkubation bei Raumtemperatur für 30min in die 8-Well Multi-Schale auf einen Schüttler gelegt. Zur Entfernung des nichtgebundenen Streptavidin-HRP erfolgte ein erneuter Waschschrift in separaten Schalen für 3 x 10min. Die 8-Well Multi-Schale wurde mit destilliertem Wasser ausgespült. Anschließend wurden die Membranen mit je 1,5ml des Chemilumineszenzreagenzes der Firma Pierce (Super Signal West Dura Extended Duration Substrate), welches aus zwei Komponenten zusammen gemischt wurde, in der 8-Well Multi-Schale für 5min inkubiert, um dann in eine Filmkammer gelegt zu werden, wobei die mit dem selben Lysat inkubierten Part A und Part B Membranen jeweils nebeneinander positioniert wurden. Schließlich wurden in einer Dunkelkammer Filme für unterschiedliche Zeiteinheiten der Chemilumineszenz der Membranen ausgesetzt und entwickelt.

Die fertig entwickelten Filme wurden eingescannt und densitometrisch mittels der Analysesoftware Quantity One ausgewertet. Dabei wurden den Spots, die als Positivkontrolle dienten, der Wert 1 zugeordnet und den übrigen Spots der jeweiligen Membranen relative Werte zur Positivkontrolle vergeben. Nun konnten die Spots der Membranen A untereinander und die Spots der Membranen B untereinander verglichen werden.

4.4 Anfertigung der Proben für Western Blots

Lösungen:

Lysispuffer

- Grundstock (1l)
 - 11,91g Hepes 50mM
 - 8,77g NaCl 150mM
 - auf 900 ml Aqua dest. auffüllen und auf pH 7,4 einstellen
 - 10ml Triton X-100 1% (v/v)
 - 2,1g NaF 50mM
 - 4ml EDTA 0,5M 2mM
 - 100ml Glycerol 10% (v/v)
- Benzamidin 1% (v/v)
- Orthovanadat 1% (v/v)
- Leupeptin 0,1% (v/v)
- PMSF 1% (v/v)
- Aprotinin 0,2% (v/v)

Laemmlipuffer 5x

- 1,5g Trisbase
- 5g SDS
- 250mg Bromphenolblau
- 25ml Glycerol
- 3,86g DTT
- Auf 50ml Aqua dest. auffüllen

Vier verschiedene Proben sollten erstellt werden.

- Unbehandelte Zellen
- Mit LPS behandelte Zellen
- Mit Stressin behandelte Zellen
- Mit Stressin und LPS behandelte Zellen

Es wurden in 6-Well Schalen je 400.000 Humane Fibroblasten pro Well ausgesät, wobei für eine Probe je 2 Wells beansprucht wurden. Die Zellen waren in 2ml DMEM Kulturmedium pro Well gelöst. Nach 24h im Brutschrank bei 37°C wurden die jeweiligen Substanzen hinzugefügt.

Tabelle 8: Konzentration von Stressin und LPS der Proben für Western Blots

Probe	Zusätze
Unbehandelte Zellen	/
Mit LPS behandelte Zellen	10ng/ml LPS
Mit Stressin behandelte Zellen	60µg/ml Stressin
Mit Stressin und LPS behandelte Zellen	60µg/ml Stressin u. 10ng/ml LPS

Die Zellen wurden für 1h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Nährmedium abgesaugt, die adhärenen Zellen mit PBS gewaschen und je 150µl frisch angesetzter Lysispuffer pro Well hinzugefügt. Ab diesem Punkt standen die Proben kontinuierlich auf Eis. Die Proben wurden mit einem Zellschaber abgekratzt und mit einer Pipette in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Danach wurden diese mit den Einstellungen cycle 4, 40-50% für 10 Impulse sonifiziert. Hierbei erzeugt Ultraschall rasche Druckänderungen, die zum Zerreißen von Membranen und Zellwänden führen, so dass der Zellinhalt frei wird. Es folgte das Zentrifugieren bei 13000rpm und 4°C für 30min. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration mittels des in Abschnitt 4.6 beschriebenen BCA Protein Assay Kits der Firma Pierce wurden alle Proben durch Zugabe von Aqua dest. auf die gleiche Proteinkonzentration gebracht. Nun wurde entsprechend viel Volumen an 5x Laemmlipuffer zu den einzelnen Proben hinzugegeben, so dass dieser ein Fünftel der Endkonzentration ausmachte. Schließlich wurden die Proben für 5min bei 95°C im Kochblock erhitzt und sofort zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt oder bei -25°C weggefroren. Die Proben sollten für eine gute Detektion von phosphorylierten Proteinen eine Konzentration von mindestens 1,5µg/µl Protein aufweisen.

4.5 Auftrennung der Proteine

Es wurde das Verfahren der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970) zur Auftrennung von Proteinlysaten nach Molekulargewicht angewandt. Die Proteinlysate werden mit SDS (Natriumdodecylsulfat) behandelt, einem negativ geladenen Detergenz, welches sich an hydrophobe Bezirke der Proteine anlagert und die Eigenladung der Proteine überdeckt, so dass diese eine einheitliche negative Ladung erhalten. Im Zusammenspiel mit SDS und DTT (Dithiothreitol) werden beim Erhitzen auf 95°C die Tertiär- und Sekundärstrukturen der Moleküle aufgebrochen, sodass entfaltete Proteine entstehen. Nach Auftragen auf ein Gel können die bearbeiteten Proteinlysate im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Wanderstrecke der Proteine ist antiproportional zum Molekulargewicht, welches anhand von apart mitlaufenden Molekularstandards abgelesen werden kann.

Lösungen:

Trenngelstock 12%

- 24ml H₂O
- 30ml Acrylamid (40%)
- 25ml 1,5M Tris pH 8,8
- 20ml Glycerol

Sammelgelstock

- 74ml H₂O
- 12,5ml Acrylamid (40%)
- 12,5ml 1M Tris pH 6,8
- 1ml 10% SDS

Blotpuffer 10x

- 144g Glycin
- 30,3g Trisbase
- Auf 1l Wasser auffüllen

Blotpuffer 1x

- 100ml 10x Blotpuffer
- 200ml Methanol
- 700ml H₂O

Laufpuffer 10x

- 20g SDS
- 288g Glycin
- 60,6g Trisbase
- Auf 2l Wasser auffüllen

TBS 10x

- 24,22g Trisbase
- 175,32g NaCl
- 2l Aqua dest.
- pH Einstellung auf 7,6 mittels 13M HCl (ca. 14,5ml)

Milchpulverlösung

- TBS/T + 5% (w/v) Milchpulver

TBS/T

- 1x TBS + 0,05% (v/v) Tween

BSA-Lösung

- TBS/T + 5% (w/v) BSA

4.5.1 Herstellung des Polyacrylamidgels

Um ein Gel in Form gießen zu können, wurde zuerst das Gestell, bestehend aus 2 Glasplatten, einem Fixierer und einem Gelständer, aufgebaut. Danach wurden getrennt voneinander Trenn- und Sammelgel angesetzt. Zu 5ml Trenngelstock wurden 12,5µl APS und 6,25µl Temed, zu 2,5ml Sammelgelstock 10µl APS und 5µl Temed hinzugefügt. Temed und APS dienten als Polymerisationskatalysator bzw. -starter. Zuerst wurde das Trenngel zügig und luftblasenfrei zwischen die Glasplatten pipettiert. Darauf folgte das Sammelgel. Zum Schluss wurde der Taschenkamm eingesetzt. Nach einer Zeit von ca. 30min war das Gel vollständig polymerisiert und einsatzbereit.

4.5.2 SDS-Page

Die fertigen Polyacrylamid-Gele wurden in eine Laufkammer eingebaut. Diese wurde mit 1x Laufpuffer befüllt. Die Kämme wurden vorsichtig herausgezogen und Reste des Polyacrylamids aus den Taschen entfernt. In die erste Tasche wurde 6µl des Größenstandards pipettiert. Die folgenden Taschen wurden mit den aufbereiteten Lysaten der verschiedenen Proben befüllt, wobei eine gleiche µg Proteinanzahl der einzelnen Proben zur Vergleichbarkeit unabdingbar war. Dann wurde der Strom für die ersten 10min bei 100V und danach bei 160V für ca. 1,5h eingeschaltet, bis sich die Proteine nach ihrer Größe ausreichend aufgetrennt hatten.

4.5.3 Western Blot

Die durch die SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden nach Towbin et al. elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Towbin et al. 1979). Dazu wurde ein gitterförmiges Blotgestell in eine Wanne mit 1x Blotpuffer gelegt. Dann wurden der Reihe nach ein Schwamm, ein Whatmanpaper, das Polyacrylamidgel, die Nitrozellulosemembran, ein zweites Whatmanpaper und ein zweiter Schwamm in das Gestell eingefügt, wobei alle Bestandteile in Blotpuffer getränkt und luftblasenfrei aufeinandergelegt wurden. Das Blotgestell wurde geschlossen und zusammen mit einem Eisakku in eine Blotkammer eingesetzt, die wiederum auf Eis stand. Dann wurde ein elektrisches Feld über ca. 1h bei 150mA angelegt.

4.5.4 Immundetektion der Proteine auf Nitrozellulosemembran

Nach Beendigung des Blotvorgangs wurden die Membranen bei Raumtemperatur in Blocklösung (Milchpulverlösung) für 1h auf einem Schüttler inkubiert, um restliche Proteinbindungsstellen abzusättigen. Danach erfolgte die Herstellung der Antikörpergrundlösung für den Primärantikörper, je nach Antikörper angesetzt in

Milchpulverlösung oder BSA-Lösung mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor. Die Membranen wurden bei 4°C über Nacht inkubiert und anschließend zur Entfernung der nichtgebundenen Antikörper 3x für 5min in TBS/T gewaschen. Als Nächstes wurden die Membranen mit dem HRP gekoppelten Sekundärantikörper, der mit seinem jeweiligen Verdünnungsfaktor in Milchpulverlösung angesetzt wurde, für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschrift für 3x 5min in TBS/T, um nichtgebundene Antikörper zu entfernen. Darauf wurden die Membranen mit 1-2ml des Chemilumineszenzreagenzes der Firma Pierce (Super Signal West Dura Extended Duration Substrate), welches aus zwei Komponenten zusammen gemischt wurde, für 5min inkubiert, um dann in eine Filmkammer gelegt zu werden. Schließlich wurden in einer Dunkelkammer Filme für unterschiedliche Zeiteinheiten der Chemilumineszenz der Membranen ausgesetzt und entwickelt.

4.5.5 Stripping von Membranen

Lösung:

Stripping-Puffer

- 100mM 2-Mercaptoethanol
- 2% (w/v) SDS
- 62,5mM Tris pH 6,7
- Aqua dest.

Um die Nitrozellulosemembranen erneut für eine Immundetektion mit einem anderen Primärantikörper verwenden zu können, mussten die vorherigen Antikörper in einem speziellen Waschverfahren entfernt werden. Hierzu wurden die Membranen nach Benutzung für 5min in TBS/T gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation in sog. Stripping-Puffer für 10min in einem Wärmebad bei 70°C. Hier wurden die gebundenen Antikörper entfernt. Nun wurden die Membranen 4x für 5min in TBS/T gewaschen. Es erfolgte ein erneutes Blocken in Milchpulverlösung für eine halbe Stunde. Dann konnte die Immundetektion wie nach Abschnitt 4.5.4 mit neuem Primärantikörper wiederholt werden.

4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt der Zellysate wurde mittels des BCA-Protein-Assay-Kit der Firma Pierce bestimmt. Hierbei werden eine BSA Konzentrationsstandardkurve und die jeweiligen Lysate mit einem Reaktionsgemisch inkubiert, welches zu einem Farbumschwung führt, der in einem Bereich von 20 – 2500µg Protein annähernd linear von der Proteinkonzentration abhängt. So konnte durch Messung der Extinktion die Proteinkonzentration bestimmt werden. Auf eine 96-Wellplatte wurde in Doppelbestimmungen für die Standardreihe BSA und Aqua dest. wie folgt aufgetragen.

Tabelle 9: BSA Standardkurve zur Proteinbestimmung

Konzentration BSA	µl BSA (2mg/ml)	µl Aqua dest.
0µg/ml	0	10
500µg/ml	2,5	7,5
1000µg/ml	5	5
1500µg/ml	7,5	2,5
2000µg/ml	10	0
2500µg/ml	12,5	0

Danach wurden die Lysate in Doppelbestimmungen auf die Wells pipettiert. Pro Well wurden jeweils 5µl Lysat und 5µl Aqua dest. (als Verdünnung) verwendet. Sowohl zu der Standardreihe als auch zu den Proben wurden 200µl des Reaktionsgemisches zügig hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch bestand aus 50 Teilen Reagenz A und einem Teil Reagenz B. Nach Versiegelung mit einer Plastikfolie wurde die 96-Wellplatte für 30min in einen Inkubator bei 37°C inkubiert, um die chemische Reaktion zu beschleunigen. Es folgte die Messung der Extinktion im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 540nm. Zum Schluss wurde die Auswertung mit den PC-Programmen KC4 und Excel durchgeführt.

4.7 ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Mit diesem Verfahren wurden Interleukin-6 Spiegel als Entzündungsmarker von Zellkulturen bestimmt, um Effekte von pro- und antiinflammatorischen Substanzen nachzuweisen. Es sollte die Wirksamkeit des LPS und des Stressins in den einzelnen Proben verifiziert werden, um anschließend Westernblots oder Kinase Arrays durchführen zu können. Dabei wurden nach 24h und 48h Überstände der Proben entnommen, in Stickstoff schockgefroren und bei -25°C aufbewahrt. Es wurde hier das sogenannte „Sandwich-ELISA“ Verfahren angewendet. Für die Humanen Fibroblasten wurde das Kit „Human IL-6“ der Firma R&D Systems verwendet.

4.7.1 Human IL-6

Die 96-Well-Platte wurde pro Well mit je 100µl der Capture-Antikörper Lösung inkubiert (2µg/ml verdünnt in PBS). Danach wurde sie mit einer Klebefolie verschlossen und über Nacht bei 4°C gelagert. Nach Verwerfen der Capture-Antikörper Lösung und mehrmaligem Waschen mit einem Waschpuffer aus PBS mit 0,05% Tween wurde die Platte pro Well mit 300µl Blockpuffer aus PBS mit 1% BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Nach erneutem Waschschrift erfolgte das Auftragen der Standards und Proben. Die Standardkurve aus rekombiniertem humanen IL-6 wurde wie folgt in Doppelbestimmungen aufgetragen und mit PBS mit 1% BSA verdünnt.

Tabelle 10: Humane Interleukin 6 Standardkurve für ELISA

IL-6 Konzentration
0pg/ml
600pg/ml
300pg/ml
150pg/ml
75pg/ml
38pg/ml
19pg/ml
10pg/ml

Die Proben wurden 1:10 mit PBS verdünnt. Es wurden je 100µl der Standards und Proben pro Well aufgetragen. Die Platte wurde mit Klebefolie verschlossen und konnte bei Raumtemperatur für 2h inkubieren. Nach weiteren Waschschrinen wurden pro Well je 100µl Detection-Antikörperlösung (200ng/ml in PBS mit 1% BSA) hinzugegeben. Es folgte eine weitere Inkubationsphase nach Versiegeln der Platte für 2h bei Raumtemperatur. Nach der Durchführung eines Waschschrines wurden pro Well 100µl Streptavidin-HRP Lösung (1:200 verdünnt in PBS mit 1% BSA) dazu pipettiert und die Platte für 20min ohne direkte Lichteinwirkung inkubiert. Es folgte der letzte Waschschrin und danach wurden je Well 100µl Substratlösung mit TMB (Tetramethylbenzidin) und Wasserstoffperoxid hinzugegeben, die mit dem HRP Konjugat reagieren konnten, sodass es zu einem Farbumschwung kam. Nach einer Inkubationszeit von 20min im Dunklen konnte eine Stopplösung mit einfach molarer Schwefelsäure hinzugefügt werden, um das Voranschreiten des Farbumschwungs aufzuhalten, so dass jetzt die Platte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450nm mit einer λ Korrektur von 570nm ausgewertet werden konnte.

4.8 MTT-Assay

Lösung:

MTT-Lösung

- 50mg MTT
- 10ml PBS

Bei diesem Verfahren handelt es sich um einen Zytotoxizitätstest, bei welchem ein Farbstoff (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)) noch lebende Zellen in vitro anfärbt und man über die Extinktion Vergleiche von Zellzahlen in verschiedenen Proben anstellen kann (Mosmann 1983).

