

**Tumorsuppressorprotein p53 und Expression von
Regulatorproteinen des Zellzyklus in humanen
Karzinomzellkulturen**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt dem

**Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg**

von

**Dipl.-Biol. Simone Aversch-Fellerhoff
aus Hamburg**

1. Gutachter: Prof. Dr. Fritz Hölzel (FB 04)
2. Gutachter: Prof. Dr. Udo Wienand (FB 14)

Disputation am 20.02.2004

Inhaltsverzeichnis	I –II
Liste der verwendeten Abkürzungen	III-IV
1 Einleitung	1
1.1 Fragestellung	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Zellkultur	16
2.1.1 Tumorzelllinien	16
2.1.2 Zellkultivierung und Kryokonservierung	17
2.1.3 Medien und Lösungen zur Zellkultivierung	17
2.1.4 Wachstumsversuche und Hormonbehandlung	18
2.2 Extraktion zellulärer Proteine	19
2.3 Gel-elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	21
2.4 Western-Blot Analysen	24
2.5 Immunoblotting	26
2.6 Immundetektion	27
2.7 Immunfluoreszenz an kultivierten Zellen	28
2.8 Apoptose-Nachweis mittels Fluoreszenz-Detektion von digoxigeninmarkierter genomischer DNA	30
2.9 DNA-Sequenzierung	31
3 Ergebnisse	40
3.1 Wachstum von Prostatakarzinomzellen	40
3.1.1 Wachstum nach Kultivation mit DHT oder CPA	40
3.1.2 Wachstum nach Behandlung mit CAS	43
3.1.3 Morphologie von LNCaP Zellen nach Variation der Wachstumsbedingungen	45
3.1.4 Konkurrenzexperimente	47

3.1.5	Wachstumskinetik	49
3.2	Analysen von p53	52
3.2.1	Immunzytochemie	52
3.2.2	Western-Blot Analysen	53
3.2.2.1	p53 Gehalt nach Entzug von Wachstumsfaktoren	53
3.2.2.2	p53 Gehalt nach Behandlung mit DHT, CPA oder CAS	56
3.3	Wachstum von MFM-223 Mammakarzinomzellen	60
3.4	p53 in MFM-223 Zellen	64
3.5	Sequenzanalysen des p53 Gens bei MFM-223 Zellen	68
3.6	Expression von p53-regulierten Proteinen	69
3.6.1	MDM2	69
3.6.2	p21 (WAF-1)	76
3.7	Apoptose	83
3.7.1	Immunzytochemie	83
3.7.2	Apoptose assoziierte Proteine	89
3.7.2.1	BAX	89
3.7.2.2	BCL-2	94
3.7.2.3	Caspase 8	98
4	Diskussion	102
4.1	p53 Status und Regulation der nachgeschalteten Proteine p21 und MDM2	102
4.2	Beeinflussung des Zellwachstums durch DHT oder durch Antiandrogene sowie Regulation von p53, p21 und MDM2 Protein	112
4.3	Apoptose und Expression der Apoptose relevanten Proteine BAX, BCL-2 und Caspase 8	115
5	Zusammenfassung	120
6	Literaturverzeichnis	124
7	Danksagung	135

Liste der verwendeten Abkürzungen

Apaf-1	"apoptotic protease-activating factor-1"
ARF	"alternative reading frame"
bp	Basenpaare (engl. "base pair")
BSA	Rinderserumalbumin (engl. "bovine serum albumin")
CAS	Casodex ; Bicalutamid
CDK	Zyclin-abhängige Kinase (engl. "cyclin-dependent kinase")
CPA	Cyproteronazetat
DHT	5 α - Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig
E ₂	(2; 17 β) Estradiol
EDTA	Ethylendiamintetra-Azetat
FADD	"fas-associated death domain"
FAS-L	"fas ligand"
FCS	Fetales Kälberserum (engl. "fetal calf serum")
GADD-45	"growth arrest and damage dependent-45"
HRP	"horseraddish peroxidase"
ICE	"interleukin-1 β -converting enzyme"
IAPS	"inhibitor of apoptosis proteins"
INK	"inhibitor of cyclin-dependent kinase"
IgG	Immunglobulin G
kD	Kilodalton
MDM-2	"murine double minute-2"
mt	mutiert
NMR	Kernmagnetische Resonanz (engl. "nuclear magnetic resonance")
PAA	Polyacrylamid
PBS	"phosphate-buffered saline"
PCNA	"proliferating cell nuclear antigen"
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RAS	"rat sarcoma"
RB	Retinoblastom

rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. "rounds per minute")
SD	Standardabweichung (engl. "standard deviation")
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. "sodium-dodecyl sulfate")
TBS-T	"tris-buffered saline"-Tween-20
TNF	Tumornekrose-Faktor
TCA	Trichloressigsäure (engl. "trichloroacetic acid")
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamine
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp (engl. "wild type")
W/V	Gewicht pro Volumen (engl. "weight per volume")
Zz	Zellzahl

Genetischer Code und Abkürzung der Aminosäuren.

		Second Position									
		U	C	A	G						
First Position (5' end)	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } Ser UCC } UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Stop UAG } Stop	UGU } Cys UGC } UGA } Stop UGG } Trp	U C A G	A Ala	R Arg	N Asn	D Asp	C Cys
	C	CUU } Leu CUC } CUA } CUG }	CCU } Pro CCC } CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } Arg CGC } CGA } CGG }	U C A G	Q Gln	E Glu	G Gly	H His	I Ile
	A	AUU } Ile AUC } AUA } Met AUG }	ACU } Thr ACC } ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G	L Leu	K Lys	M Met	F Phe	P Pro
	G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } Ala GCC } GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } Gly GGC } GGA } GGG }	U C A G	S Ser	T Thr	W Trp	Y Tyr	V Val

1 Einleitung

In der männlichen zentraleuropäischen Bevölkerung mit Karzinomerkrankungen ist die maligne Prostata-Neoplasie die dritthäufigste Todesursache mit steigender Tendenz (Levi et al., 1999). Das Prostatakarzinom wird mit zunehmendem Alter häufiger diagnostiziert (Oesterling et al., 1997). Daher gewinnt bei durchschnittlicher Steigerung der Lebenserwartung die Erforschung dieser Erkrankung an Bedeutung.

Die Beteiligung genetischer Aberrationen an der malignen Entartung von Zellen wurde schon zu Beginn dieses Jahrhunderts vermutet (Boveri, 1914). Tumoren zeichnen sich durch weitgehend ungebremste Proliferation von relativ dedifferenzierten Zellen aus (Gericke, 1978; Prescott and Flexer, 1990; Preston-Martin et al., 1990). Somit kann die maligne Entartung von Zellen mit Störungen der Regulation von Zelldifferenzierung und zellzyklusgesteuerter Proliferation in Verbindung gebracht werden. Mit Hilfe von molekularbiologischen und gentechnologischen Methoden wurden zwei unterschiedliche Typen regulatorischer Gene identifiziert, die maßgeblich an Tumorentstehung und Progression der Tumorentwicklung beteiligt sind (Bishop, 1987; Duesberg and Vogt, 1970; Weiss et al., 1977; Stanbridge, 1990). Es handelt sich zum einen um sogenannte Proto-Onkogene, deren Umwandlung in Onkogene durch Mutation, Amplifikation oder chromosomale Aberration zur verstärkten Proliferation und zur gestörten Differenzierung der Zelle führt. Zum anderen handelt es sich um sogenannte Tumorsuppressorgene, deren Inaktivierung oder Verlust ihre negativ regulierende Wirkungen aufhebt (Knudson, 1971).