Hierbei diente dieser Test der Überprüfung der antiapoptotischen Wirkung des Stressins bei den jeweiligen Versuchsansätzen. Dabei wurden Zellen der selben Generation zu 50.000 Zellen pro Well und 1ml Nährmedium pro Well in 12 Wells

einer 12-Well Platte ausgesät. Diese wurden für 24h im Brutschrank bei 37°C gelagert. Es gab folgende vier Proben und pro Probe wurden 3 Wells verwendet.

Tabelle 11: Konzentration von Stressin und Cisplatin der Proben im MTT-Assay

Probe	Zusätze
Unbehandelte Zellen	/
Mit Cisplatin behandelte Zellen	40µM Cisplatin
Mit Stressin behandelte Zellen	60µg/ml Stressin
Mit Stressin und Cisplatin behandelte Zellen	60µg/ml Stressin u. 40µM Cisplatin

Nach Zugabe der Substanzen wurden die Zellen erneut für 48h im Brutschrank bei 37°C gelagert. Danach wurden zu jedem Well 20µl der MTT-Lösung hinzugefügt, die Wells leicht geschüttelt und wieder für 3h in den Brutschrank bei 37°C gestellt. Das Nährmedium wurde abgesaugt und in jedes Well wurden 250µl DMSO pipettiert. Hierdurch wurde der in den noch lebenden Zellen aufgenommene Farbstoff freigesetzt. Von jedem Well wurden 2x 100µl in eine 96-Well Platte pipettiert. Die Extinktionsmessung wurde im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570nm und einer λ Korrektur von 630nm vorgenommen. Die höchste Extinktion war in den Wells der unbehandelten oder nur mit Stressin behandelten Wells zu erwarten und die niedrigste in denen mit Cisplatin behandelten Wells. Die mit Cisplatin und Stressin behandelten Wells sollten eine höhere Extinktion als die nur mit Cisplatin behandelten Wells als Zeichen der antiapoptotischen Wirkung des Stressins aufweisen.

4.9 Statistische Auswertung

In dieser Arbeit wurden Phosphorylierungsprofile von Enzymen in unterschiedlich behandelten Proben miteinander verglichen. Um eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit treffen zu können, dass ein ermittelter Unterschied auch ein realer und kein zufälliger Unterschied ist, wurden die erhobenen Werte in einem mathematischen Verfahren, dem sog. T-Test für unverbundene Stichproben, untersucht.

Dabei werden zwei Hypothesen aufgestellt. Die Nullhypothese, die besagt, dass die Mittelwertdifferenz zwischen behandelten Proben zufällig entstanden ist und sich die Mittelwerte in Wahrheit nicht unterscheiden, und die Alternativhypothese, die aussagt, dass die Mittelwertdifferenz einem wahren Unterschied entspricht.

Es wird nun die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der die Nullhypothese zutrifft. Der aus dieser Berechnung ermittelte Wert heißt P-Wert. Ist dieser Wert kleiner als 0,05, also trifft die Nullhypothese mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 5% zu, wird die Differenz der Mittelwerte als signifikant erachtet.

Die Berechnungen dieser Arbeit wurden mittels des statistischen Programms der GraphPad Prism Software durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Human Phospho-Kinase Array – LPS Ansatz

Es wurden in diesem Versuch 4 unterschiedlich behandelte Proben von Humanen Fibroblasten miteinander verglichen:

- Unbehandelte Zellen
- Mit LPS behandelte Zellen
- Mit Stressin behandelte Zellen
- Mit Stressin und LPS behandelte Zellen

Dabei wurde durch Bestimmung der Interleukin 6 Spiegel die Wirksamkeit des Stressins und des LPS für die jeweiligen Proben vorab an Zellen der selben Generation bestätigt. Die im ELISA-Reader ausgewerteten Extinktionsmessungen zeigten eine Erhöhung des IL-6 Spiegels in den mit LPS behandelten Wells um ca. das 3,4fache im Vergleich zu den unbehandelten Wells, wohingegen die Erhöhung des IL-6 Spiegels in den mit LPS und Stressin behandelten Wells im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ca. das 2,2fache betrug. Die IL-6 Konzentration in den mit Stressin behandelten Wells war leichtgradig geringer als in den unbehandelten Wells.

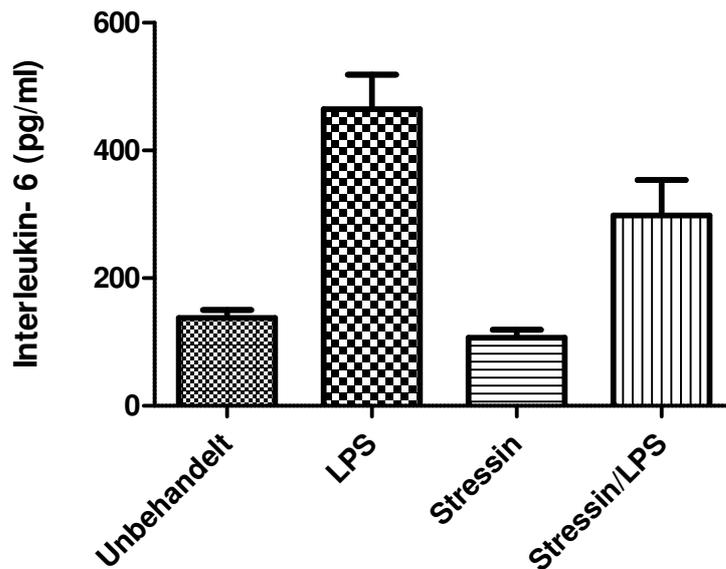


Abbildung 1: Interleukin-6 ELISA zur Überprüfung der Wirksamkeit des LPS und des Stressins 48h nach Stimulation (Unbehandelt: 138pg/ml; LPS: 464pg/ml; Stressin: 106pg/ml; Stressin/LPS: 298pg/ml)

Es wurden die Phosphorylierungsprofile von 46 verschiedenen Kinasen und Transkriptionsfaktoren der einzelnen Proben ermittelt, mit der Analysesoftware Quantity One densitometrisch ausgewertet und tabellarisch/grafisch in Relation zueinander gesetzt. Hier sollten erste richtungsgebende Informationen über differentiell aktivierte Signalkaskaden in den einzelnen Lysaten entstehen, die Hinweise auf die intrazelluläre Wirkungsweise des Stressins geben könnten, welche dann mittels Western Blots zu verifizieren waren. Der Test selbst diente somit als Screeningverfahren.

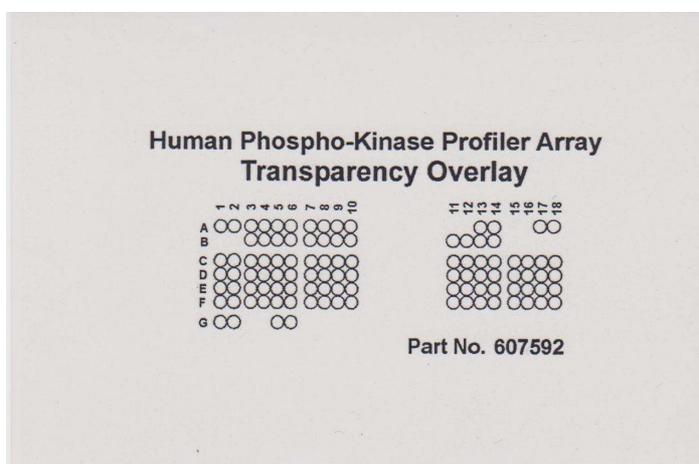


Abbildung 2: Transparente Schablone mit Koordinatenangabe der einzelnen Spots

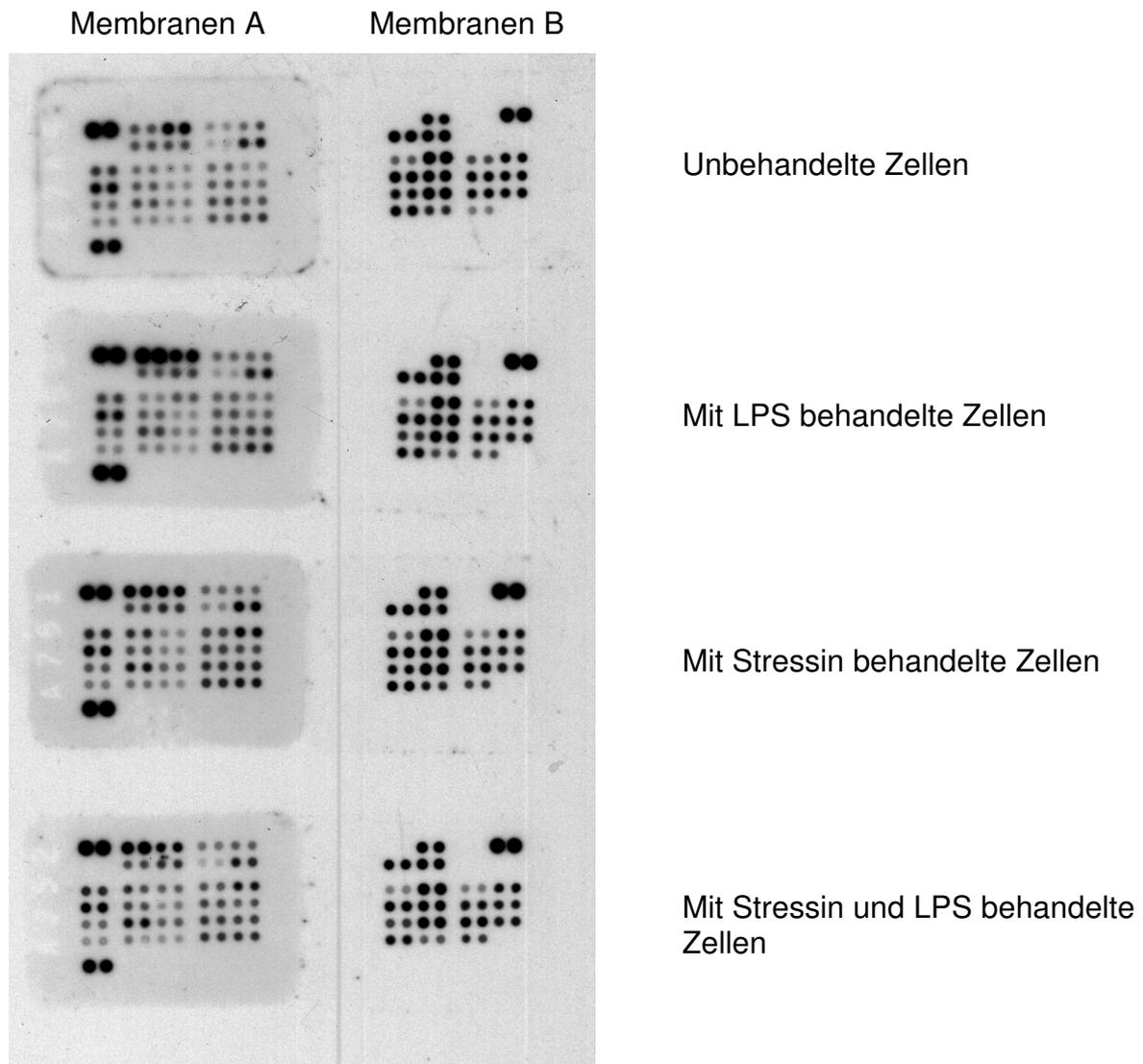


Abbildung 3: zeigt den entwickelten Film der fertig inkubierten Nitrozellulosemembranen der 4 verschiedenen Proben im LPS Ansatz

Tabelle 12: Übersicht der Membran Part A mit Koordinaten der Spots, den untersuchten Proteinen und deren Phosphorylierungsstellen, und den Ergebnissen der densitometrischen Auswertung der Spots mit relativen Werten zur jeweiligen Positivkontrolle in den 4 verschiedenen Proben (Positivkontrolle = 1)

Koordinaten	Protein/Kontrolle	Phosphorylierungs- stelle	unbehandelt	LPS	Stressin	Stressin / LPS
A1,A2	pos. Kontrolle	/	1	1	1	1
A3,A4	p38 α	Thr180/Tyr182	0,18750534	1,15938254	0,73675969	0,93767744
A5,A6	ERK1/2	Thr202/Tyr204, Thr185/ Tyr223	0,74995911	0,79324234	0,69387948	0,4793285
A7,A8	JNK pan	Thr183/ Tyr185, Thr221/ Tyr223	0,07442716	0,13218476	0,12394751	0,0983686
A9,A10	GSK-3 α/β	S21/S9	0,19165508	0,1540476	0,13675876	0,14137922
B3,B4	MEK1/2	S218/S222, S222/S226	0,22310976	0,21069522	0,22107393	0,18003831
B5,B6	MSK 1/2	S376/S360	0,22203257	0,22251281	0,28257508	0,24044974
B7,B8	AMPK α 1	Thr174	0,05037661	0,07065749	0,09711599	0,04152056
B9,B10	AKT	S473	0,3575973	0,32654227	0,51832481	0,31468203
C1,C2	TOR	S2448	0,26568765	0,20993009	0,29567691	0,28475411
C3,C4	CREB	S133	0,13775761	0,10522206	0,26721433	0,25754059
C5,C6	HSP27	S78/S82	0,08129896	0,18630883	0,0891926	0,14432329
C7,C8	AMPK α 2	Thr172	0,13335332	0,14940313	0,21410018	0,14852492
C9,C10	β -Catenin	S33	0,07600267	0,10885737	0,43348242	0,30310329
D1,D2	Src	Tyr419	0,48659836	0,38581224	0,48840549	0,49485141
D3,D4	Lyn	Tyr397	0,17826746	0,16341365	0,18404059	0,19412742
D5,D6	Lck	Tyr394	0,08669541	0,08042829	0,09359848	0,10145098
D7,D8	STAT2	Tyr689	0,16464721	0,17646779	0,2296778	0,19448426
D9,D10	STAT5a	Tyr699	0,13979277	0,14099065	0,22645668	0,16414766
E1,E2	Fyn	Tyr420	0,15559275	0,16392097	0,18498174	0,13634984
E3,E4	Yes	Tyr426	0,23231453	0,2632028	0,35653683	0,41241532
E5,E6	Fgr	Tyr412	0,11011837	0,11072948	0,16428613	0,15331716
E7,E8	STAT3	Tyr705	0,20552199	0,18729094	0,26755483	0,22774249
E9,E10	STAT5b	Tyr699	0,16713611	0,24836869	0,30045794	0,20753356
F1,F2	Hck	Tyr411	0,09763046	0,09447126	0,11085977	0,06905408
F3,F4	Chk-2	Thr68	0,09527841	0,10205327	0,11555593	0,10539733
F5,F6	FAK	Tyr397	0,06553541	0,06970367	0,09759734	0,07348617
F7,F8	STAT6	Tyr641	0,16724533	0,23076959	0,28364714	0,23630957
F9,F10	STAT5a/b	Tyr699	0,26598822	0,33898138	0,39602826	0,29549963
G1,G2	pos. Kontrolle	/	1	1	1	1
G5,G6	neg. Kontrolle	/	0	0	0	0

Tabelle 13: Übersicht der Membran Part B mit Koordinaten der Spots, den untersuchten Proteinen und deren Phosphorylierungsstellen, und den Ergebnissen der densitometrischen Auswertung der Spots mit relativen Werten zur jeweiligen Positivkontrolle in den 4 verschiedenen Proben (Positivkontrolle = 1)

Koordinaten	Protein/Kontrolle	Phosphorylierungs- stelle	unbehandelt	LPS	Stressin	Stressin / LPS
A13,A14	p53	S392	0,53546169	0,73345126	0,7450629	0,70694365
A17,A18	pos. Kontrolle	/	1	1	1	1
B11,B12	AKT	Thr308	0,76261532	0,55785614	0,64729445	0,49606347
B13,B14	p53	S46	0,64435781	0,6499301	0,64303607	0,62124435
C11,C12	p70 S6 Kinase	Thr389	0,14080335	0,09242941	0,13715213	0,07936567
C13,C14	p53	S15	0,93858006	0,68588923	0,85083896	0,77161089
C15,C16	p27	Thr198	0,20786929	0,11569728	0,10981165	0,09629956
C17,C18	Paxillin	Tyr118	0,43845237	0,32470423	0,34481575	0,3548472
D11,D12	p70 S6 Kinase	Thr421/S424	0,67604843	0,49632066	0,65949951	0,49561954
D13,D14	RSK 1/2/3	S380	0,70380064	0,53106042	0,60771659	0,54277847
D15,D16	p27	Tyr157	0,45881593	0,31793069	0,30165584	0,33933907
D17,D18	PLC γ -1	Tyr783	0,50574643	0,35121562	0,31696874	0,35176477
E11,E12	p70 S6 Kinase	Thr229	0,36743692	0,23533933	0,32773856	0,20603408
E13,E14	RSK 1/2	S221	0,67201818	0,48871377	0,62302477	0,56145999
E15,E16	c-Jun	S63	0,37776451	0,3083566	0,47464883	0,60106321
E17,E18	Pyk2	Tyr402	0,37210734	0,26807185	0,2831171	0,30383874
F11,F12	STAT1	Tyr701	0,43343918	0,3351335	0,46836866	0,3185116
F13,F14	STAT4	Tyr693	0,29207147	0,17259964	0,2931587	0,13920318
F15,F16	eNOS	S1177	0,0771788	0,14745888	0,16221671	0,21036659
F17,F18	neg. Kontrolle	/	0	0	0	0

Bei den untersuchten Kinasen und Transkriptionsfaktoren zeigte sich in diesem Ansatz eine interessante Veränderung der Phosphorylierungsprofile bei p38 α , AKT, CREB, β -Catenin, Yes und c-Jun, die Hinweise auf die Wirkungsweise des Stressins liefern könnten.

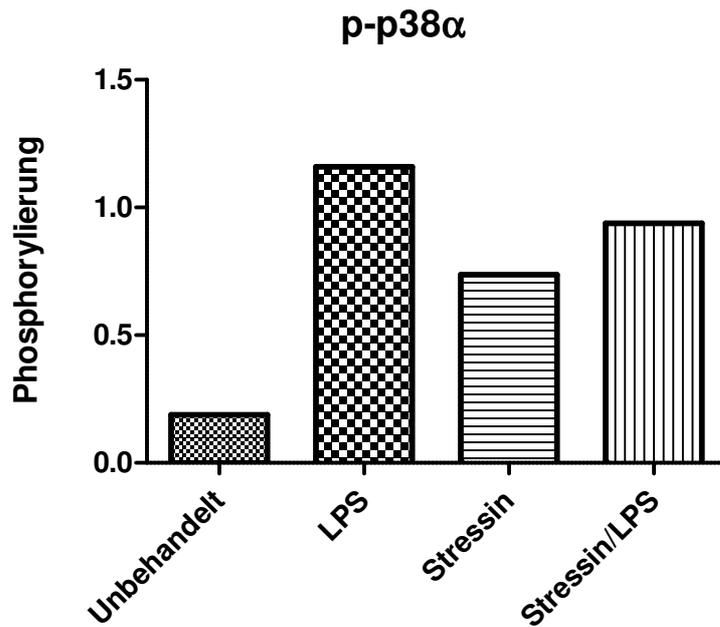


Abbildung 4: zeigt den Phosphorylierungsstatus der Kinase p38 α in den 4 verschiedenen Proben des LPS Ansatzes

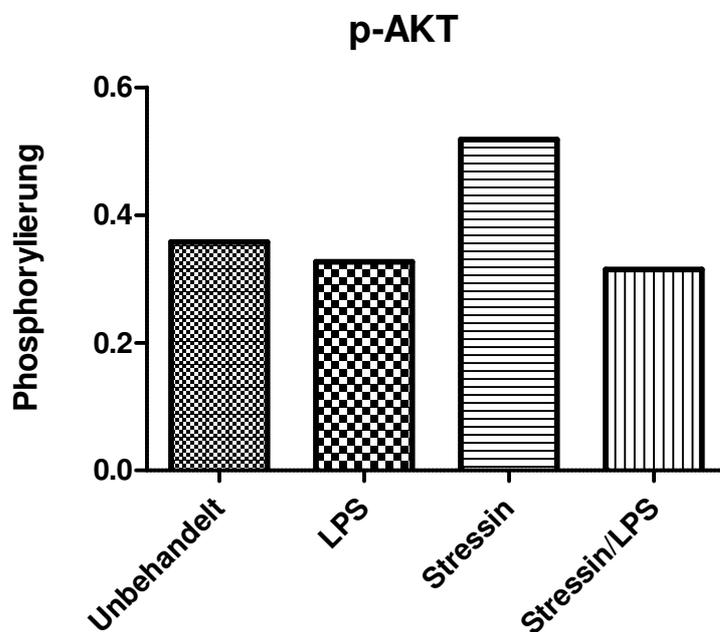


Abbildung 5: zeigt den Phosphorylierungsstatus der Kinase AKT in den 4 verschiedenen Proben des LPS Ansatzes

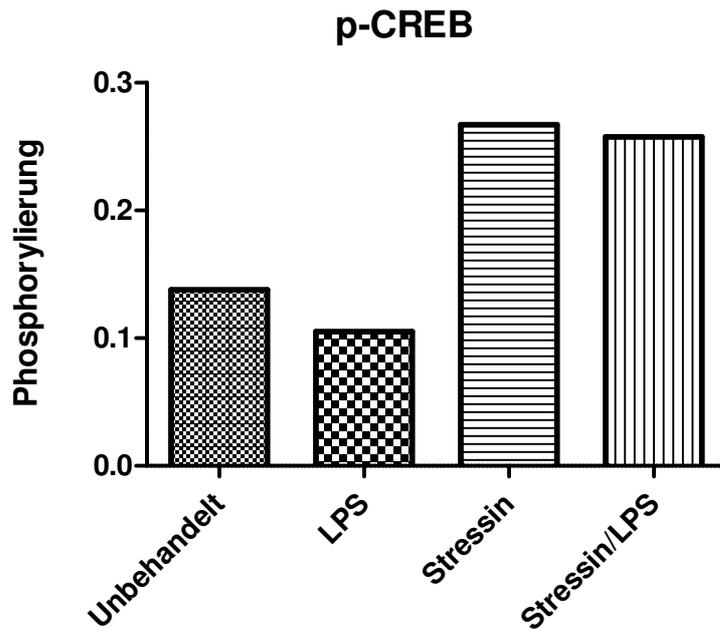


Abbildung 6: zeigt den Phosphorylierungsstatus des Transkriptionsfaktors CREB in den 4 verschiedenen Proben des LPS Ansatzes

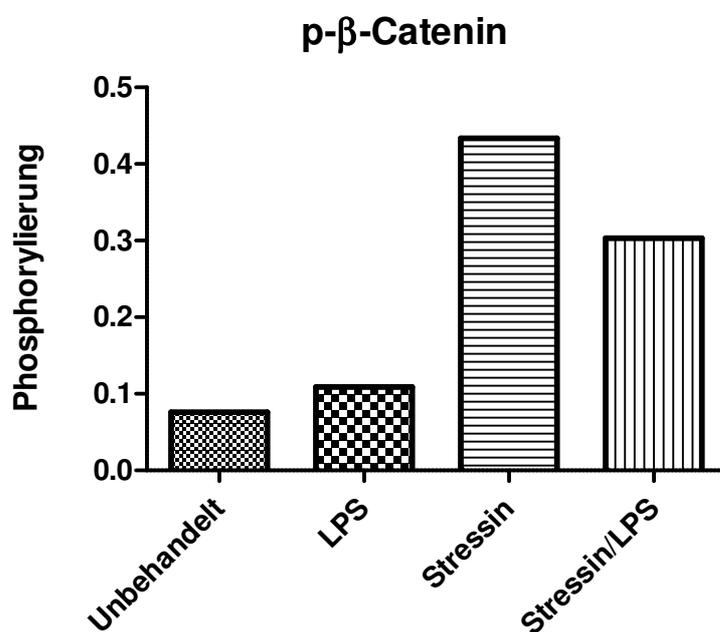


Abbildung 7: zeigt den Phosphorylierungsstatus der Kinase β -Catenin in den 4 verschiedenen Proben des LPS Ansatzes

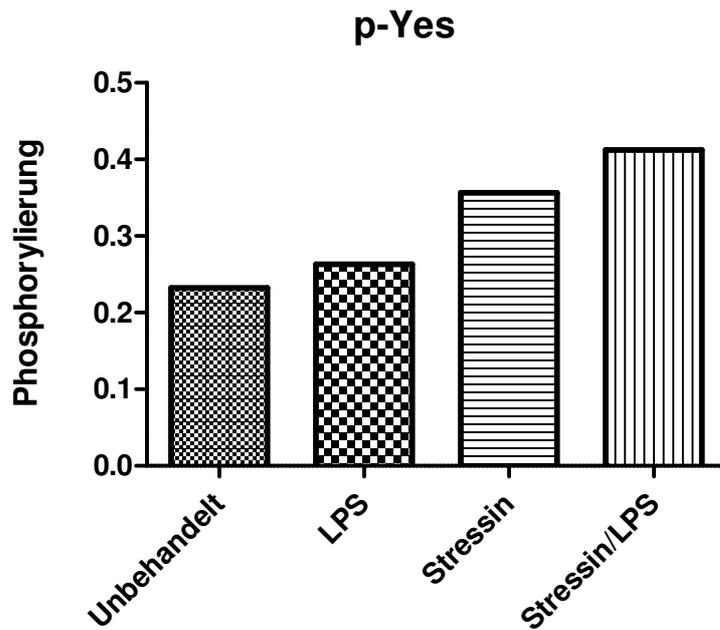


Abbildung 8: zeigt den Phosphorylierungsstatus der Kinase Yes in den 4 verschiedenen Proben des LPS Ansatzes

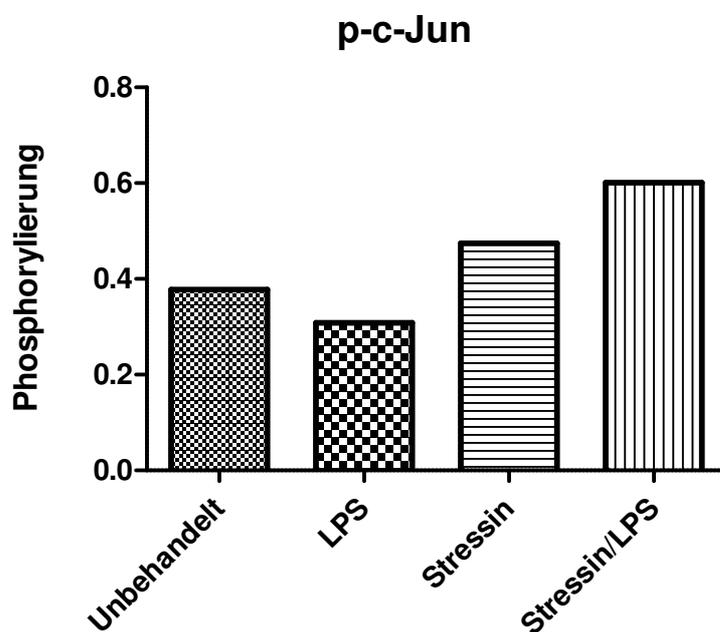


Abbildung 9: zeigt den Phosphorylierungsstatus des Transkriptionsfaktors c-Jun in den 4 verschiedenen Proben des LPS Ansatzes

Hier kam es zu einer verstärkten Aktivierung der Kinase p38 α sowohl nach Stimulation mit LPS als auch nach Stimulation mit Stressin und auch nach gemeinsamer Stimulation.

Bei der Kinase AKT zeigte sich eine selektive Erhöhung des Phosphorylierungsstatus nur nach Stimulation mit Stressin. Die Zugabe von LPS oder Stressin und LPS führte zu keiner wesentlichen Veränderung im Vergleich zur unbehandelten Probe.

Zu einer erhöhten Phosphorylierung kam es bei dem Transkriptionsfaktor CREB nach Zugabe sowohl von Stressin als auch von Stressin und LPS, jedoch nicht nach alleiniger Zugabe von LPS. Diese Probe blieb im Vergleich zur unbehandelten Probe weitgehend unverändert.

Die Kinase β -Catenin war nach Stimulation mit Stressin und auch nach Stimulation mit Stressin und LPS in einem verstärkten Phosphorylierungszustand. Die Stimulation mit LPS führte zu einer geringgradigen Erhöhung des Phosphorylierungszustandes.

Die Kinase Yes zeigte nach Behandlung mit Stressin und nach Behandlung mit Stressin und LPS eine vermehrte Phosphorylierung, die stärker war als der Phosphorylierungszuwachs nach LPS-Stimulation.

Bei dem Transkriptionsfaktor c-Jun führte die Stimulation mit LPS zu einer geringen Reduktion der Phosphorylierung, wohingegen die Proben sowohl nach Stimulation mit Stressin als auch nach Stimulation mit Stressin und LPS einen erhöhten Phosphorylierungsstatus im Vergleich zur unbehandelten Probe aufzuweisen hatten.

5.2 Human Phospho-Kinase Array – Cisplatin Ansatz

Es wurden in diesem Versuch 4 unterschiedlich behandelte Proben von Humanen Fibroblasten miteinander verglichen:

- Unbehandelte Zellen
- Mit Cisplatin behandelte Zellen
- Mit Stressin behandelte Zellen
- Mit Stressin und Cisplatin behandelte Zellen

Dabei wurde mittels des MTT-Assays die Wirksamkeit des Stressins und des Cisplatins für die jeweiligen Proben vorab an Zellen der selben Generation bestätigt. Die im ELISA-Reader ausgewerteten Extinktionsmessungen zeigten eine Reduktion der noch lebenden Zellen in den mit Cisplatin behandelten Wells um ca. 71% im Vergleich zu den unbehandelten Wells, wohingegen die Reduktion der noch lebenden Zellen in den mit Cisplatin und Stressin behandelten Wells im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ca. 60% betrug. Die Anzahl der noch lebenden Zellen in den mit Stressin behandelten Wells war im Unterschied zu den unbehandelten Wells leicht reduziert.

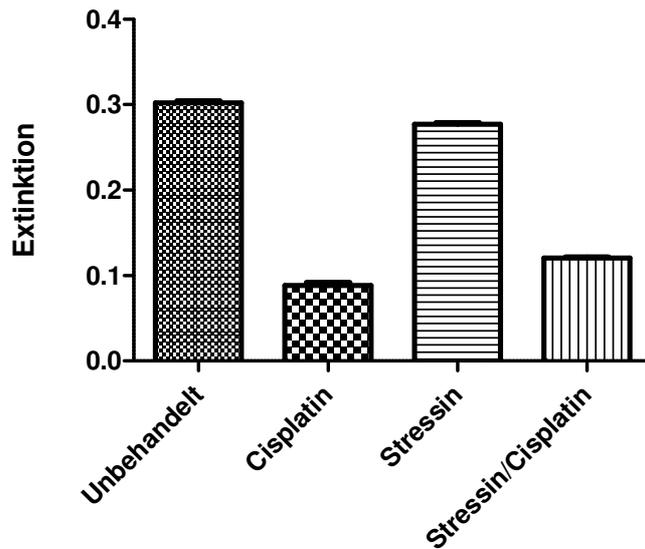


Abbildung 10: MTT-Assay zur Überprüfung der Wirksamkeit des Cisplatin und des Stressins 48 nach Stimulation (Unbehandelt: 0,302; Cisplatin: 0,088; Stressin: 0,277; Stressin/Cisplatin: 0,120)

Es wurden die Phosphorylierungsprofile von 46 verschiedenen Kinasen und Transkriptionsfaktoren der einzelnen Proben ermittelt, mit der Analysesoftware Quantity One densitometrisch ausgewertet und tabellarisch/grafisch in Relation zueinander gesetzt. Hier sollten erste richtungsgebende Informationen über differentiell aktivierte Signalkaskaden in den einzelnen Lysaten entstehen, die Hinweise auf die intrazelluläre Wirkungsweise des Stressins geben könnten, welche dann mittels Western Blots zu verifizieren waren. Der Test selbst diente somit als Screeningverfahren.