Das Wachstum von normalen Zellen und von Tumorzellen ist an den geregelten Ablauf des Zellzyklus und an komplexe genetische und biochemische Kontrollmechanismen gebunden. Sie müssen sicherstellen, daß jede Phase des Zellzyklus korrekt und vollständig durchlaufen wird, bevor der Übergang in die nächste Phase eingeleitet wird. Entscheidende Kontrollpunkte (**Abb. 1**) des Zellzyklus liegen vor dem G1/S-Phasenübergang und bei höheren Eukaryonten vor dem G2/M Übergang (Cordon-Cardo, 1995; Grana and Reddy, 1995).

Eine bedeutende regulative Funktion innerhalb des normalen Zellzyklus erfüllt u.a. das Produkt des Tumorsuppressorgens p53 (Levine et al., 1991; Levine, 1997). Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 werden häufig in Tumoren nachgewiesen (Hollstein et al., 1991; Harris, 1993). Nahezu 50 % der menschlichen Tumoren vom Karzinomtyp weisen p53 Veränderungen auf (Selivanova and Wiman, 1995). Unter diesen Aberrationen finden sich Deletionen beider p53 Allele, die zum vollständigen Verlust der p53 Expression führen. Wesentlich häufiger werden jedoch Deletionen eines p53 Allels und Missense

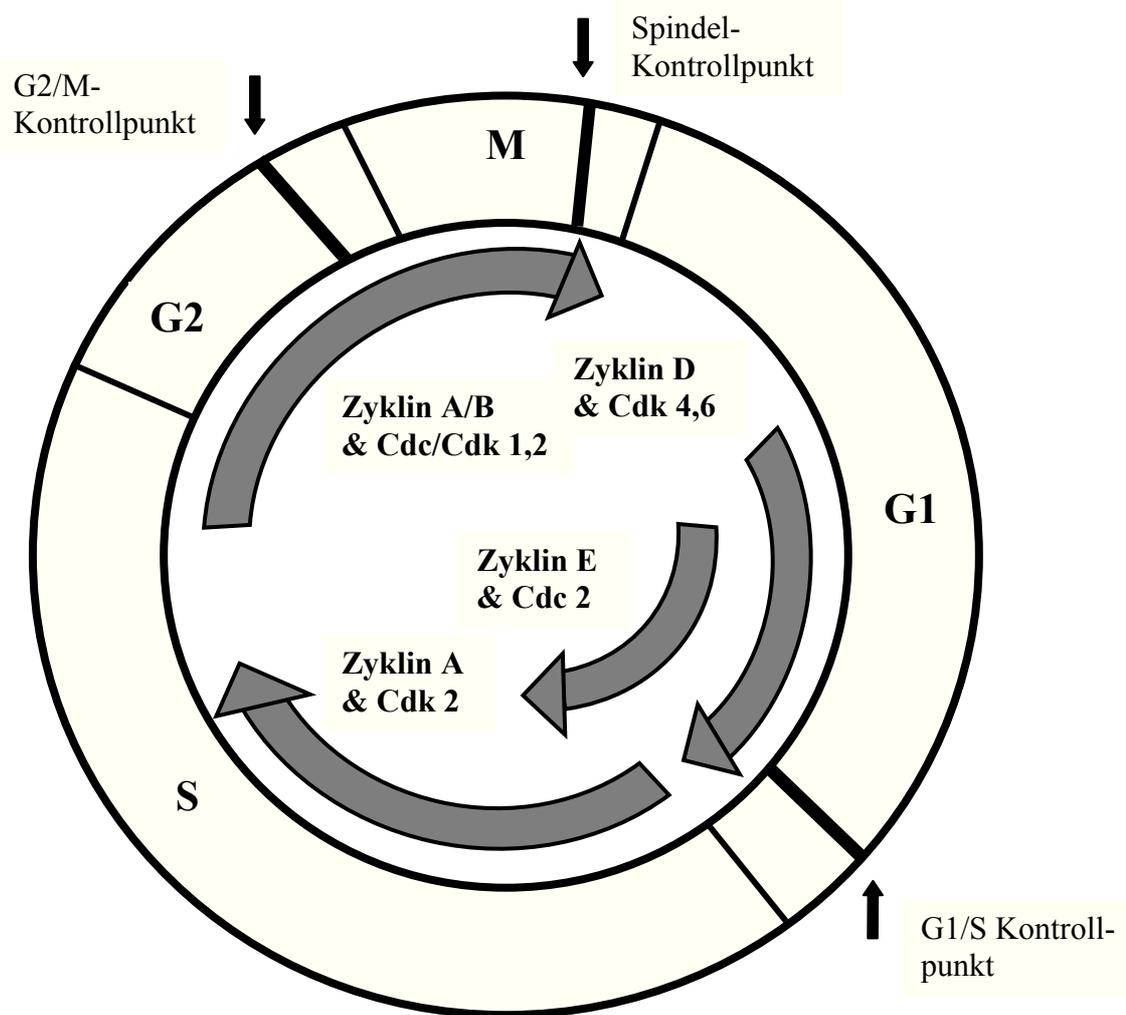


Abb. 1. Zellzyklus und Zykline

Mutationen im verbleibenden p53 Allel nachgewiesen, die zu einem verminderten Abbau des veränderten Proteins und damit zur dauerhaft erhöhten Anwesenheit in den betroffenen Zellen führen. Eine Besonderheit sind dominant-negative Mutationen des p53 Tumorsuppressorgens. Diese Mutationen in einem Allel des p53 Gens verursachen eine Konformationsänderung des Proteins, die das Wildtyp (wt)-p53 des verbleibenden Allels in seiner Funktion als tetrameres Protein stören. In der Regel sind Mutationen in einem Allel von Tumorsuppressorgenen rezessiv, wie z.B im Retinoblastom-Gen. Die molekulare Grundlage bei ca. 2/3 der Patientinnen mit familiärem Li-Fraumeni-Syndrom ist eine Keimbahnmutation in einem Allel des p53 Gens (Malkin et al., 1990). Das verbleibende Allel kann durch sporadische Mutation verändert werden. Dies führt zum vollständigen Verlust von funktionsfähigem p53 in der Zelle. In diesen Familien findet sich eine Disposition für verschiedene Tumore wie Weichteil- und Knochensarkome, Brustkrebs,

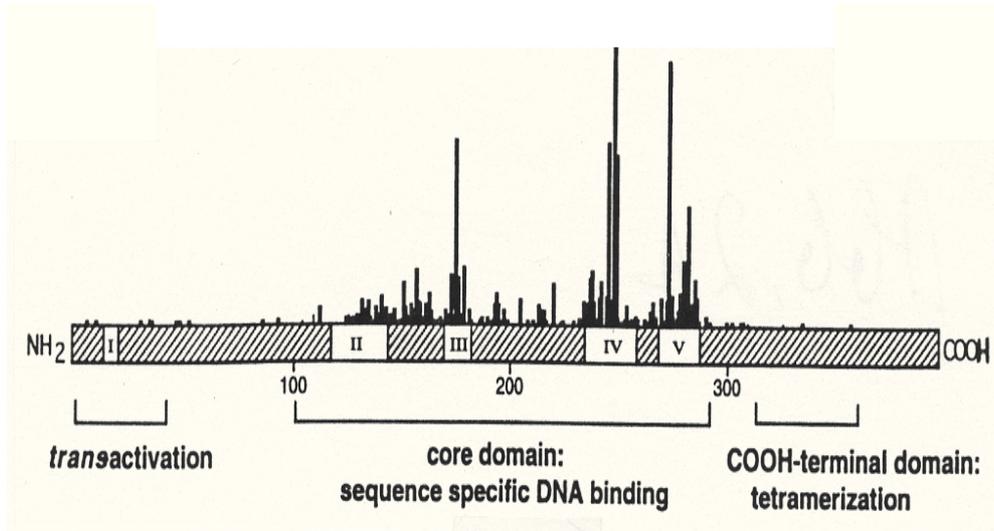
Hirntumore und Tumore der Nebennierenrinde (Malkin et al., 1990; Li, 1991). Im Gegensatz zum wt-p53, welches in der Zelle mit einer Halbwertszeit von 20 Minuten relativ schnell abgebaut wird, sind durch Mutationen entstandene Varianten des Proteins stabiler und akkumulieren im Zellkern (Levine, 1997). Das mutierte Protein ist damit immunhistologisch nachweisbar.

Das Tumorsuppressorgen p53 liegt auf Chromosom 17p13.1. Der kodierende Bereich umfasst 10 Exons. Das Genprodukt setzt sich aus 393 Aminosäuren zusammen und hat ein relatives Molekulargewicht von 53 kD (Berchuck and Bast, 1993). Vier hochkonservierte Regionen des p53 Gens sind häufig von Mutationen betroffen (**Abb. 2 A u. B**). Diese Regionen liegen innerhalb der Aminosäurepositionen 117-142, 171-181, 234-258 und 270-286, entsprechend den Exons 5-8 des p53 Gens. Dieser Bereich kodiert die sogenannte "Core Domäne", die wesentlich für die spezifische DNA-Bindung des Proteins verantwortlich ist. In der humanen DNA wurde ein p53 Konsensus-Bindungsbereich identifiziert, bestehend aus 2 Kopien von 10 Basenpaarelementen 5'-PuPuPu C (A/T) (A/T) G PyPyPy-3', die durch etwa 13 Basenpaare getrennt sind (El-Deiry et al., 1992). Zu den am häufigsten durch Mutation betroffenen Aminosäuren der p53 "Core Domäne" zählen die Arginine #175, #248, #273 und Glycin #245. Diese Aminosäuren sind direkt an der DNA-Bindung beteiligt (Cho et al., 1994). Infolge der Mutationen kann das veränderte p53 die Transkription seiner Target Gene (z.B. p21, MDM2 und BAX) nicht mehr beeinflussen. Dies führt zum Verlust der regulativen Funktion für die genannten Proteine. Die aminoterminal Domäne des Proteins erfüllt eine transaktivierende Funktion ähnlich der von Transkriptionsfaktoren. C-terminal befindet sich die sogenannte Oligomerisierungsdomäne (Shaulian et al., 1992; Pavletich et al., 1993). Analysen der dreidimensionalen Struktur der C-terminalen Region von p53 mit Hilfe der kernmagnetischen Resonanz-Spektroskopie (NMR) zeigten, daß p53 Tetramere bildet und als Tetramer an die DNA bindet (Cho et al., 1994).

Innerhalb des normalen Zellzyklus erfüllt p53 wichtige regulative Funktionen (Kastan, 1997; Levine, 1997):

- Aktivierung zellzyklussteuernder Gene (z.B. p21, GADD-45, MDM2) oder Repression von wachstumsregulierenden Genen (z.B. c-FOS, c-JUN, c-MYC, IL-6, RB),
- Beteiligung an der Induktion von Apoptose (programmierter Zelltod) durch Aktivierung der Gene BAX und FAS.

A



B

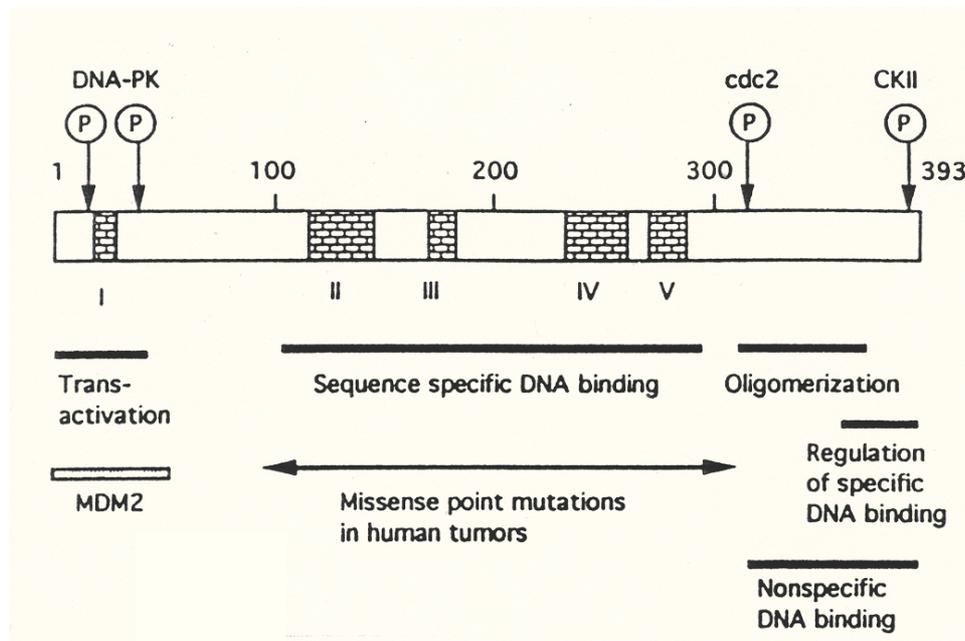


Abb. 2. Struktur des humanen p53. **(A)** Hochkonservierte Regionen I-V und Frequenz der durch Mutation häufig veränderten Aminosäuren (senkrechte Balken; nach Cho et al., 1994). **(B)** Lokalisation von Phosphorylierungs- und Bindungsstellen für Regulatorproteine und DNA-Phosphokinasen (DNA-PK), nach Selivanova and Wiman, 1995.

- Suppression des Tumorwachstums (durch Mutation und Inaktivierung des p53 Gens geht diese Funktion verloren),
- Initiation der DNA-Reparatur als Reaktion auf genomische Schäden (z.B. durch UV-Strahlung).

In normalen Zellen ist p53 aufgrund seiner geringen Halbwertszeit nicht nachweisbar. In Stress-Situationen, z.B. nach DNA-Schädigung oder bei Hypoxie, kommt es zur Akkumulation des wt-Proteins im Zellkern. Dies ist auf eine verlängerte Halbwertszeit des Proteins zurückzuführen (Selivanova and Wiman, 1995). Weiterhin kommt es in gestressten Zellen zur verstärkten Translation der p53 mRNA (Levine, 1997). Die Akkumulation von wt-p53 ermöglicht eine Arretierung in der G1-Phase des Zellzyklus und die Einleitung der DNA-Reparatur (Levine et al., 1991; Prives, 1993; Deppert, 1994). Neben einer G1-Arretierung der Zelle kann durch p53 auch Apoptose induziert werden (Oren, 1992; Levine, 1997). Die Transkription von BAX, einem zur BCL-2 Familie gehörendem Gen, wird durch p53 induziert. Das BAX Protein eröffnet den Zugang in die Apoptose (Reed, 1997).