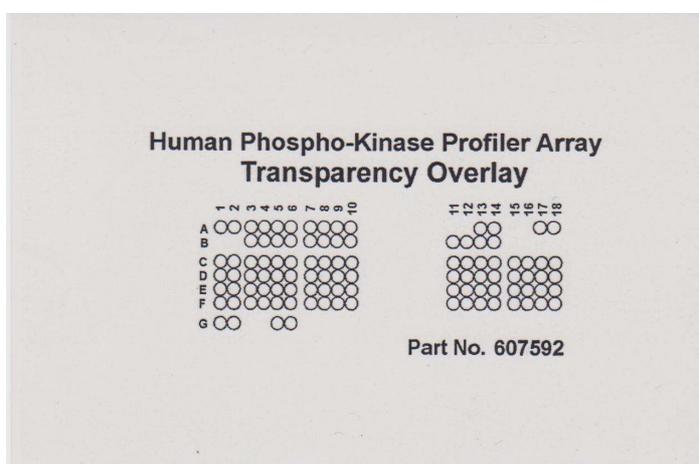


Abbildung 11: Transparente Schablone mit Koordinatenangabe der einzelnen Spots

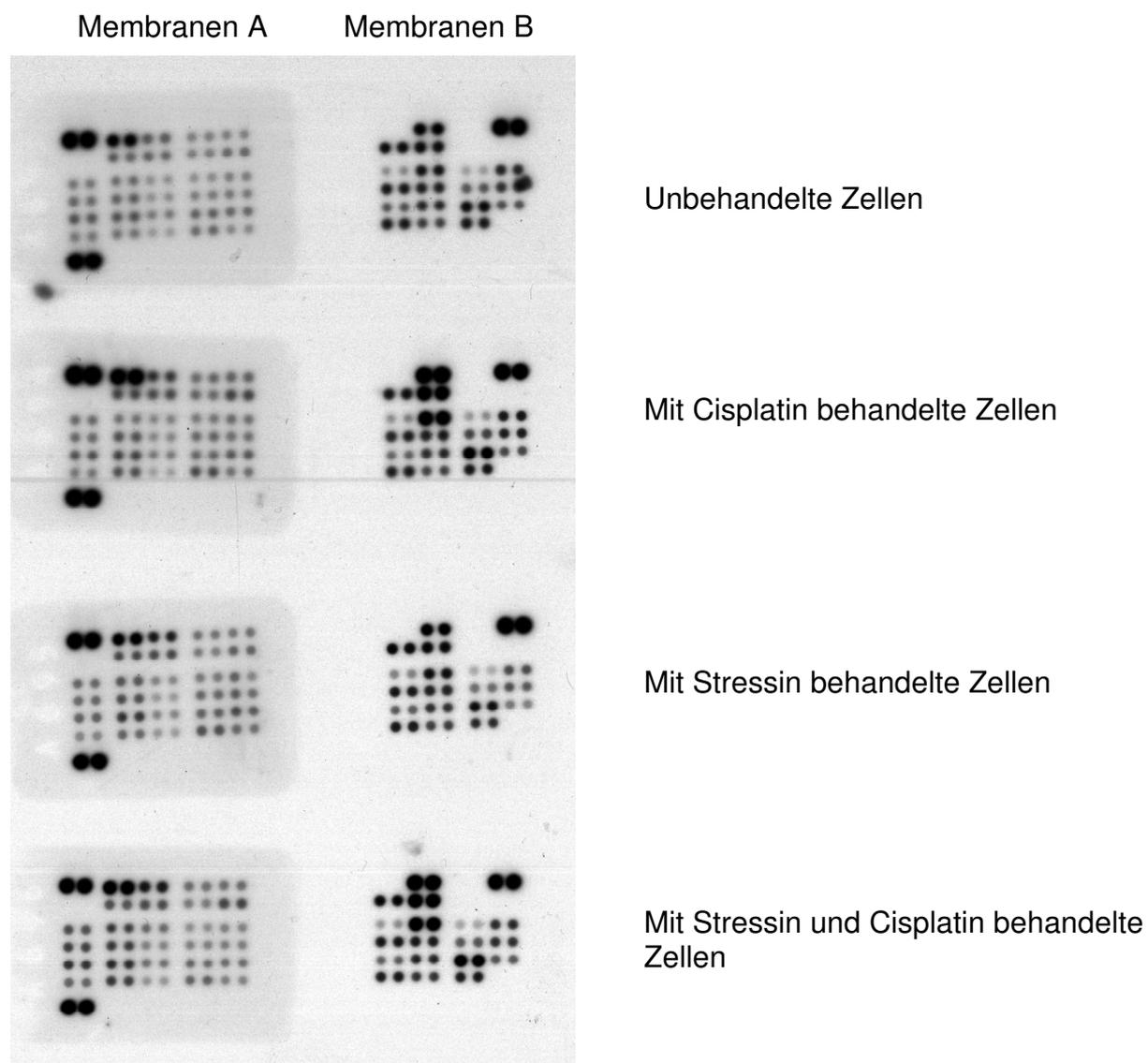


Abbildung 12: zeigt den entwickelten Film der fertig inkubierten Nitrozellulosemembranen der 4 verschiedenen Proben im Cisplatin Ansatz

Tabelle 14: Übersicht der Membran Part A mit Koordinaten der Spots, den untersuchten Proteinen und deren Phosphorylierungsstellen, und den Ergebnissen der densitometrischen Auswertung der Spots mit relativen Werten zur jeweiligen Positivkontrolle in den 4 verschiedenen Proben (Positivkontrolle = 1)

Koordinaten	Protein/Kontrolle	Phosphorylierungs- stelle	unbehandelt	Cisplatin	Stressin	Stressin / Cisplatin
A1,A2	pos. Kontrolle	/	1	1	1	1
A3,A4	p38 α	Thr180/Tyr182	0,524148	0,87391575	0,51624426	0,75630778
A5,A6	ERK1/2	Thr202/Tyr204, Thr185/Tyr223	0,18264131	0,22548391	0,33521324	0,40704933
A7,A8	JNK pan	Thr183/Tyr185, Thr221/Tyr223	0,08310481	0,10310381	0,07953898	0,09354375
A9,A10	GSK-3 α/β	S21/S9	0,07934621	0,12182392	0,07376072	0,09041759
B3,B4	MEK1/2	S218/S222, S222/S226	0,17847083	0,22900017	0,19193307	0,19149709
B5,B6	MSK 1/2	S376/S360	0,15084097	0,18079922	0,16878303	0,18011136
B7,B8	AMPK α 1	Thr174	0,09141751	0,11651182	0,06902588	0,07400797
B9,B10	AKT	S473	0,12138002	0,18961932	0,11086211	0,17935745
C1,C2	TOR	S2448	0,0901093	0,09296663	0,09352679	0,12854327
C3,C4	CREB	S133	0,09523501	0,07784357	0,11846606	0,14514758
C5,C6	HSP27	S78/S82	0,06172104	0,06002984	0,05768219	0,08513557
C7,C8	AMPK α 2	Thr172	0,0624508	0,07935387	0,07966209	0,0484275
C9,C10	β -Catenin	S33	0,08770518	0,10472058	0,12593686	0,06566843
D1,D2	Src	Tyr419	0,13349183	0,10331489	0,10493996	0,17890486
D3,D4	Lyn	Tyr397	0,12601373	0,14030531	0,13865379	0,16620734
D5,D6	Lck	Tyr394	0,06669063	0,06376179	0,04247134	0,06661801
D7,D8	STAT2	Tyr689	0,0808974	0,10405827	0,10043642	0,05974871
D9,D10	STAT5a	Tyr699	0,10186566	0,10771046	0,14281031	0,07493914
E1,E2	Fyn	Tyr420	0,17547249	0,13940584	0,1169806	0,2195236
E3,E4	Yes	Tyr426	0,16062228	0,16589473	0,19197866	0,21314801
E5,E6	Fgr	Tyr412	0,09898452	0,07989251	0,06664641	0,09497951
E7,E8	STAT3	Tyr705	0,13169956	0,1078208	0,11229558	0,09338331
E9,E10	STAT5b	Tyr699	0,11896344	0,12651847	0,16326985	0,08388922
F1,F2	Hck	Tyr411	0,1037712	0,0825961	0,06135557	0,1003209
F3,F4	Chk-2	Thr68	0,10187595	0,13708387	0,09797135	0,18370075
F5,F6	FAK	Tyr397	0,06299888	0,04079988	0,05058006	0,05278407
F7,F8	STAT6	Tyr641	0,10352357	0,14187593	0,13332861	0,08695598
F9,F10	STAT5a/b	Tyr699	0,080209	0,10016719	0,12604509	0,0730891
G1,G2	pos. Kontrolle	/	1	1	1	1
G5,G6	neg. Kontrolle	/	0	0	0	0

Tabelle 15: Übersicht der Membran Part B mit Koordinaten der Spots, den untersuchten Proteinen und deren Phosphorylierungsstellen, und den Ergebnissen der densitometrischen Auswertung der Spots mit relativen Werten zur jeweiligen Positivkontrolle in den 4 verschiedenen Proben (Positivkontrolle = 1)

Koordinaten	Protein/Kontrolle	Phosphorylierungs- stelle	unbehandelt	Cisplatin	Stressin	Stressin / Cisplatin
A13,A14	p53	S392	0,50198753	1,06272298	0,53512466	1,1501121
A17,A18	pos. Kontrolle	/	1	1	1	1
B11,B12	AKT	Thr308	0,37854024	0,31364897	0,41626323	0,42738665
B13,B14	p53	S46	0,38677871	0,83141411	0,36734178	0,93330191
C11,C12	p70 S6 Kinase	Thr389	0,07209462	0,06353103	0,0796436	0,04986386
C13,C14	p53	S15	0,32876171	0,85603128	0,32486937	0,94140445
C15,C16	p27	Thr198	0,05227909	0,05144889	0,0307777	0,03616189
C17,C18	Paxillin	Tyr118	0,3241369	0,36016145	0,17153219	0,26145896
D11,D12	p70 S6 Kinase	Thr421/S424	0,33709545	0,25817302	0,29850747	0,31633991
D13,D14	RSK 1/2/3	S380	0,30567996	0,29705385	0,26727207	0,30154938
D15,D16	p27	Thr157	0,15089832	0,17238345	0,09414655	0,13252237
D17,D18	PLC γ -1	Tyr783	0,26889368	0,29390576	0,14722748	0,25424101
E11,E12	p70 S6 Kinase	Thr229	0,16725659	0,11321896	0,12796982	0,12066788
E13,E14	RSK 1/2	S221	0,25862441	0,21346401	0,2022848	0,23739903
E15,E16	c-Jun	S63	0,4031324	0,60862273	0,319475	0,74555418
E17,E18	Pyk2	Tyr402	0,16214943	0,152605	0,07945575	0,13927759
F11,F12	STAT1	Tyr701	0,32465687	0,27291169	0,28486692	0,27936498
F13,F14	STAT4	Tyr693	0,20916644	0,1637198	0,17011405	0,20858287
F15,F16	eNOS	S1177	0,34192327	0,30949922	0,20298892	0,2896942
F17,F18	neg. Kontrolle	/	0	0	0	0

Bei den untersuchten Kinasen und Transkriptionsfaktoren zeigte sich in diesem Ansatz eine eventuell interessante Veränderung der Phosphorylierungsprofile bei ERK1/2, Yes und Paxillin, die Hinweise auf die Wirkungsweise des Stressins liefern könnten.

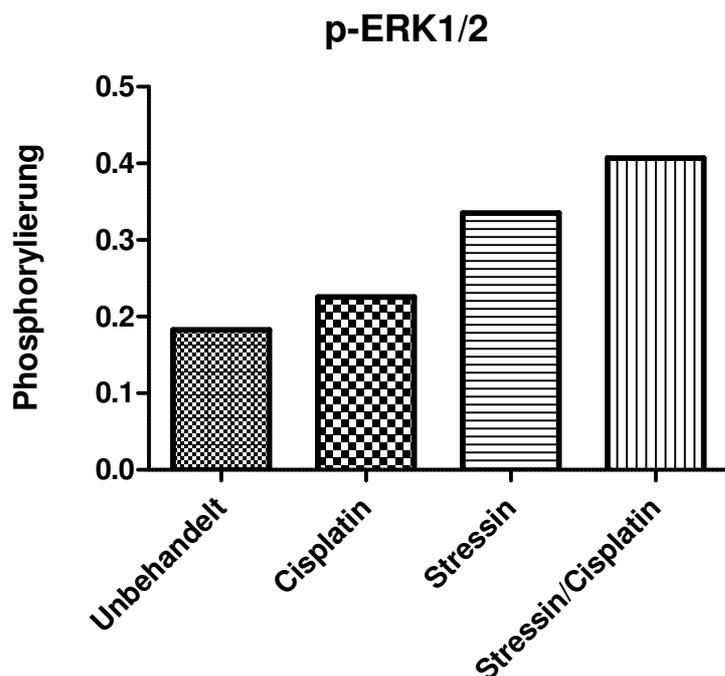


Abbildung 13: zeigt das Phosphorylierungsprofil der Kinase ERK1/2 in den 4 verschiedenen Proben des Cisplatin Ansatzes

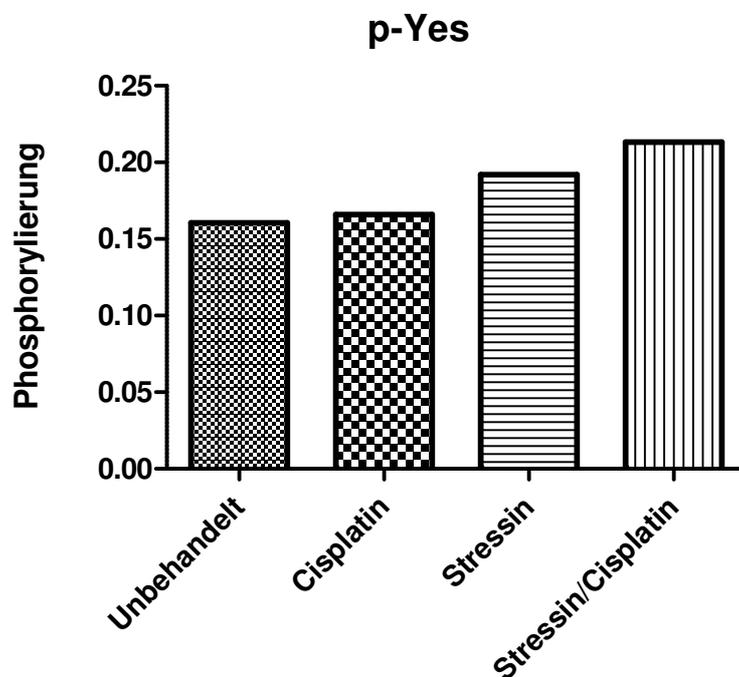


Abbildung 14: zeigt das Phosphorylierungsprofil der Kinase Yes in den 4 verschiedenen Proben des Cisplatin Ansatzes

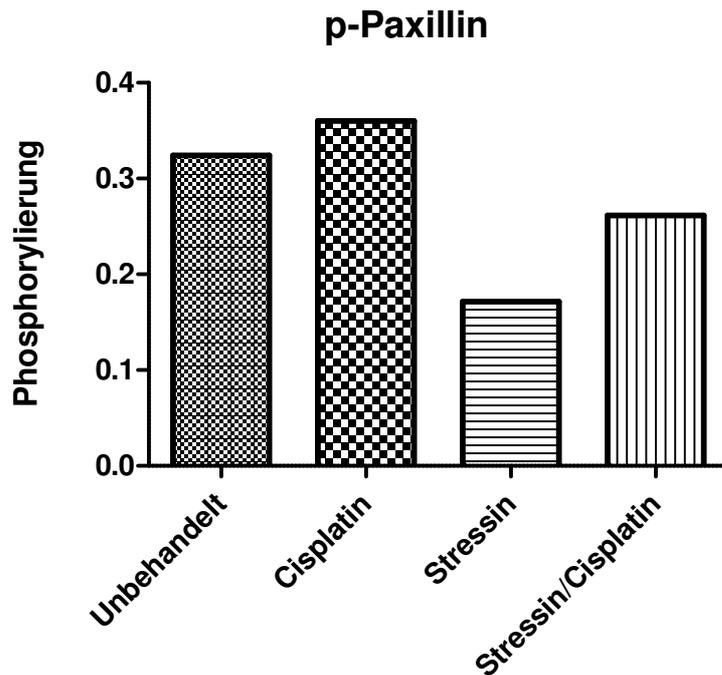


Abbildung 15: zeigt das Phosphorylierungsprofil des Adapterproteins Paxillin in den 4 verschiedenen Proben des Cisplatin Ansatzes

Hier kam es zu einer verstärkten Aktivierung von ERK1/2 nach Stimulation mit Stressin und auch nach Stimulation mit Stressin und Cisplatin. Die alleinige Stimulation mit Cisplatin bewirkte eine geringe Aktivierung.

Es kam zu einer Aktivierung der Yes-Kinase nach Stimulation mit Stressin und auch nach Stimulation mit Stressin und Cisplatin. Die alleinige Stimulation mit Cisplatin bewirkte kaum eine Veränderung.

Es kam zu einer verstärkten Reduktion des Phosphorylierungsstatus von Paxillin nach Stimulation mit Stressin und einer milderer Reduktion nach Stimulation mit Stressin und Cisplatin. Die alleinige Stimulation mit Cisplatin bewirkte einen leicht erhöhten Phosphorylierungsstatus.