Im Zusammenhang mit p53 wird eine wichtige regulative Funktion innerhalb des Zellzyklus durch das Genprodukt von p21 (WAF1 "wt-p53-activated fragment 1", CIP-1, SDI-1) erfüllt. Ein Transkriptionsfaktor des p21 Gens ist u.a. p53 (Cordon Cardo, 1995). p21 ist ein zellzyklusabhängiger Kinase-Inhibitor (**Abb. 3**). Das p21 Protein inaktiviert, die während der G1-Phase aktiven Zyklin/Kinase-Komplexe, durch erweiterte Komplex-Anlagerung. Hierzu zählen die Zyklin/Kinase-Komplexe: Zyklin D/Cdk4/6, Zyklin E/Cdc2 und Zyklin A/Cdk2 (Levine, 1997; **vergl. Abb. 1, S. 2**). Ebenso wurde nachgewiesen, daß p21 die Aktivität von Zyklin B/Kinase Cdc2 Komplexen der G2-Phase inhibiert (Yamato et al., 1995). Wenn die Zyklin-Kinase-Komplexe durch p21 nicht inaktiviert sind, phosphorylieren und inaktivieren sie andere Regulatorproteine, z.B. das Genprodukt des negativ regulierenden Retinoblastoma-Gens. Auf diese Weise wird jeweils der Übergang in eine neue Zellzyklusphase eingeleitet.

In Stress-Situationen wird die Expression von p21 bei normalen Zellen u.a. durch p53 induziert (Cordon-Cardo, 1995). Es bindet und inaktiviert daraufhin die Zyklin-Kinase-Komplexe am Übergang von der G1- in die S-Phase und am Übergang von der G2- in die M-Phase des Zellzyklus. Durch die Bindung von p21 an die Zyklin-Kinase Komplexe wird die G1-Arretierung induziert (**Abb. 3**), und damit das Fortschreiten des Zellzyklus in die S-Phase blockiert (Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993).

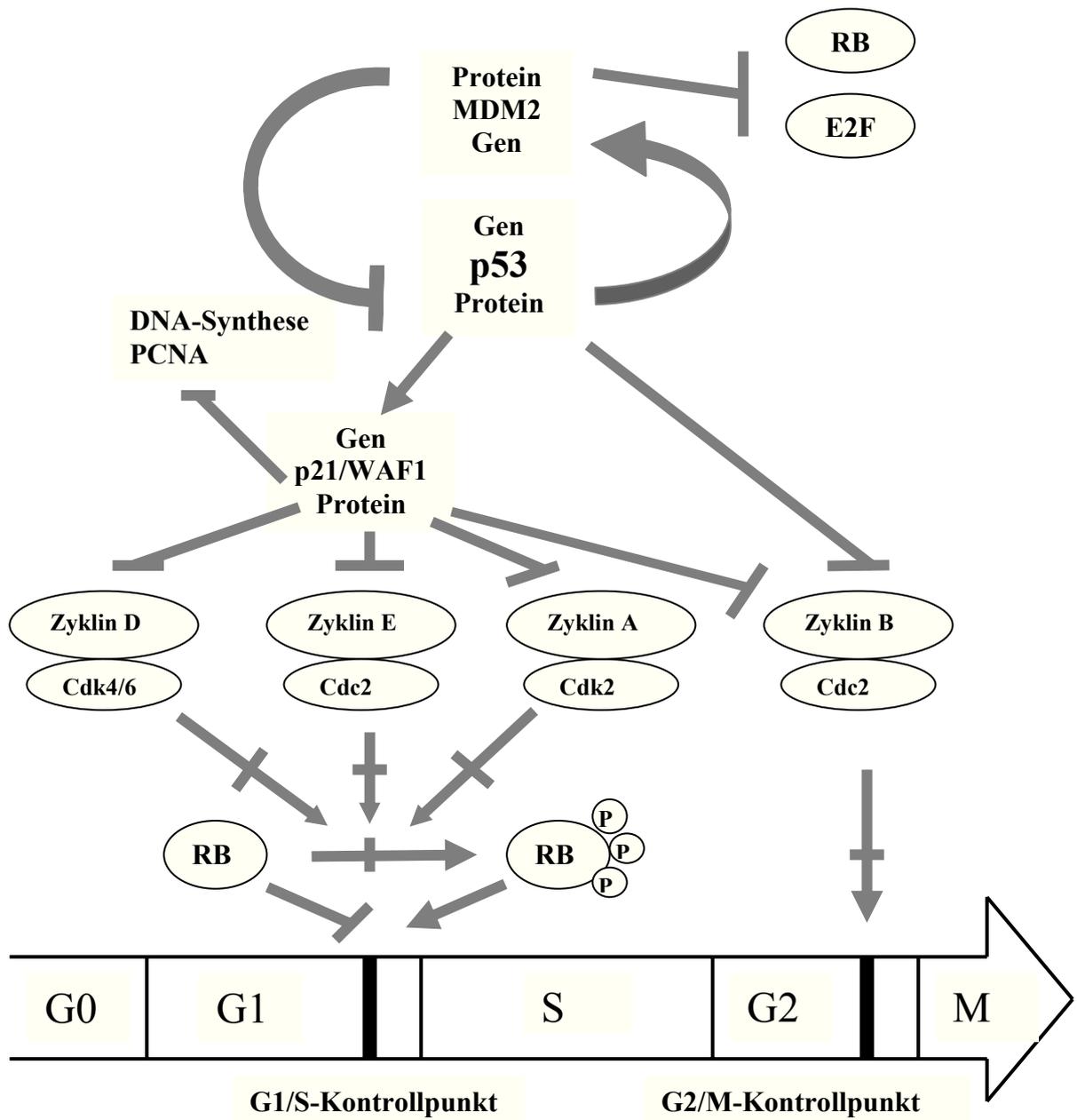


Abb. 3. Schematische Darstellung der p53-vermittelten Zellzyklus-Arretierung und regulative Funktionen von MDM2. Funktion: \rightarrow fördernd, \perp hemmend, \oplus aufgehoben.

Weiterhin zeigen Studien von Waga et al. (1994), daß p21 die DNA-Synthese inhibieren kann. Durch die Bindung an das “*proliferating cell nuclear antigen*“ (PCNA) wird die Komplex-Bildung zwischen PCNA und der DNA Polymerase δ unmöglich. Die Induktion von p21 durch p53 kann also zwei Auswirkungen haben:

- Verhinderung des Fortschreitens von der G1-Phase in die S-Phase durch Inhibition der Zyklus/CDK/CDC-Komplexe

- Blockade der DNA-Synthese durch Inaktivierung von PCNA.

Die Transkription von p21 kann direkt durch p53 aktiviert werden (Cordon-Cardo, 1995). Mutationen in Regionen des p53 Gens, die für die Bindungsstelle an das p21 Gen kodieren, können die Konformation der bindenden Proteindomäne verändern. Dies führt zum Verlust der Bindung an die Promotor-Region des p21 Gens und damit ist die Funktion von p53 als Transkriptionsfaktor für p21 aufgehoben.

Ein weiteres Protein, dessen Expression durch wt-p53 induziert wird (**Abb.3**), ist MDM2 ("murine double-minute chromosome-2") (Selivanova and Wiman, 1995). Mit zunehmendem p53 Gehalt ist ebenfalls die nachweisbare Menge des MDM2 Proteins erhöht (Barak et al., 1993). Eine Eigenschaft von MDM2 ist die Fähigkeit, wt-p53 zu binden (Hinds et al., 1990; Olson et al., 1993). Mit dieser Bindung wird eine Degradation von p53 durch Proteinasen des Ubiquitin-Systems eingeleitet (Haupt et al., 1997) und damit die p53-vermittelte, transkriptionale Aktivierung regulativer Gene inhibiert (Oliner et al., 1993). MDM2 und p53 unterliegen somit einem autoregulativen Feedback-Mechanismus, der unter Normalbedingungen niedrige zelluläre p53 Konzentrationen zur Folge hat. In Zellen mit intaktem p53 erfolgt in Streß-Situationen eine posttranslationale Veränderung von p53. Diese ist mit der Phosphorylierung von p53 an Serinresten in Position 15 und 37 sowie einer Dephosphorylierung in Serin 376 verbunden. p53 erfährt dabei eine Konformationsänderung (Shieh et al., 1997). Durch die Phosphorylierung in den Positionen 15 und 37 wird die Bindung des p53 an MDM2 gehemmt. Bei der Komplexbildung von p53 und MDM2, die unter normalen Wachstumsbedingungen zum Abbau von p53 führt, wird nach p53 Phosphorylierung eine verminderte Ubiquitin-vermittelte Degradation und damit eine Stabilisierung von p53 herbeigeführt. Weiterhin kann die Wirkung von MDM2 auf p53 durch p19^{ARF} bei Mäusen und p14^{ARF} beim Menschen gehemmt werden (Pomerantz, et al., 1998, Karayan, et al., 2001). Die Proteine p19^{ARF} und P14^{ARF} werden durch je ein Gen des INK4a/ARF-Locus kodiert (Esteller et al., 2000). Dieser Genlocus ist in vielen Tumoren deletiert oder mutiert. Liegt p14^{ARF} in einem ternärem Komplex mit MDM2 und p53 vor, entgeht p53 ebenfalls der Degradation (Weber et al., 2000). In Maus-Fibroblasten konnte allerdings gezeigt werden, daß p19^{ARF} nicht immer an der Stabilisierung von p53 beteiligt ist. In p19^{ARF(-/-)} Maus-Fibroblasten konnte durch ionisierende Strahlung eine regelhafte Stabilisierung von p53 ausgelöst werden (Prives, 1998).

Da MDM2 die Menge an p53 durch Einleitung der Degradation reguliert (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997), wird vermutet, daß MDM2 als Modulator der p53-vermittelten Antwort wirkt (Levine, 1997). wt-p53 regt die Transkription einer Reihe wichtiger regulatorischer Gene an; somit kann das onkogene Potential einer Überexpression von MDM2 mit dem Verlust der wt-p53 Funktion erklärt werden. In Transfektionsversuchen wurde nachgewiesen (Faily et al. 1993), daß eine Überexpression von MDM2 zur malignen Transformation von Rattenembryo-Fibroblasten führt und den wachstumsretardierenden Einfluß von p53 aufheben kann. Dies entspricht dem Befund, daß Amplifikation und Überexpression des MDM2 Gens bei etwa einem Drittel menschlicher Weichteilsarkome nachgewiesen wurde (Landanyi et al., 1993; Oliner et al., 1993).

Zu Beginn der Entwicklung eines Organismus während der Embryogenese ist die Apoptose (programmierter Zelltod) ein essentieller Vorgang (Duke et al., 1997). Während der physiologischen Involution von Geweben handelt es sich um untergehende Zellen, denen im Verlauf der Entwicklung keine Funktion mehr zugeordnet werden kann oder um Zellen, die nur bei einem Geschlecht benötigt werden (z.B. Zellen des Müllerschen Gangs bei männlichen Säugern). Apoptose ist damit im physiologischen Verlauf von Morphogenese und Organ-Differenzierung von entscheidender Bedeutung (Duke et al., 1997). Weiterhin können Zellen mit schädigendem Potential, z.B. autoreaktive T-Lymphozyten und Tumorzellen durch Apoptose eliminiert werden. Auf diese Weise wird die Integrität des Gesamtorganismus gewahrt. Externe schädigende Einflüsse wie UV- oder γ -Strahlung und chemische Substanzen können Apoptose auslösen (Evan and Littlewood, 1998). Der geregelte Ablauf der Apoptose unterscheidet sich grundlegend von dem unregulierten Ablauf der Zell-Nekrose. Sowohl morphologische als auch biochemische Parameter beider Vorgänge sind unterschiedlich (**Tab. 1**).

Der Vorgang der Apoptose wird durch multiple Signal- und Effektor-Kaskaden externer und interner Wachstums-, Überlebens- oder Todesfaktoren gesteuert. Ein Faktor, der aktiv Apoptose in einer Zelle auslösen kann, ist der zunächst als Membranprotein CD95 später als FAS/APO-1 bezeichnete Rezeptor (**Abb. 4**). Er ist ein Typ I-Membranprotein und gehört zu der TNF (Tumor-Nekrose-Faktor-) Rezeptor-Familie. In der zytoplasmatischen Region des Rezeptors liegt die sogenannte Todesdomäne. Die Transkription von FAS/APO1 kann durch p53 induziert werden (Owen-Schaub, et al., 1995). Durch den extern zugeführten Liganden (FAS-Ligand, FASL) wird Apoptose über FAS/APO-1 eingeleitet. FASL ist ein Typ II-Membranprotein und gehört wie der Rezeptor

zur Familie der Zytokine. Sein N-Terminus befindet sich im Zytoplasma und die C-terminale Region reicht in den extrazellulären Bereich. Durch Proteolyse des membran-

Tab. 1. Morphologische und biochemische Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose

Apoptose	Nekrose
Morphologische Kriterien	
<ul style="list-style-type: none"> • Absterben einzelner Zellen • Chromatin kondensiert an der Kernmembran • Zellmembran mit Bläschen, kein Verlust der Membranintegrität • Zellverkleinerung, Apoptose-Partikel mit kondensiertem Chromatin oder intakten Zellorganellen • keine entzündliche Reaktion 	<ul style="list-style-type: none"> • Tod von Zellverbänden • Aggregation des Chromatins im zerfallenden Zellkern • Verlust der Zellmembranintegrität • Zellen schwellen an und platzen • Entzündung
Biochemische Kriterien	
<ul style="list-style-type: none"> • induziert durch physiol. Stimuli (TNF, Fas-Ligand) • streng regulierter Prozess (Beteiligung spez. Proteine) • Verbraucht Energie • Proteinsynthese erforderlich • de novo Transkription von spez. Genen • DNA wird zu regelmäßigen Fragmentgrößen zerschnitten ("Ladder" von DNA-Fragmenten) 	<ul style="list-style-type: none"> • hervorgerufen durch unphysiol. Zerstörung (zytotoxische Effekte, O₂-Mangel) • Verlust der Regulation der Ionen-Homeostase • kein Energieverbrauch • keine Synthese von Proteinen • keine Transkription von neuen Genen • DNA wird zu unregelmäßigen Fragmentgrößen zerschnitten

gebundenen Proteins wird C-terminales FASL freigesetzt (Nagata et al., 1997). Die Bindung von FASL an FAS/APO-1 trimerisiert den Rezeptor und dieser wird damit aktiviert. Es bildet sich daraufhin der "Death-Inducing Signaling Complex" (DISC). An die zytoplasmatisch lokalisierte Todesdomäne von FAS/APO1 bindet das Adaptorprotein FADD/MORT1.