5.3 Western Blots

Die im LPS-Ansatz des Phospho-Kinase-Arrays interessanten Kinasen und Transkriptionsfaktoren wurden in Western Blots weiter untersucht, um die Ergebnisse eventuell verifizieren zu können. Der Versuchsansatz war dem des Phospho-Kinase-Arrays ähnlich. Folgende vier unterschiedlich behandelte Proben von Humanen Fibroblasten wurden untersucht:

- Unbehandelte Zellen (-)
- Mit LPS behandelte Zellen (LPS)
- Mit Stressin behandelte Zellen (+)
- Mit Stressin und LPS behandelte Zellen (LPS/+)

Die Inkubationszeiten der Substanzen betragen 1h. Auch hier wurde durch Bestimmung der Interleukin 6 Spiegel die Wirksamkeit des Stressins und des LPS für die jeweiligen Proben vorab an Zellen der selben Generation bestätigt. Exemplarisch sind Extinktionsmessungen 3 verschiedener Proben zusammengefasst. Hierbei zeigte sich die Wirksamkeit des LPS in der signifikanten Erhöhung der IL-6 Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Probe und die Wirksamkeit des Stressins durch die signifikante Reduktion der IL-6 Konzentration in der mit LPS und Stressin behandelten Probe im Vergleich zu der nur mit LPS behandelten Probe.

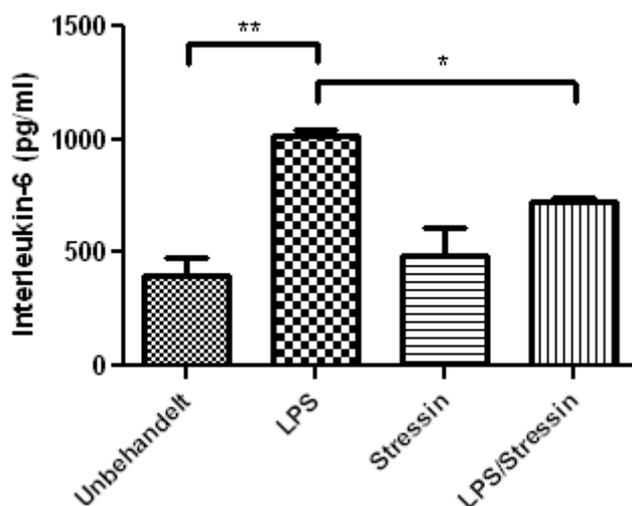


Abbildung 16: Interleukin-6 ELISA zur Überprüfung der Wirksamkeit des LPS und des Stressins 48h nach Stimulation (Unbehandelt: 394 pg/ml; LPS: 1014 pg/ml; Stressin: 490 pg/ml; Stressin/LPS: 724 pg/ml); *, $p = 0,0018$, $n = 3$; **, $p = 0,0022$, $n = 3$

5.3.1 P38 α -Western Blots

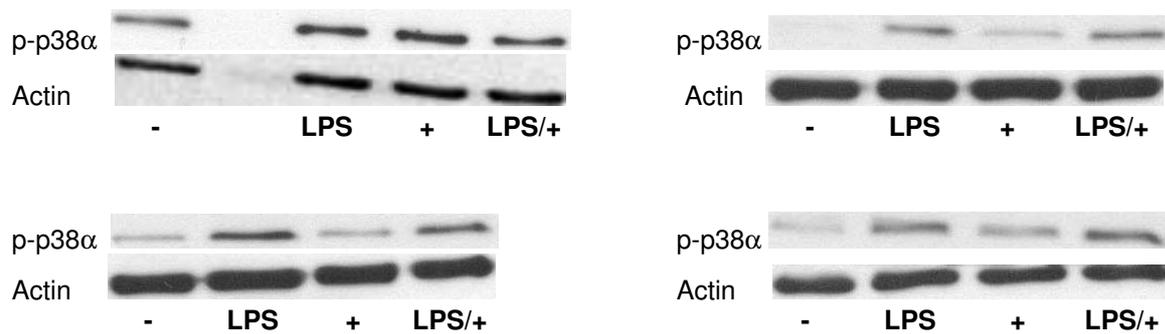


Abbildung 17: p-p38 α Western Blots mit Actin als Proteinbeladungskontrolle von 4 verschiedenen Zellansätzen Humaner Fibroblasten; Unbehandelte Zellen (-), mit LPS behandelte Zellen (LPS), mit Stressin behandelte Zellen (+), mit Stressin und LPS behandelte Zellen (LPS/+)

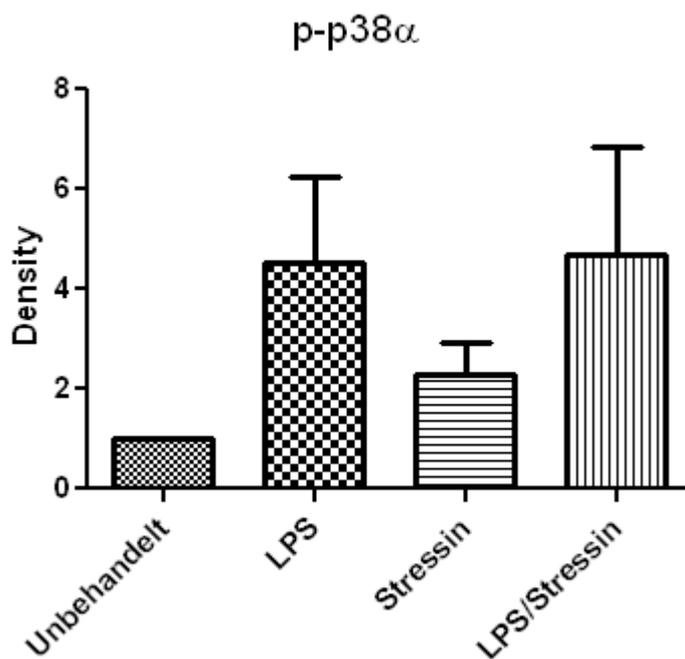


Abbildung 18: Zusammenfassung der p-p38 α Western Blots; (Unbehandelt: 1; LPS: 4,51 ; Stressin: 2,27; Stressin/LPS: 4,67)

Die im Phospho-Kinase Array durch Stressin verursachte Aktivierung von p38 α konnte in den Western Blots nur in der Tendenz, nicht aber signifikant bestätigt werden.

5.3.2 AKT-Western Blots

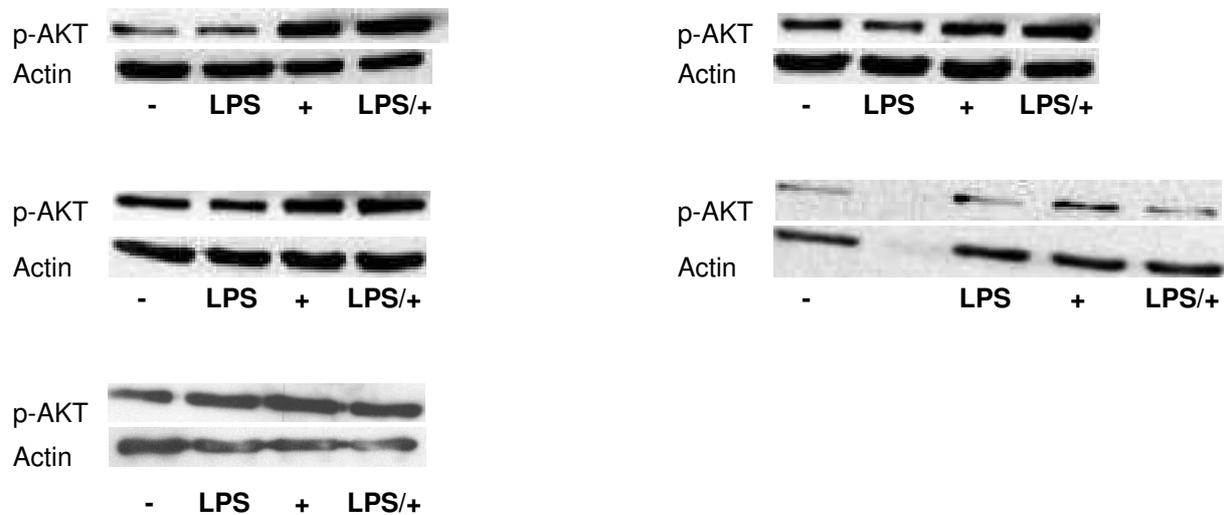


Abbildung 19: p-AKT Western Blots mit Actin als Proteinbeladungskontrolle von 5 verschiedenen Zellansätzen Humaner Fibroblasten; Unbehandelte Zellen (-), mit LPS behandelte Zellen (LPS), mit Stressin behandelte Zellen (+), mit Stressin und LPS behandelte Zellen (LPS/+)

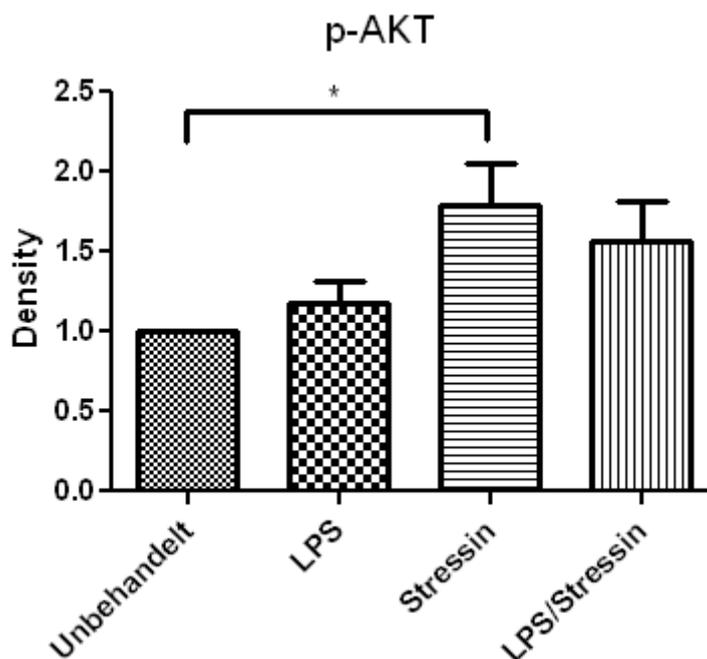


Abbildung 20: Zusammenfassung der p-AKT Western Blots; (Unbehandelt: 1; LPS: 1,17; Stressin: 1,79; Stressin/LPS: 1,56); *, $p = 0,016$

Die im Phospho-Kinase Array durch Stressin hervorgerufene Aktivierung der Kinase AKT konnte in den Western Blots weiter nachgewiesen und als signifikant bestätigt werden.

5.3.3 β -Catenin-Western Blots

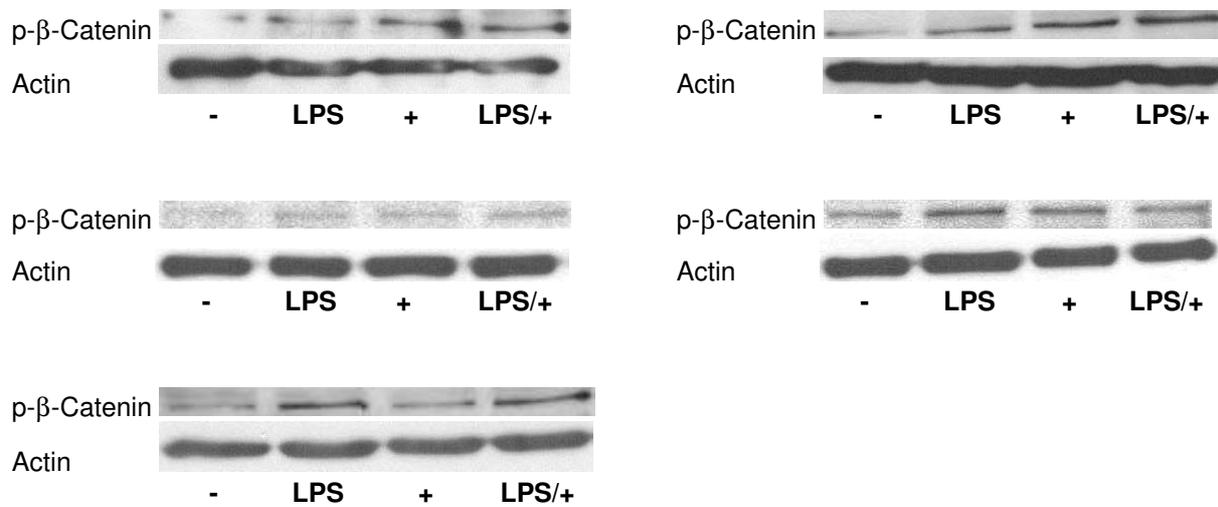


Abbildung 21: p- β -Catenin Western Blots mit Actin als Proteinbeladungskontrolle von 5 verschiedenen Zellansätzen Humaner Fibroblasten; Unbehandelte Zellen (-), mit LPS behandelte Zellen (LPS), mit Stressin behandelte Zellen (+), mit Stressin und LPS behandelte Zellen (LPS/+)

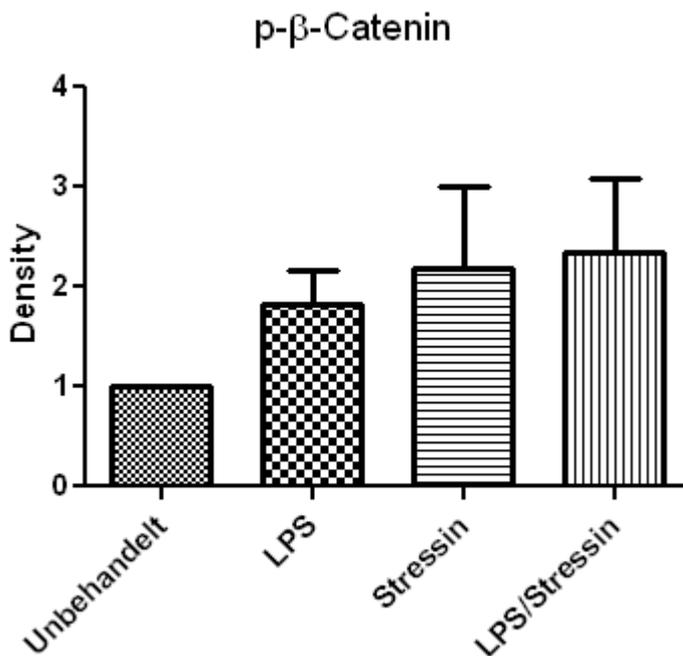


Abbildung 22: Zusammenfassung der p- β -Catenin Western Blots; (Unbehandelt: 1; LPS: 1,81; Stressin: 2,18; Stressin/LPS: 2,34)

Die im Phospho-Kinase Array durch Stressin verursachte Aktivierung von β -Catenin konnte in den Western Blots nur in der Tendenz, nicht aber signifikant bestätigt werden.

5.3.4 Src-Western Blots

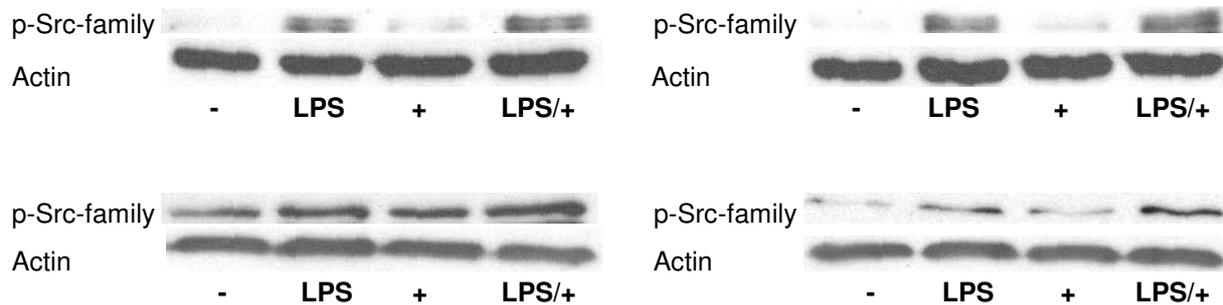


Abbildung 23: p-Src-family Western Blots mit Actin als Proteinbeladungskontrolle von 4 verschiedenen Zellansätzen Humaner Fibroblasten; Unbehandelte Zellen (-), mit LPS behandelte Zellen (LPS), mit Stressin behandelte Zellen (+), mit Stressin und LPS behandelte Zellen (LPS/+)

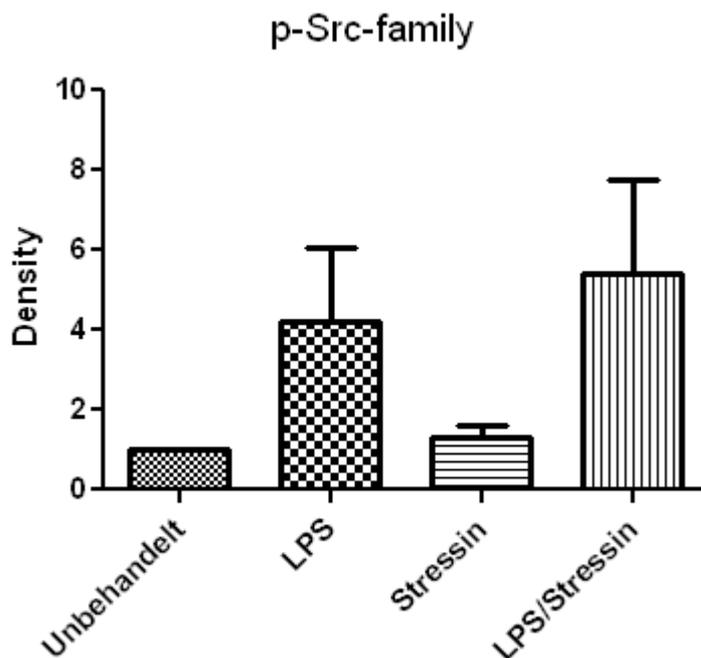


Abbildung 24: Zusammenfassung der p-Src-family Western Blots; (Unbehandelt: 1; LPS: 4,19; Stressin: 1,31; Stressin/LPS: 5,43)

Die im Phospho-Kinase Array durch Stressin verursachte Aktivierung der zur Src-Familie gehörenden Kinase Yes konnte in den Western Blots nicht bestätigt werden.