Dieses Protein besitzt ebenfalls eine Todesdomäne und lagert sich mit dieser an die Todesdomäne von FAS/APO-1 an (**Abb. 4**). N-terminal hat FADD/MORT1 außerdem eine sogenannte Todes-Effektor-Domäne. An diese Todes-Effektor-Domäne bindet die N-terminale Domäne von Caspase 8 (Flice, "FADD-like ICE", ICE = IL-2 Converting Enzyme, MACH). Caspase 8 wiederum besitzt N-terminal zwei Todes-Effektor-Domänen und gehört zu der "ICE-like" Proteinase Familie (Alnemri et al., 1996; Nagata et al., 1997). Mit den Todes-Effektor-Domänen bindet Caspase 8 an die Todes-Effektor-Domäne von

FADD/MORT1. Die N-terminale Region gleicht der anderer Caspasen aus der "ICE-like" Protease Familie. Das inaktive Proenzym von Caspase 8 wird durch diese Bindung aktiviert und induziert wiederum durch seine Bindung an weitere Caspasen mit der C-terminalen Region eine Kaskade von aktivierten Proteinase. Die Bezeichnung Caspase bezieht sich auf die Zugehörigkeit zu den Cystein-Proteinasen und auf ihre Substratspezifität, die durch proteolytische Spaltung hinter einem Aspartat-Rest gekennzeichnet ist. Caspasen schneiden verschiedene Substrate wie poly(ADP)-ribosylierte Polymerase, Lamin und Aktin. Durch die Proteolyse dieser Substrate werden Veränderungen in den Zellen und im Zellkern ausgelöst, die morphologisch sichtbar werden und zum Absterben der Zelle durch Apoptose führen.

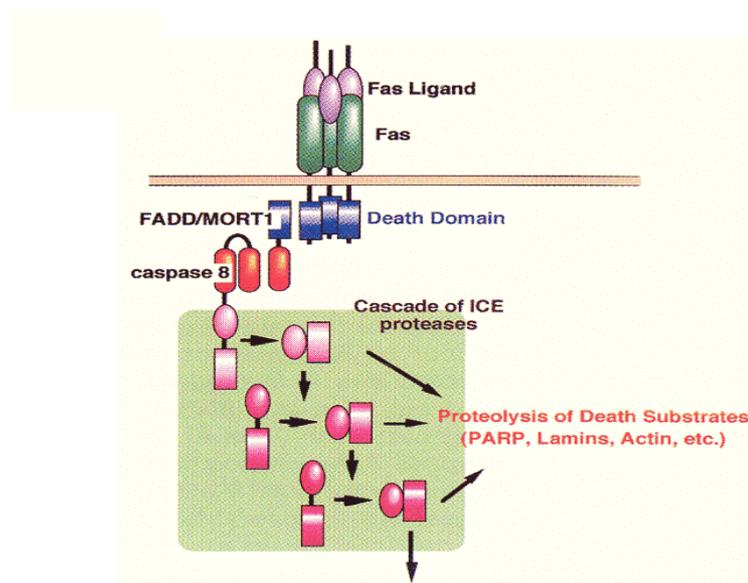


Abb. 4. FAS/APO-1 und "death-inducing signaling complex" (DISC) (nach Nagata et al., 1997).

An der Regulation der Apoptose sind die zur BCL-2 Familie zählenden Proteine maßgeblich beteiligt. Einige dieser Proteine sind an der zytoplasmatischen Seite der Mitochondrienmembran, des endoplasmatischen Retikulums und des Zellkerns lokalisiert (Krajewski, et al., 1993) und können Ionenkanäle bilden. Die porenformenden Domänen sind denen von Bakterientoxinen, wie dem Diphtherie-Toxin, ähnlich. Innerhalb dieser Familie können einige Proteine die Apoptose inhibieren, wie BCL-2, BCL-xL, BCL-w und MCL-1. Dagegen induzieren andere, wie BAX, BIK, BAK, BAD und BCL-xs, die Apoptose. Die verschiedenen Mitglieder der Familie können dimerisieren, und so die Funktionen des jeweils anderen verstärken oder auslöschen. Damit kann das Verhältnis von Aktivatoren zu Inhibitoren über die Induktion der Apoptose entscheiden (Yang and

Korsmeyer, 1996). Ausschlaggebend ist dabei die Assoziation der Proteine mit der Mitochondrienmembran, wie am Beispiel des BCL-2 Proteins deutlich wird (**Abb. 5**). So konnte gezeigt werden, daß durch BCL-2 die Apoptose nur inhibiert werden kann, wenn Mitochondrien im Versuchsansatz vorhanden waren (Newmeyer et al., 1994). In einem plasmamembranunabhängigen Apoptose-Weg wird Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt. Das freigesetzte Cytochrom C assoziiert im Zytosol mit dem Protein APAF-1 ("Apoptosis-Activating Factor-1"), das infolgedessen eine Konformationsänderung erfährt und eine Caspase-Kaskade über die Caspase 9 aktiviert. Durch diesen Vorgang kann ebenfalls Apoptose induziert werden, die u.a. durch Verlagerung von Phosphatidylserin von der inneren in die äußere Schicht der Zellmembran angezeigt wird (Green, 2000). Der Vorgang der Umlagerung von Phosphatidylserin kann sehr rasch erfolgen, da bereits wenige Minuten nach Schädigung der Mitochondrien-Membran die Translokation eingeleitet wird (von der Lage, et al., 2001). BAX, als proapoptotisches Mitglied der BCL-2 Familie, löst die Freisetzung von Cytochrom C und damit die Apoptose aus (Adams and Cory, 1998; Green, 1998), während BCL-2 die Freisetzung von Cytochrom C inhibiert und so die Einleitung der Apoptose hemmt. Die Expression von BAX kann durch p53 induziert werden, während die Expression von BCL-2 durch p53 reprimiert wird (Miyashita et al., 1994). p53 ist durch die transkriptionelle Induktion von FAS/APO1 und BAX sowie durch Repression von BCL-2 auch an der Regulation von Apoptose beteiligt. Dabei ist nicht vollends geklärt, unter welchen Bedingungen p53 den G1-Arrest oder die Apoptose induziert.

In verschiedenen Studien wurden hohe Inzidenzen von p53 Mutationen in Zellen des Prostatakarzinoms gefunden (Effert et al., 1992; Bookstein et al., 1993; Chi et al., 1994). Auch in 26,6% benigner Hyperplasien der Prostata konnten bereits Mutationen im p53 Gen nachgewiesen werden (Schlechte et al., 1997). Dieses Ergebnis spricht dafür, daß Mutationen im p53 Gen ein relativ frühes Ereignis in der Entartung von Prostatazellen sind. Die Auswirkungen des Funktionsverlustes von p53 auf die Expression zellzyklussteuernder Proteine sind bei Tumorzellen der Prostata bislang nicht eingehend untersucht. Allerdings sind Prostatakarzinome, deren Zellen mutiertes p53 enthalten, mit einer schlechteren Prognose korreliert. Die betroffenen Patienten zeigen eine höhere Rückfallquote nach Therapie der Erkrankung und eine niedrigere Überlebensrate als Patienten mit Prostatakarzinom ohne Mutation im p53 Gen (Schwede et al., 1997).

Androgene Steroidhormone fördern das Wachstum von Prostatakarzinomzellen (Cunha et al., 1987). Sie binden an den Androgen-Rezeptor, der zur Superfamilie der Liganden-

abhängigen Transkriptionsfaktoren zählt (Evans et al., 1988; Beato et al., 1989). Mit der Bindung des Steroids wird der Androgen-Rezeptor aktiviert und die Transkription von

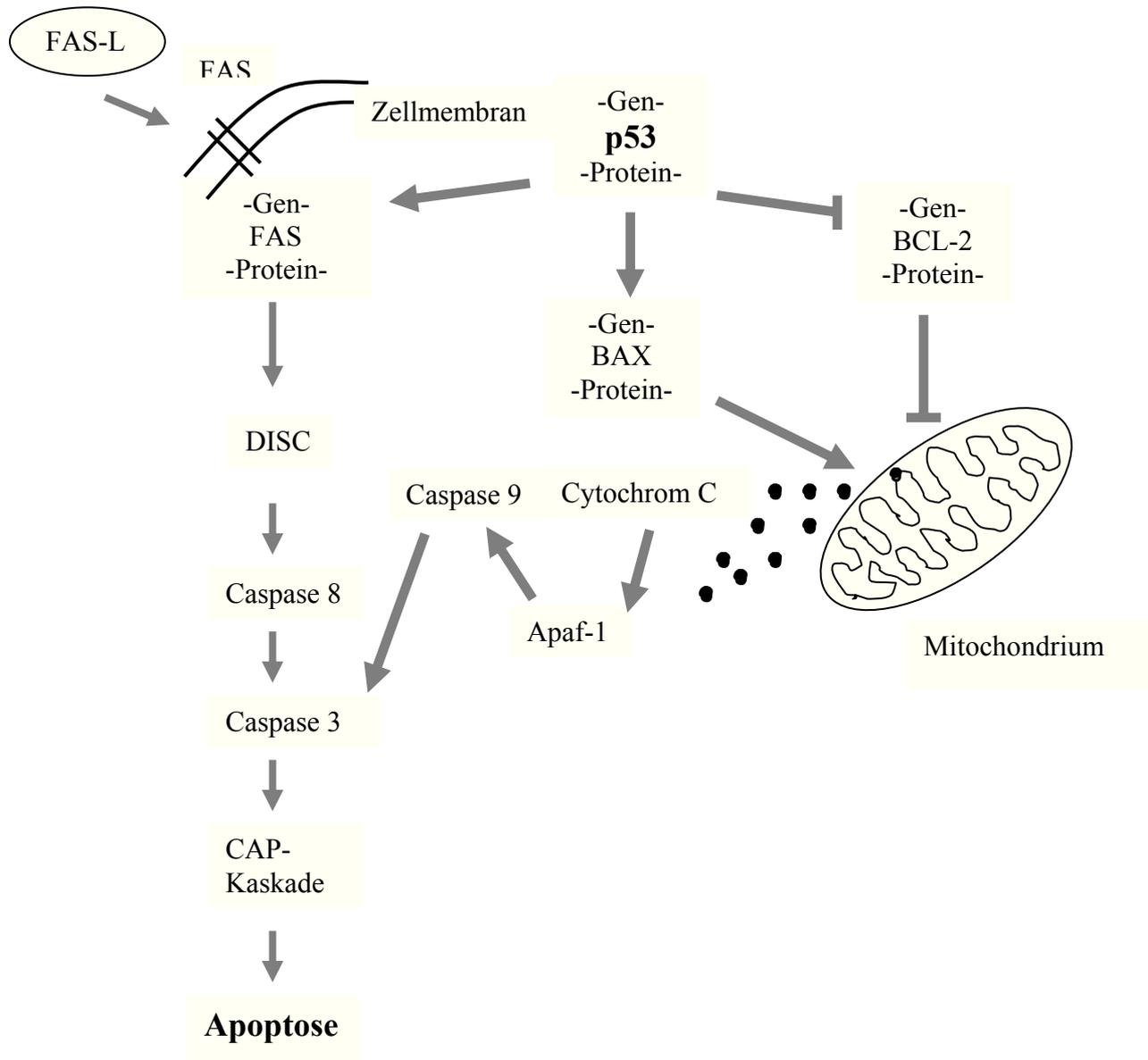


Abb. 5. p53 und Apoptose (vergl. Abb. 4, S.10)

wachstumsfördernden Genen induziert. Androgen-Entzug kann eine klinisch manifeste Rückbildung des Prostatakarzinoms bewirken. Der Verlust an Tumormasse wird mit dem

programmierten Zelltod (Apoptose) von Prostatakarzinomzellen in Verbindung gebracht (Tang and Porter, 1997).

Bei männlichen Individuen wird Androgen-Entzug durch Kastration oder durch die Verabreichung von Hormonen mit antagonistischer Wirkung erzielt. In der Therapie von Prostata Tumoren werden Antiandrogene mit unterschiedlichem Erfolg eingesetzt. 80% der Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom reagieren auf den Androgen-Entzug mit der Rückbildung des Tumors. Der Erfolg der endokrinen Therapie hält in den meisten Fällen nur für einige Zeit bis zum Verlust der Androgen-Sensitivität an (Kellner et al., 1993). Die molekularen Vorgänge, die zur Hormonunabhängigkeit und zur Resistenz führen, sind bis heute nicht vollständig entschlüsselt. Mutationen im Androgen-Rezeptor-Gen sind als eine mögliche Ursache anzusehen (Veldscholte et al., 1992). Mutierte Regionen der steroidbindenden Domäne des Androgen-Rezeptor-Gens können die Sekundärstruktur des aktiven Zentrums des Androgen-Rezeptors verändern und damit einen Spezifitätsverlust bewirken. Die Rezeptoren können infolgedessen auch durch andere Steroide wie Östrogene oder Progesteron aktiviert werden (Harris et al., 1990).

1.1. Fragestellung

In den eigenen Untersuchungen werden Aktivität und Präsenz im Zellzyklus an einer Reihe von regulierenden Proteinen (z.B. p53, MDM2, p21) bei den etablierten Prostatakarzinom-Zelllinien DU-145, LNCaP und PC-3 verglichen. Jede der drei Zelllinien besitzt einen anderen p53 Status (**Tab. 2**). Die nicht androgensensitiven DU-145 Zellen tragen jeweils eine Mutation in beiden Allelen des p53 Gens (**vergl. auch Abb. 40 S. 103-104**) mit Akkumulation des mutierten Proteins im Zellkern (Carroll et al., 1993). Zellen der ebenfalls nicht androgensensitiven Linie PC-3 exprimieren kein p53 Protein, da ein Allel fehlt und das verbleibende Allel so mutiert ist, daß kein vollständiges Protein gebildet wird. Die androgensensitiven Zellen der Linie LNCaP besitzen eine stille Mutation im p53 Gen mit Expression des wt-Proteins (Carroll et al., 1993). Die unterschiedliche Konstellation des p53 Status der Zellen bietet, nach Manipulation des Wachstums durch Serumentzug, DHT oder Antiandrogene, Vergleichsmöglichkeiten der Regulation von p53 und der nachgeschalteten Proteine (z.B. MDM2 und p21). Zum Vergleich wird die

Tab. 2. Eigenschaften der verwendeten Zelllinien. p53 Mutationen und Expression in den Zelllinien DU-145, LNCaP und PC-3. Androgen-Rezeptor-Genstatus und Androgen-Sensitivität.

Zelllinien	DU-145	LNCaP	PC-3	MFM-223
p53-Genstatus	Mutationen in beiden Allelen; Exon 6 Codon 223 und Exon 8 Codon 274	stille Mutation in Exon 5 Codon 153, kein Aminosäureaustausch	Verlust eines Allels; verbleibendes Allel mit Frameshift-Mutation	unbekannt
p53-Expression	überhöht	regulär	keine	unbekannt
Androgen-Rezeptor-Genstatus	Deletion	Punktmutation in Codon 868, Aminosäureaustausch	Deletion	Exprimiert und intakt
Androgen-Sensitivität	keine	sensitiv	keine	sensitiv

Mammakarzinom-Zelllinie MFM-223 untersucht, über deren p53 Status bisher nichts bekannt ist. Zellen dieser Linie sind androgensensitiv, indem ihr Wachstum durch DHT gehemmt und durch das Antiandrogen CPA stimuliert werden kann (Hackenberg et al., 1990). Neben dem Nachweis der Apoptose, werden Western-Blot Analysen der Apoptose assoziierten Proteine, wie BAX, BCL-2, Caspase 8, Hinweise auf die Regulation der Apoptose unter verschiedenen Bedingungen der Wachstumshemmung an den verwendeten Zelllinien geben. Die Untersuchungen zur Apoptose gewähren Einblicke in eventuell unterschiedliche Mechanismen der Regulation von Wachstumshemmung und Zelltod bei humanen Tumorzellen von Prostata und Mamma.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Tumorzelllinien