5.3.5 CREB-Western Blots

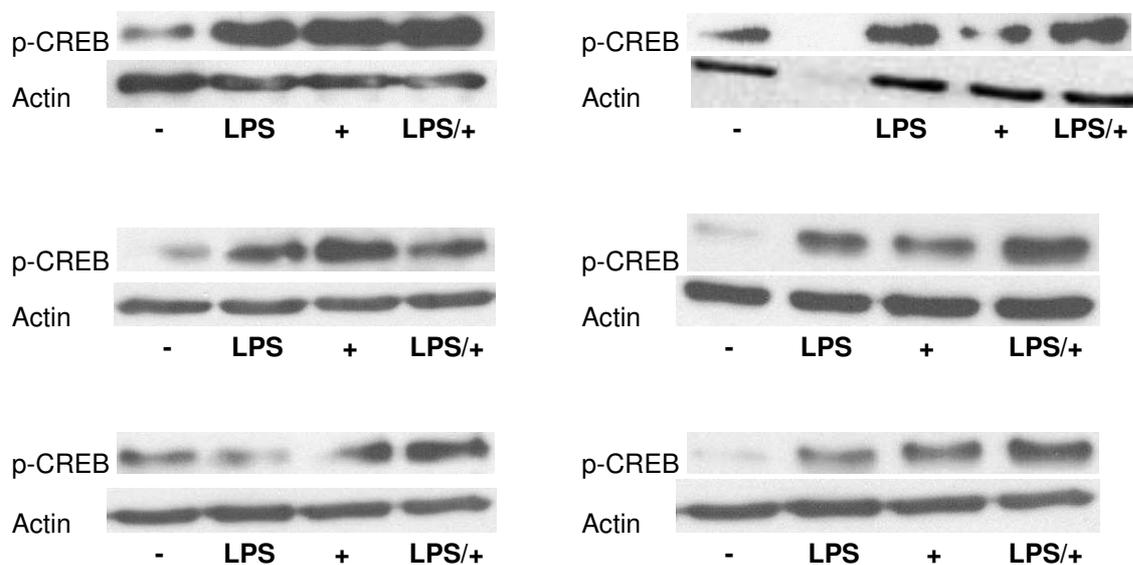


Abbildung 25: p-CREB Western Blots mit Actin als Proteinbeladungskontrolle von 6 verschiedenen Zellansätzen Humaner Fibroblasten; Unbehandelte Zellen (-), mit LPS behandelte Zellen (LPS), mit Stressin behandelte Zellen (+), mit Stressin und LPS behandelte Zellen (LPS/+)

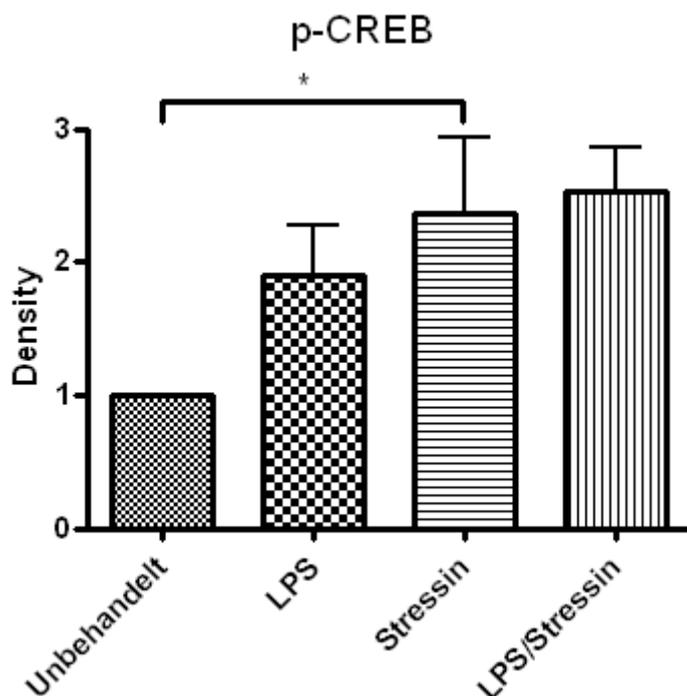


Abbildung 26: Zusammenfassung der p-CREB Western Blots; (Unbehandelt: 1; LPS: 1,9; Stressin: 2,36; Stressin/LPS: 2,52); *, $p = 0,0378$

Die im Phospho-Kinase Array durch Stressin hervorgerufene Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB konnte in den Western Blots weiter nachgewiesen und als signifikant bestätigt werden.

5.4 Stressin Zeitkinetik

Aufgrund der signifikanten Aktivierung der Kinase AKT und des Transkriptionsfaktors CREB nach Stressin-Zugabe wurden diese, sowie die Kinase GSK3 β in einer Stressin Zeitkinetik dargestellt. Hierfür wurden Proteinlysate von Zellen nach Stressinzugabe zu den Zeitintervallen 5min, 15min, 1h und 4h gewonnen und untersucht.

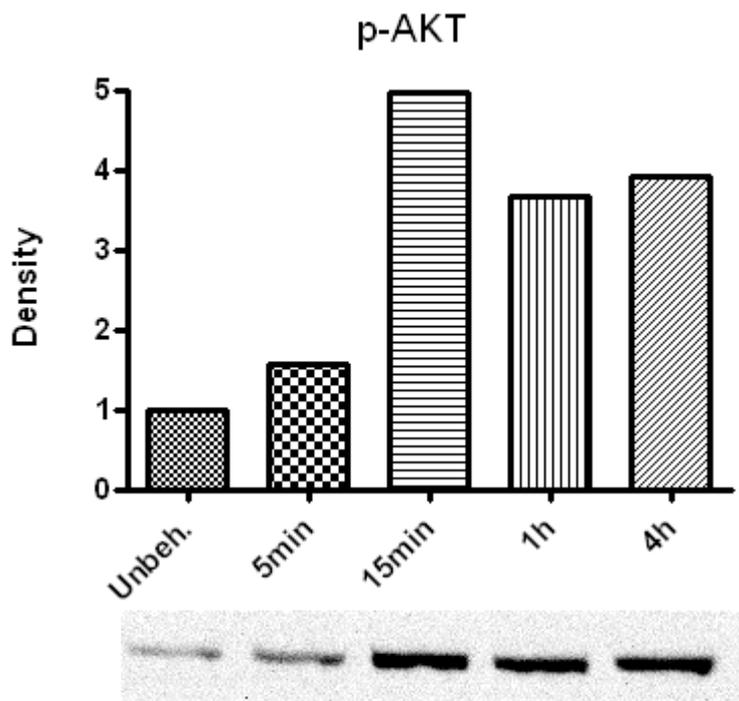


Abbildung 27: Stressin Zeitkinetik der Kinase AKT; (Unbehandelt: 1; 5min:1,56; 15min: 4,96; 1h: 3,66; 4h: 3,92)

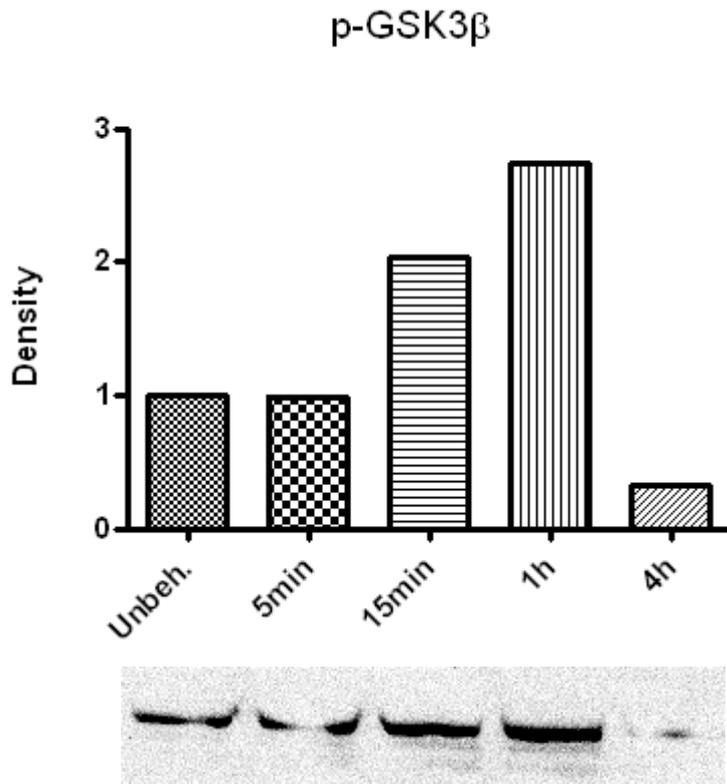


Abbildung 28: Stressin Zeitkinetik der Kinase GSK3 β ; (Unbehandelt: 1; 5min: 0,99; 15min: 2,03; 1h: 2,74; 4h: 0,32)

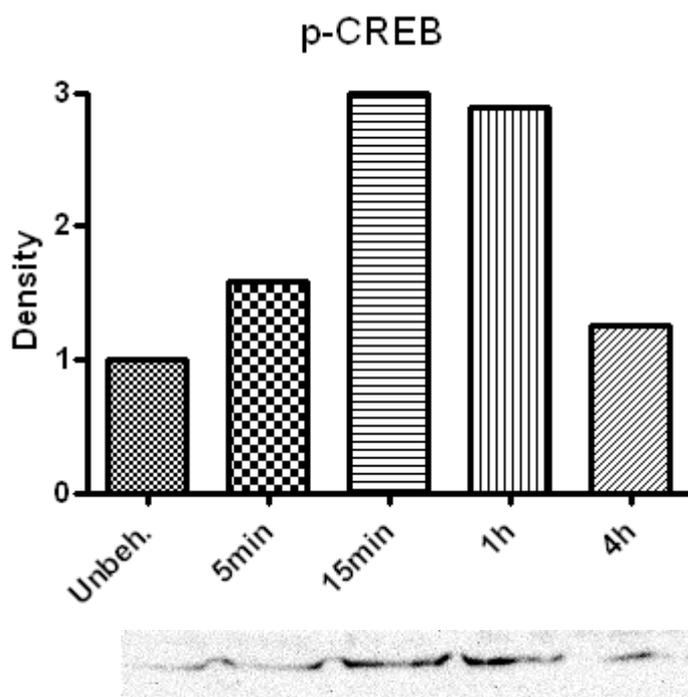


Abbildung 29: Stressin Zeitkinetik des Transkriptionsfaktors CREB; (Unbehandelt: 1; 5min: 1,58; 15min: 2,99; 1h: 2,89; 4h: 1,25)



Abbildung 30: Actin als Proteinbeladungskontrolle der Stressinzeitkinetik für die Western Blots der Abb. 27-29

Die Stressin Zeitkinetik von Akt, GSK3 β und CREB zeigt eine deutlich erhöhte Phosphorylierung schon ab 15min bei allen 3 Enzymen. Der zeitliche Zusammenhang verstärkt den Hinweis auf eine Stimulation des intrazellulären Signalwegs Akt \rightarrow CREB und Akt \rightarrow GSK3 β \rightarrow CREB durch Stressin.

6 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit, den primären Wirkungsmechanismus von Stressin aufzudecken, konnte nicht vollständig erreicht werden. Die Ergebnisse geben jedoch erste richtungsführende Hinweise auf intrazellulär angesprochene Enzyme. Hierbei hervorzuheben sind vor allem die signifikante Aktivierung der Proteinkinase B/AKT (Abb.20) und des Transkriptionsfaktors CREB (Abb. 26) in den Western Blot Untersuchungen.

Der zunächst verwendete Phospho-Kinase Array war in Bezug auf die beiden oben genannten Enzyme im LPS-Ansatz hilfreich. Es zeigten sich aber auch Diskrepanzen zwischen den Phospho-Kinase Array- und Western Blot Ergebnissen, wobei der Array, wie schon in Abschnitt 5 erwähnt, nur als Screeningverfahren diente und zur Gewinnung valider Aussagen der Western Blot die Methode der Wahl darstellte.

6.1 Wirkung des Stressins über Proteine der Bcl-2 Familie

Nach den in dieser Arbeit erstellten Ergebnissen hat das Peptid Stressin einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der Protein Kinase B/Akt (Abb. 20) und auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB (Abb. 26). Dieser Einfluss ist schon nach kurzer Zeit (15min) messbar (Abb. 27; Abb. 29). Inwiefern kann man diese Ergebnisse mit den charakteristischen Eigenschaften des Stressins in Verbindung bringen und als Erklärungsmodell anwenden?

Dabei betrachten wir die Kinase Akt in Hinblick auf zellprotektive Eigenschaften. Akt ist ein wichtiges Bindeglied in der Übermittlung von Überlebenssignalen durch Wachstumsfaktoren, extrazelluläre Matrix und andere Stimuli (Datta et al. 1999). Die Kinase hat hemmende Wirkung auf proapoptotische Signalwege, sowie fördernde Wirkung auf antiapoptotische Signalwege. Dies geschieht zum einen über die Regulation von Genexpression, zum anderen über direkte Phosphorylierung von Proteinen, die mit der Apoptose in Zusammenhang stehen (Nicholson et al. 2002). Interessanterweise führt ein bestimmter antiapoptotischen Signalweg über die direkte Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (Du et al. 1998). Hierbei kommt es unter anderem zu erhöhter Expression des Bcl-2-Gens (Spugazhenti et al. 2000) und des

Mcl-1-Gens (Wang et al. 1999). Die in den Genen codierten Proteine gehören zur antiapoptotischen Untergruppe der Bcl-2 Familie, welche einen wesentlichen Einfluss auf die intrinsisch eingeleitete Apoptose hat (Reed 1998). Von der Bcl-2 Familie gibt es mittlerweile 19 bekannte Mitglieder. Sie lassen sich in 3 Untergruppen unterteilen, die alle mindestens eins von vier konservierten Motiven (BH1, BH2, BH3, BH4) besitzen. Zur ersten Gruppe gehören die antiapoptotischen Mitglieder Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w (Bcl-2-L2), Mcl-1, A1 (Bfl-1), Nr-13 und Boo (Diva). Sie besitzen mindestens die Motive BH1 und BH2. Bcl-2 besitzt alle vier Motive. Zur zweiten Gruppe gehören die proapoptotischen Mitglieder Bax, Bak und Bok (Mtd). Diese haben die Motive BH1, BH2 und BH3. Die dritte Gruppe besitzt nur die BH3 Domäne. Zu dieser gehören die proapoptotischen Mitglieder Bid, Bad, Bim, Bik, Hrk (DP5), Bnip3, BimL und Noxa (Zimmermann et al. 2001). Die intrinsische Apoptose ist gekennzeichnet durch den zentralen Schritt der Permeabilisation der äußeren Mitochondrienmembran und Abgabe von Cytochrom-c aus dem Mitochondrium in das Cytosol (Green et al. 2004; Lucken-Ardjomande et al. 2005). Die beiden proapoptotischen Untergruppen fördern die Permeabilisation, wohingegen die antiapoptotischen Mitglieder als Gegenspieler wirken. Durch ein vermehrtes Vorkommen der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Mcl-1 wird die äußere Mitochondrienmembran stabilisiert und ein Austreten von Cytochrom C verhindert, sodass die Einleitung der Apoptose unterbleibt (Kluck et al. 1997; Yang et al. 1997). Dies ist ein Ansatz zur Erklärung der zellprotektiven Eigenschaften des Stressins über die Hochregulation der Genexpression von Bcl-2 und Mcl-1. Um diesen Ansatz verifizieren zu können, sollten weitere in vitro Untersuchungen von Zellen mit und ohne Stressinzugabe in Bezug auf RNA-Expressionsmuster der Bcl-2 Familie erfolgen. Des Weiteren sollte grundsätzlich gezeigt werden, dass die zellprotektiven Eigenschaften des Stressins die Anwesenheit der Kinase Akt benötigen. Hierzu sollten in vitro Versuche mit selektiven Akt-Inhibitoren durchgeführt werden.