Die etablierten Prostatakarzinom-Zelllinien DU-145 (Mickey et al., 1977) und PC-3 (Kaighn et al., 1979) wurden von der Abteilung für Urologie der Charité, Humboldt Universität Berlin durch Herrn Prof. Dr. Jung zur Verfügung gestellt. Beide Zelllinien zeichnen sich durch epitheloide Morphologie aus (**Abb. 6 A u. C**). Die Prostatakarzinom-Zelllinie LNCaP (Horoszewicz, et al., 1981) wurde über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ; Braunschweig) bezogen. Die Zellen dieser Linie wachsen fibroblastenähnlich in der Zellkultur (**Abb. 6 B**). Eine fibroblastenähnliche Morphologie (**Abb. 6 D**) haben auch die Zellen der androgensensitiven Mammakarzinomlinie MFM 223 (Hackenberg et al., 1991).

Zur Dokumentation von Veränderungen der Zellkulturen während der Dauer der Kultivierung wurde nach dem Erhalt der Zellen mit der Notierung der Passagen begonnen. Über die vorher durchgeführte Anzahl von Trypsinierungen sind mit Ausnahme von MFM-223 Zellen keine Daten erhältlich. Bei den externen Zelllinien wurden Passagen 2-30 der Kultivierung in der hiesigen Notierung verwendet.

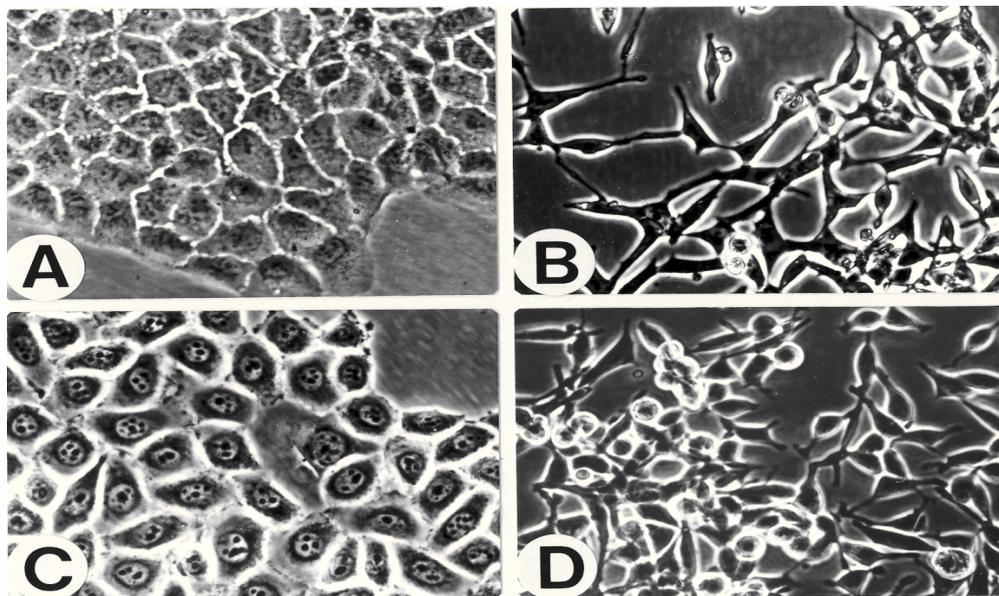


Abb. 6. Monolayer-Kulturen der Prostatakarzinom-Zelllinien mit unterschiedlicher Morphologie. (A) epitheloide Morphologie der DU-145 Zellen, (B) LNCaP Zellen mit fibroblastoider Morphologie, (C) epitheloide PC-3 Zellen und (D) Zellen der Mammakarzinomlinie MFM-223 mit partiell fibroblastenähnlicher Morphologie; Phasenkontrast, 100x.

2.1.2 Zellkultivierung und Kryokonservierung

Die Zellen wurden als Monolayerkulturen in Kulturflaschen aus Plastik (Costar; Becton & Dickinson; Heidelberg oder Nunc; Roskilde, Dänemark) kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit in Brutschränken (Forma Scientific; Marietta; OH). Bei Konfluenz (ca. alle 3 oder 5 Tage) wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden sie kurz mit Trypsin/EDTA Lösung (0.05 %/5 mM in PBS) gespült. Durch erneute Zugabe von ~ 4 ml der Lösung wurden die Zellen nach Inkubation für 3-5 Minuten bei 37°C durch Klopfen vom Boden der Kulturflasche (ca. 80 cm²) abgelöst. Nach Inaktivierung des Trypsins mit serumhaltigem Medium (37°C) wurde die erhaltene Zellsuspension auf weitere Kulturflaschen verteilt und erneut mit ausreichend Kulturmedium versetzt.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen von fast konfluenten Kulturflaschen am Vortag mit frischem Kulturmedium versehen. Nach Trypsin-Behandlung erfolgte eine Pelletierung der abgelösten Zellen bei 1000 rpm (Christ IKS Zentrifuge; Osterode) und 4°C für 1-2 Minuten. Anschließend wurden die Zellen in Medium (20 % FCS; 10 % DMSO oder 10 % Glycerin bei MFM-223 Zellen) mit einer Zellkonzentration von ~5 x 10⁶ pro ml (entsprechend einer 80 ml-Kulturflasche) resuspendiert und in 1-ml-Portionen auf Kryoröhrchen (Nunc) verteilt. Direkt im Anschluß wurden sie zunächst bei -80°C und dann in flüssigem Stickstoff verwahrt, oder bei -80°C belassen (MFM-223 Zellen).

2.1.3 Medien und Lösungen zur Zellkultivierung

Als Wachstumsmedium wurde RPMI-1640 Medium mit L-Glutamin (Gibco BRL; Karlsruhe) verwendet. Dem Kulturmedium wurden Penicillin/Streptomycin (Gibco BRL) in einer Konzentration von 50 U/ml und 10 % fötales Kälberserum (Gibco BRL) zugesetzt. Für MFM-223 Zellen wurde Medium My mit 1mM Glutamin, 40 µg/ml Gentamycin und 10 % FCS verwendet (Simon et al., 1984).

Bei den Untersuchungen zur Sensitivität für Steroidhormone wurde das fötale Kälberserum von Steroiden und niedermolekularen Wachstumsfaktoren befreit (Dabre et al., 1983). Hierzu wurden 100 ml FCS mit 1.0 g Dextran-40 (Pharmacia; Freiburg) und 10 g gepulverter Aktivkohle (Sigma, München) versetzt und 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde bei 8000 rpm und 4°C zentrifugiert (Sorvall-K 50 Zentrifuge; Hereaus; Hanau). Nach zweimaligem Zentrifugieren wurde der Überstand steril filtriert. Zunächst wurde eine Porengröße von 0.4 µm verwendet, im Anschluß daran wurde mit

einer Porengröße von 0.2 µm filtriert. Das Filtrat wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.1.4 Wachstumsversuche und Hormonbehandlung

Zur Untersuchung des hormonabhängigen Wachstumsverhaltens wurden subkonfluente Zellen einer Gewebekulturflasche nach Abstoppen des Trypsinierungsvorgangs mit serumhaltigem Wachstumsmedium in einen Erlenmeyerkolben überführt. Die Zellkonzentration wurde nach Durchmischen der Suspension mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