Die in vivo Versuche am Mausmodell zur Amyotrophen Lateralsklerose beleuchten besonders die neuroprotektiven Effekte des Stressins. Die Literatur zeigt, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB Zellüberleben und Zellwachstum von Neuronen fördert und dass bei Abwesenheit von CREB gesteigerte Apoptose von Neuronen stattfindet – unter anderem induziert durch Bax, einem proapoptotischen Gegenspieler von Bcl-2 (Lonze et al 2002). Auch Neurotrophine wie NGF (Nerve growth factor), die für Wachstum, Differenzierung und Überleben von Neuronen

sorgen, wirken über gesteigerte Gentranskription CREB-regulierter Gene (Finkbeiner et al. 1997). An der Übermittlung dieser Signale ist unter anderem der PI3/Akt Signalweg beteiligt (Huang et al. 2001).

Diese Erkenntnis untermauert die Hypothese, dass Stressin seine antiapoptotischen Eigenschaften über die Enzyme Akt und CREB ausübt, und dass es durch die Aktivität von CREB zu erhöhter Expression von antiapoptotischen Genen wie Bcl-2 und Mcl-1 kommt.

6.2 Weitere zellprotektive Effekte von Akt und mögliche Ansatzpunkte für die Wirkungsweise des Stressins

Wie schon im Abschnitt 6.1 angedeutet, kontrolliert die Kinase Akt ein weites Spektrum an nachgeschalteten Proteinen, die an der Regulation von Apoptose und Überleben einer Zelle beteiligt sind (Datta et al. 1999; Nicholson et al. 2001). Dementsprechend muss geklärt werden, inwieweit Stressin außer auf den Transkriptionsfaktor CREB zusätzlich Einfluss auf weitere Ziele von Akt ausübt.

Die zur Forkhead-Familie gehörenden Transkriptionsfaktoren FKHR, FKHL1 und AFX verweilen im unphosphorylierten Zustand überwiegend im Nukleus, wo sie Transkription proapoptotischer Zielgene wie Fas-L, IGFBP1 und Bim betreiben (Dijkers et al. 2000; Brunet et al. 1999). Durch Aktivierung der Kinase Akt kommt es zur Phosphorylierung dieser Transkriptionsfaktoren (Biggs et al. 1999; Kops et al. 2000; Rena et al. 1999). Es wird der Export aus dem Zellkern eingeleitet und es erfolgt die Bindung an 14-3-3 Proteine im Zytoplasma, sodass keine Transkription mehr durchgeführt werden kann und das Ablesen von proapoptotischen Genen unterbleibt (Biggs et al. 1999; Brunet et al. 1999).

NF- κ B ist bekannt als Transkriptionsfaktor einer Großzahl an Genen, die mit der Immunantwort und Inflammation in Zusammenhang stehen (Ghosh et al. 1998). Aber auch die Regulation von Apoptose wird durch diesen Transkriptionsfaktor beeinflusst. Im aktiven Zustand von NF- κ B kann eine erhöhte Transkription der antiapoptotischen Gene c-IAP-1 und c-IAP-2 nachgewiesen werden (Baldwin 2001). Reguliert wird NF- κ B durch seine Lokalisation in der Zelle. Im inaktiven Zustand ist der Transkriptionsfaktor an das Protein I κ B im Zytosol gebunden. Durch

Phosphorylierung dieses Proteins wird die Bindung aufgehoben, I κ B wird subsequent durch Ubiquitinierung abgebaut und NF- κ B kann an seinen Wirkungsort in den Nukleus translozieren. Die Phosphorylierung von I κ B erfolgt über die Kinasen IKK α und IKK β (Häcker et al. 2006). Akt kann über die Aktivierung der IKK Kinasen in diesen Signalweg eingreifen und eine antiapoptotische Wirkung ausüben (Romashkova et al. 1999). Ein interessanter Aspekt hierzu ist die Fähigkeit von gewissen Tumoren, Zelltod durch Chemotherapie oder Bestrahlung über die Aktivierung von NF- κ B zu unterbinden (Baldwin 2001). Dies ähnelt der Wirkung von Stressin, in vitro zytotoxische Effekte von Cisplatin zu unterdrücken, sowie Mäuse vor einer letalen Strahlendosis zu schützen (Abschnitt 1.1).

Akt beeinflusst Apoptose nicht nur über Veränderung der Gentranskription, sondern kann auch direkt Schlüsselfiguren in der Regulation der Apoptose phosphorylieren. Ein gut untersuchtes Beispiel dazu ist das schon in Abschnitt 6.1 erwähnte Protein BAD, welches zur proapoptotischen Untergruppe der Bcl-2 Familie gehört (Zimmermann et al 2001). BAD antagonisiert die Wirkung der antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie wie Bcl-2 und Bcl-XL durch direkte Bindung an diese. Die Phosphorylierung von BAD durch Akt an S136 bewirkt dessen Bindung an 14-3-3 Proteine im Zytosol und verhindert so den antagonisierenden Einfluss, sodass Proteine wie Bcl-2 und Bcl-XL ihre antiapoptotische Wirkung weiter ausführen können (Datta et al. 1997; del Peso et al. 1997).

Es ist also noch zu klären, inwieweit die Transkriptionsfaktoren der Forkheadfamilie, NF- κ B und das Protein BAD Ziele der Wirkungsweise des Stressins darstellen. Dies sollte in nachfolgenden Untersuchungen überprüft werden.

6.3 Erklärungsmodell der antiinflammatorischen Komponente des Stressins

Die Literatur beschreibt antiinflammatorische Effekte über die Aktivierung des Signalwegs PI3-K/Akt \rightarrow GSK3 β \rightarrow CREB (Martin et al. 2005; Guha et al. 2002; Hu et al. 2006). Die Aktivierung von Akt führt zu einer Phosphorylierung von GSK3 β . GSK3 β ist im phosphorylierten Zustand inaktiv. Damit wird die hemmende Wirkung auf den Transkriptionsfaktor CREB aufgehoben. CREB und der proinflammatorisch wirkende Transkriptionsfaktor NF- κ B konkurrieren bei der Transkription um das Adapterprotein CBP (CREB-binding Protein). Durch erhöhte Aktivität von CREB erfolgt die vermehrte Bindung von CBP. CBP steht im Zellkern nur in begrenztem Maße zur Verfügung, weshalb sich die Transkription proinflammatorischer Gene durch NF- κ B verringert (Martin et al. 2005). Hinweise darauf, dass Stressin möglicherweise über diesen Signalweg antiinflammatorisch wirkt, gibt die Zeitkinetik von Akt, GSK3 β und CREB in Abschnitt 5.4. Hier zeigt sich eine erhöhte Phosphorylierung aller 3 Enzyme schon 15min nach Stimulation mit Stressin. Für Akt und CREB ist in Abschnitt 5.3 bereits eine signifikante Aktivierung durch Stressin nachgewiesen worden. Dieser Nachweis muss für GSK3 β noch erbracht werden. Da auch eine direkte Aktivierung von CREB durch Akt beschrieben ist (Du et al. 1998), werden dies wahrscheinlich synergistische Signalwege sein, die gemeinsam zu einem antiinflammatorischen Effekt beitragen könnten. Wegweisend für einen Beweis dieses Modells wären auch Versuche mit Inhibitoren der einzelnen Enzyme dieses Signalwegs mit gleichzeitiger Überprüfung des antiinflammatorischen Effekts von Stressin.

Interessant hierzu erscheint die Tatsache, dass Lithium, eine Substanz, die zur Therapie der Amyotrophen Lateralsklerose eingesetzt wird, seinen neuroprotektiven Effekt über die Hemmung der Kinase GSK3 β bewirkt (Caldero et al. 2010). Dies unterstreicht die Hypothese, dass Stressin diesen Signalweg anspricht, da Stressin im spontanen Mausmodell der Amyotrophen Lateralsklerose das Überleben der Tiere beträchtlich verlängern kann (Abschnitt 1.1).

Widersprüchlich zu diesem Modell ist der beschriebene Effekt von Akt, über die Aktivierung der IKK Kinasen eine NF- κ B Stimulation auszuüben (Romashkova et al. 1999).

6.4 Human Phospho-Kinase Array – Cisplatin Ansatz

Die Ergebnisse aus Abschnitt 5.2 „Human Phospho-Kinase Array – Cisplatin Ansatz“ wurden noch nicht weiter untersucht und bedürfen einer näheren Abklärung, inwiefern diese Proteine eine Rolle im Wirkungsmechanismus von Stressin spielen könnten. Als wichtiger Punkt ist aber zu beachten, dass im Vergleich zum LPS-Ansatz die Wirksamkeit des Stressins in der Voruntersuchung wesentlich weniger ausgeprägt nachgewiesen wurde, sodass die Ergebnisse mit Vorbehalten betrachtet werden müssen.

Desweiteren sollte man bedenken, dass die erstellten Proben Auskunft über einen späten Zeitpunkt 24h nach Inkubation mit Stressin geben. Sie sind also nicht mit den frühen Ereignissen wie der nachgewiesenen Aktivierung von Akt und CREB nach 1h zu vergleichen und müssen gesondert betrachtet werden.

6.5 Zukunftsausblick

Das Peptid Stressin ist eine Substanz mit potentiell sehr erfolgversprechenden Anwendungsmöglichkeiten in der Therapie von Erkrankungen, deren Pathophysiologie auf vermehrtem Zelluntergang und Entzündung beruht. In Betracht zu ziehen ist beispielsweise die Therapie der Amyotrophen Lateralsklerose, oder eine Therapie nach Schlaganfall zur Rettung von Neuronen im Bereich des noch nicht geschädigten, aber vermindert perfundierten Gewebes der Penumbra an den Übergangszonen eines Schlaganfallgebietes.

Bis diese Perspektive zur Wirklichkeit werden kann, muss noch intensiv Forschung betrieben werden. Ein Schritt auf diesem Weg ist die vollständige Aufklärung des intrazellulären Wirkungsmechanismus von Stressin. Hierzu liefert diese Arbeit erste Ansatzpunkte mit der Identifizierung von Akt und CREB in der Signalkaskade des Stressins. Weiterhin unklar ist die Frage nach einem Zelloberflächenrezeptor, der durch Stressin angesprochen wird, und durch welchen die Aktivierung von Akt eingeleitet wird.

Da Stressin strukturelle Ähnlichkeit mit DNS aufweist (Abschnitt 1.1) besteht eine Hypothese, dass das Peptid über Toll-like Rezeptoren (TLR) an der Zelloberfläche

wirkt. Diese sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems und haben unter anderem Ribonukleinsäuren als Liganden. Sie erkennen sogenannte PAMP's (Pathogen Associated Molecular Patterns), Strukturen, die ausschließlich in oder auf Krankheitserregern vorkommen, und führen nach Kontakt zur Aktivierung des Immunsystems (Chang 2010).

Um dieser Hypothese nachzugehen, sollten Versuche mit MyD88 Knock-out Zellen durchgeführt werden. MyD88 ist ein Adaptermolekül der meisten TLR's. Zellen ohne dieses Molekül können nur eingeschränkt auf TLR-Bindung reagieren, weshalb auch hier eine Stressinwirkung unterbleiben müsste, wenn sich diese Hypothese bestätigen sollte.

7 Zusammenfassung

Stressin ist ein synthetisch hergestelltes Peptid, zusammengesetzt aus 7 Aminosäuren, das einen nachgewiesenen antiapoptotischen und anti-inflammatorischen Effekt aufweist. In in vivo Versuchen mit Mäusen konnte das Peptid eine autoimmune Neuroinflammation verhindern, sowie diese vor einer letalen Strahlendosis schützen. In einem spontanen Mausmodell der Amyotrophen Lateralsklerose konnte das Peptid das Überleben der Tiere beträchtlich verlängern.

Der intrazelluläre Wirkungsmechanismus von Stressin war bisher nicht bekannt. Diese Arbeit zeigt in in vitro Versuchen mit Humanen Fibroblasten eine signifikante Aktivierung der Kinase Akt und des Transkriptionsfaktors CREB 1h nach Stimulation mit Stressin. Für Akt sind in der Literatur viele zellprotektive Eigenschaften beschrieben, unter anderem auch über die direkte Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB. Dies führt zu einer vermehrten Expression der antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie. Die Bcl-2 Familie spielt eine wesentliche Rolle in der Regulation der intrinsischen Apoptose. Dies könnte ein entscheidender Mechanismus in der Wirkungsweise von Stressin darstellen.

Weitere interessante Ansatzpunkte zur Wirkungsweise bieten andere Ziele von Akt, wie die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren der Forkhead Familie und NF- κ B, sowie die Hemmung des proapoptotischen Mitgliedes der Bcl-2-Familie BAD.

Auch zur antiinflammatorischen Komponente des Stressins bietet die Stimulation von CREB ein Erklärungsmodell. CREB und der proinflammatorisch wirkende Transkriptionsfaktor NF- κ B konkurrieren bei der Transkription um das Adapterprotein CBP (CREB-binding Protein). Durch erhöhte Aktivität von CREB erfolgt die vermehrte Bindung von CBP. CBP steht im Zellkern nur in begrenztem Maße zur Verfügung, weshalb sich die Transkription proinflammatorischer Gene durch NF- κ B verringert.

Die Frage nach einem Zelloberflächenrezeptor, der durch Stressin angesprochen wird, und durch welchen die Aktivierung von Akt eingeleitet wird, bleibt noch unklar, wobei die Hypothese eines Toll-like Rezeptors als Bindungsstelle diskutiert wird.

8 Abkürzungsverzeichnis

A1 (Bfl-1)	Antiapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie
AFX	Transkriptionsfaktor der Forkhead-Familie
Apaf-1	<i>Apoptosis protease-activating factor 1</i>
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
APS	A monium p eroxodisulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
ATF1	<i>Activating transcription factor 1</i>
BAD	<i>Bcl-2-antagonist-of-cell-death</i>
Bad	Proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie
Bak	Proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie
Bax	Proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie
BCA	<i>Bicinchinonic acid</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-w (Bcl-2-L2)	Antiapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie
Bcl-XL	Antiapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie
BH	<i>Bcl-2 homology</i>
Bid	Proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie
Bik	Proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie
Bim	Proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie
BimL	Proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie
Bnip3	Proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie
Bok (Mtd)	Proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie
Boo (Diva)	Antiapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie
BSA	B ovines S erum a lbumin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
CBP	<i>CREB-binding-protein</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
c-IAP-1	Antiapoptotisches Gen
c-IAP-2	Antiapoptotisches Gen
Cis-DDP	Cis-D iammindichlorid p latin
CRE	<i>cAMP response element</i>

CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CREM	<i>cAMP response element modulator</i>
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modification of Eagle's medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERK1/2	<i>Extracellular-signal regulated kinase 1/2</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
Fas-L	Fas-Ligand
FCS	Fetales Kälberserum
FKHR	Transkriptionsfaktor der Forkhead-Familie
FKHRL1	Transkriptionsfaktor der Forkhead-Familie
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HF	Humane Fibroblasten
Hrk (DP5)	Proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IGFBP1	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 1</i>
IgG	Immunglobulin G
IKK α	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha</i>
IKK β	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta</i>
IL	Interleukin
LBP	<i>Lipopolysaccharide-binding protein</i>
LEF	<i>Lymphoid enhancer-binding factor</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukaemia 1</i>
MD-2	<i>Myeloid differentiation factor 2</i>
mTor	<i>Mammalian target of rapamycin</i>

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NaCl	N atrium c hlorid
NaF	N atrium f luorid
NF- κ B	<i>nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
Noxa	Proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie
Nr-13	Antiapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie
PAGE	P oly a crylamid- G eleelektrophorese
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDK-1	<i>Phosphoinoside-dependent kinase-1</i>
PH-Domäne	<i>Pleckstrin homology-Domäne</i>
PI-3K	P hosphoinositol- 3 K inase
PIP2	P hosphatidylinositoldi p hosphat
PIP3	P hosphatidylinositoltri s phosphat
PKA	P roteinkinase A
PKB	P roteinkinase B
PMSF	P henyl m ethylsulfon f luorid
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
S	S erin
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannt
Src	S arcoma
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS/T	<i>Tris Buffered Saline / Tween</i>
TCF	<i>Transcriptionfactor</i>
Temed	N,N,N,N'- T etramethylethylendi a min
Thr	T hreonin
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
TMB	T etramethyl b enzidin
TNF α	T umornekrosefaktor α

TNF-R	Tumornekrosefaktor α - Rezeptor
TRAIL-R	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor</i>
Tyr	Tyrosin
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
Wnt	Zusammensetzung aus Wg (wingless) und Int1 (Intergation1)
Yes	Yamaguchi sarcoma

9 Literaturverzeichnis

Adams J. M., Cory S., (2001), "Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family", Trends Biochem Sci. 26 (1): 61-6.

Aktories K., Unger C., (2005), "Platinverbindungen" in "Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie", Aktoris K., Hofmann F. B., Förstermann U., Starke K., Elsevier, Urban & Fischer, München, 9. Auflage, pp 933-935.

Alderden R. A., Hall M. D., Hambly T. W., (2006), "The discovery and development of Cisplatin", J Chem Educ. 83 (5): 728.

Ali A., Hoeflich K. P., Woodgett J. R., (2001), "Glykogen synthase kinase-3: properties, function, and regulation.", Chem Rev. 101 (8): 2527-40.

Arias J., Alberts A. S., Brindle P., Claret F. X., Smeal T., Karin M., Feramisco J., Montminy M., (1994) "Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor", Nature. 370 (6486): 226-9.

Ashkenazi A., Dixit V. M., (1998), "Death receptors: signaling and modulation", Science. 281 (5381): 1305-8.

Baker S. J., Reddy E. P., (1998), "Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily", Oncogene. 17 (25): 3261-70.

Baldwin A. S., (2001), "Control of oncogenesis and cancer therapie resistance by the transcription factor NF-kappaB", J Clin Invest. 107 (3): 241-6.

Biggs W. H., Meisenhelder J., Hunter T., Cavaneer W. K., Arden K. C., (1999), "Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1", Proc Natl Acad Sci USA. 96 (13): 7421-6.

Brazil D. P., Hemmings B. A., (2001), "Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow", Trends Biochem Sci. 26: 657-64.

Breckenridge D. G., Germain M., Mathai J. P., Nguyen M., Shore G. C., (2003), "Regulation of apoptosis by endoplasmatic reticulum pathways", *Oncogene*. 22 (53): 8608-18.

Broughton B. R. S., Reutens D. C., Sobey C. G., (2009), "Apoptotic Mechanisms After Cerebral Ischemia", *Stroke*. 40: 331-9.

Brunet A., Bonni A., Zigmond M. J., Lin M. Z., Juo P., Hu L. S., Anderson M. J., Arden K. C., Blenis J., Greenberg M. E., (1999), "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor", *Cell*. 96 (6): 857-68.

Caldero J., Brunet N., Tarabal O., Piedrafita L., Hereu M., Ayala V., Esquerda J. E., (2010), "Lithium prevents excitotoxic cell death of motoneurons in organotypic slice cultures of spinal cord", *Neuroscience*. 165 (4): 1353-69.

Cantley L. C., Neel B. G., (1999), "New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway", *Proc Natl Acad Sci USA*. 96 (8): 4240-5.

Cardone M. H., Roy N., Stennicke H. R., Salvesen G. S., Franke T. F., Stanbridge E., Frisch S., Reed J. C., (1998), "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation", *Science*. 282 (5392): 1318-21.

Carlezon W. A., Duman R. S., Nestler E. J., (2005), "The many faces of CREB", *Trends Neurosci*. 28 (8): 436-45.

Chang Z. L., (2010), "Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways", *Inflamm Res*. 59 (10): 791-808.

Chrivia J. C., Kwok R. P., Lamb N., Hagiwara M., Montminy M. R., Goodman R. H., (1993), "Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP", *Nature*. 365 (6449): 855-9.

Cross D. A., Alessi D. R., Cohen P., Andjelkovich M., Hemmings B. A., (1995), "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B", *Nature*. 378 (6559): 7855-9.

Datta S. R., Brunet A., Greenberg M. E., (1999), "Cellular survival: a play in three Akts", *Genes Dev*. 13: 2905-27.

Datta S. R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg M. E., (1997), "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery", *Cell*. 91 (2): 231-41.

Davies M. S.; Berners-Price S. J., Hambley T. W., (2000), "Slowing of cisplatin aquation in the presence of DNA but not in the presence of phosphate: improved understanding of sequence selectivity and the roles of mono-aquated and diaquated species in the binding of cisplatin to DNA", *Inorg Chem*. 39 (25): 5603-13.

Degtarev A., Boyce M., Yuan J., (2003), "A decade of caspases", *Oncogene*. 22 (53): 8543-67.

del Peso L., González-García M, Page C., Herrera R., Nunez G., (1997), "Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt", *Science*. 278 (5338): 687-9.

Dijkers P. F., Medema R. H., Lammers J. W., Koenderman L., Coffey P. J., (2000), "Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1", *Curr Biol*. 10 (19): 1201-4.

Don J., Stelzer G., (2002), "The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis", *Mol Cell Endocrinol*. 187 (1-2): 115-24.

Doucas H., Garcea G., Neal C. P., Manson M. M., Berry D. P., (2005), "Changes in the Wnt signaling pathway in gastrointestinal cancers and their prognostic significance", *Eur J Cancer*. 41 (3): 365-79.

Du K., Montminy M., (1998), "CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB", *J Biol Chem.* 273 (49): 32377-9.

Eastmen A., (1999), "The Mechanism of Action of Cisplatin: from Adducts to Apoptosis" in "Cisplatin, Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug" Bernhard Lippert (Ed.), *Verl. Helvetica Chimica Acta, Zürich*, pp 111-134.

Finkbeiner S., Tavazoie S. F., Maloratsky A., Jacobs K. M., Harris K. M., Greenberg M. E., (1997), "CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses", *Neuron.* 19 (5): 1031-47.

Forde J. E., Dale T. C., (2007), "Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate", *Cell Mol Life Sci.* 64 (15): 1930-44.

Galanos C., Freudenberg M., Kataschinski T., Salomao R., Mossmann H., Kumazawa Y., (1992), "Tumor necrosis factor and host response to endotoxin" in "Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides: Vol. II Immunopharmacology and Pathophysiology", Morrison, D. C., Ryan, J. L., (Eds.) , *CRC Press, USA*, pp.75-102.

Garofalo R. S., Orena S. J., Rafidi K., Torchia A. J., Stock J. L., Hildenbrandt A. L., Coskran T., Black S. C., Brees D. J., Wicks J. R., McNeish J. D., Coleman K. G., (2003), "Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt/PKB β ", *J Clin Invest.* 112 (2): 197-208.

Ghosh S., May M. J., Kopp E. B., (1998), "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses", *Annu Rev Immunol.* 16: 225-60.

Gonzalez G. A., Montminy M. R., (1989), "Cyclic AMP stimulates gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133", *Cell.* 59 (4): 675-80.

Green D. R., Kroemer G., (2004), "The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death", *Science* 305 (5684): 626-629.

- Guha M., Mackman N., (2002), "The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells", *J Biol Chem.* 277 (35): 32124-32.
- Häcker H., Karin M., (2006), "Regulation and function of IKK and IKK-related kinases", *Sci STKE.* 2006 (375): re13.
- Hai T., Curran T., (1991), "Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity", *Proc Natl Acad Sci USA.* 88 (9): 3720-24.
- Hajduch E., Litherland G. J., Hundal H. S., (2001), "Protein kinase B (PKB/Akt) – a key regulator of glucose transport?", *FEBS Lett.* 492 (3): 199-203.
- Hale A. J., Smith C. A., Sutherland L. C., Stoneman V. E., Longthorne V. L., Culhane A. C., Williams G. T., (1996) "Apoptosis: molecular regulation of cell death", *Eur J Biochem.* 236 (1): 1-26.
- Herbst A., Kolligs F. T., (2007), "Wnt signaling as a therapeutic target for cancer", *Methods Mol Biol.* 361: 63-91.
- Hu X., Paik P. K., Chen J., Yarilina A., Kockeritz L., Lu T. T., Woodgett J. R., Ivashkiv L. B., (2006), "IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins", *Immunity.* 24 (5): 563-74.
- Huang E. J., Reichardt L. F., (2001), "Neurotrophins: roles in neuronal development and function" *Annu Rev Neurosci.* 24: 677-736.
- Jamieson E. R., Lippard S. J., (1999), "Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts", *Chem Rev.* 99 (9): 2467–98.
- Jin Z., El-Deiry W. S., (2005), "Overview of cell death signaling pathways", *Cancer Biol Ther.* 4 (2): 139-63.
- Kartalou M., Essigmann J. M., (2001), "Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins", *Mutat Res.* 478, 1-21.

Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R., (1972), "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics", *Br J Cancer*. 26 (4): 239-57.

Kidd V. J., Lahti J. M., Teitz T., (2000), "Proteolytic regulation of apoptosis", *Semin Cell Dev Biol*. 11 (3): 191-201.

Kim Y., Seol D. W., (2003), "TRAIL, a mighty apoptosis inducer", *Mol Cells*. 15 (3): 283-93.

Kischkel F. C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P. H., Peter M. E., (1995), "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins from a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor", *Embo J*. 14 (22): 5579-88.

Kluck R. M., Bossy-Wetzell E., Green D. R., Newmeyer D. D., (1997), "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis", *Science*. 275 (5303): 1132-6.

Kops G. J. P. L., Burgering B. M. T., (2000), "Forkhead transcription factors are targets of signaling by the proto-oncogene PKB (c-Akt)", *J Anat*. 197 (4): 571-574.

Laemmli U. K., (1970), "Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*. 227 (5259): 680-5.

Lameh J., Cone R. I., Maeda S., Philip M., Corbani M., Nádasdi L., Ramachandran J., Smith G. M., Sadée W., (1990), "Structure and function of G protein coupled receptors", *Pharm Res*. 7 (12): 1213-21.

Lee H. C., Kim M., Wands J. R., (2006), "Wnt/Frizzled signaling in hepatocellular carcinoma", *Front Biosci*. 11: 1901-15.

Lee K. A., Masson N., (1993), "Transcriptional regulation by CREB and its relatives", *Biochim Biophys Acta*. 1174 (3): 221-33.

Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S. M., Ahmad M., Alnemri E. S., Wang X., (1997), "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade" *Cell*. 91 (4): 479-89.

Lonze B. E., Riccio A., Cohen S., Ginty D. D., (2002), "Apoptosis, axonal growth defects, and degradation of peripheral neurons in mice lacking CREB", *Neuron*. 34 (3): 371-85.

Lucken-Ardjomande S., Montessuit S., Martinou J. C., (2005), "Changes in the outer mitochondrial membranes during apoptosis", *J Soc Biol*. 199 (3): 207-10.

Martin M., Rehani K., Jope R. S., Michalek S. M., (2005), "Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3", *Nat. Immunol*. 6 (8): 777-84.

Mayr B., Montminy A., (2001), "Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB", *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2 (8): 599-609.

Mosmann T., (1983), "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *J Immunol Methods*. 65 (1-2): 55-63.

Muthusamy N., Leiden J. M., (1998), "A protein kinase C-, Ras-, and RSK2-dependent signal transduction pathway activates the cAMP-responsive element-binding protein transcription factor following T cell receptor engagement", *J Biol Chem*. 273 (35): 22841-7.

Nagata S., (1999), "Fas ligand-induced apoptosis", *Annu Rev Genet*. 33: 29-55.

Navé B. T., Ouwens M., Withers D. J., Alessi D. R., Shepherd P. R., (1999), "Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation", *Biochem J*. 344 (2): 427-31.

Nicholson K. M., Anderson N. G., (2002), "The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy", *Cell Signal*. 14 (5): 381-95.

Nogare D., (1991), "Southwestern Internal Medicine Conference: septic shock" *Am J Med Sci.* 302: 50-65.

Opal S. M., (2010), "Endotoxins and other sepsis triggers", *Contrib Nephrol.* 167: 14–24.

Osaki M., Oshimura M., Ito H., (2004), "PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer", *Apoptosis.* 9:667-76.

Pfeiffer R., (1892), "Untersuchungen über das Cholera Gift", *Z. Hyg.* 11: 393-412.

Pugazhenthil S., Nesterova A., Sable C., Heidenreich K. A., Boxer L. M., Heasley L. E., Reusch J. E., (2000), "Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through camp-response element-binding protein", *J Biol Chem.* 275 (15): 10761-6.

Reed J. C., (1998), "Bcl-2 family proteins", *Oncogene.* 17 (25): 3225-36.

Reed J. C., (2000), "Mechanisms of apoptosis", *Am J Pathol.* 157 (5): 1415-30.

Rena G., Guo S., Chichy S. C., Unterman T. G., Cohen P., (1999), "Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B", *J Biol Chem.* 274 (24): 17179-83.

Rietschel E. T., Brade H., (1992), "Bacterial Endotoxins", *Sci Am.* 267 (2): 54-61.

Romashkova J. A., Makarov S. S., (1999), "NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signaling", *Nature.* 401 (6748): 86-90.

Rosenberg B., van Camp L., Krigas T., (1965), "Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode" *Nature.* 205: 698.

Rosenberg B., van Camp L., Trosko J. E., Mansour V. H., (1969), "Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumor Agents", *Nature.* 222 (5191): 385–7.

Sathasivam S., Shaw P. J., (2005), "Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis – what is the evidence?", *The Lancet Neurology* 4 (8): 500-9.

Schletter J., Heine H., Ulmer A. J., Rietschel E. T., (1995), "Molecular mechanisms of endotoxin activity" *Arch. Microbiol.* 164 (6): 383-9.

Schumann R. R., Leong S. R., Flaggs G. W., Gray P. W., Wright S. D., Mathison J. C., Tobias P. S., Ulevitch R. J., (1990), "Structure and function of lipopolysaccharide binding protein", *Science.* 249 (4975): 1429-31.

Thorburn A., (2004), "Death receptor-induced cell killing", *Cell Signal.* 16 (2):139-44.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J., (1979), "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications", *Proc Natl Acad Sci USA.* 76 (9): 4350-4.

Trimmer E. E., Essigmann J. M., (1999), "Cisplatin", *Essays Biochem.* 34: 191-211.

Vaux D. L., Korsmeyer S. J., (1999), "Cell death in development", *Cell.* 96 (2): 245-54.

Wang J. M., Chao J. R., Chen W., Kuo M. L., Yen J. J., Yang-Yen H. F., (1999), "The antiapoptotic gene *mcl-1* is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB", *Mol Cell Biol.* 19 (9): 6195-206.

Welsh G. I., Wilson C., Proud C. G., (1996), "GSK3: a SHAGGY frog story", *Trends Cell Biol.* 6 (7): 274-9.

Williams G. T., Smith C. A., (1993), "Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death", *Cell.* 74 (5): 777-9.

Woodgett J. R., (1990), "Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A", *EMBO J.* 9 (8): 2431-8.

Woodgett J. R., (2001), "Judging a Protein by More Than Its Name: GSK-3", *Sci STKE.* (100): re12.

Wright S. D., Ramos R. A., Tobias P. S., Ulevitch R. J., Mathison J. C., (1990), "CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein", *Science*. 249 (4975): 1431-3.

Wu X., Deng Y., (2002), "Bax and BH3-domain-only proteins in p53-mediated apoptosis", *Front Biosci*. 7: d151-6.

Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C. N., Ibrado A. M., Cai J., Peng T. I., Jones D. P., Wang X., (1997), "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked", *Science*. 275 (5303): 1129-32.

Yang Z. Z., Tschopp O., Baudry A., Dümmler B., Hynx D., Hemmings B. A., (2004), "Physiological functions of protein kinase B/Akt", *Biochem Soc Trans*. 32 (Pt2): 350-4.

Yardy G. W., Brewster S. F., (2005), "Wnt signaling and prostate cancer", *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 8 (2): 119-26.

Zimmermann K. C., Bonzon C., Green D. R., (2001), "The machinery of programmed cell death", *Pharmacol Ther*. 92 (1): 57-70.

Zimmermann S., Moelling K., (1999), "Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B)", *Science*. 286 (5445): 1741-4.

10 Danksagung

Zunächst einmal bedanke ich mich für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg „Entzündung und Regeneration“ des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, welches mir das Anfertigen dieser Doktorarbeit erst ermöglicht hat.

PD Dr. Johannes Herkel danke ich für die gesamte Betreuung während der Arbeit im Labor und während des Schreibens dieser Dissertation.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern im Labor der AG Lohse, die mich in den einzelnen Verfahren unterwiesen und mir bei jeglichen Problemen Hilfestellung geleistet haben.

Meiner Mutter und meiner Schwester danke ich für ihre Hilfe während des gesamten Studiums und meiner Mutter besonders für das sicherlich aufwendige Korrekturlesen.

Maik danke ich für ihre Fürsorge und Unterstützung während dieser auch anstrengenden Zeit, sowie für ihren Antrieb die Dissertation fertig zu stellen.

Zuletzt - aber entscheidend - danke ich meinem Vater, der überhaupt den Grund meiner Berufswahl darstellt.

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: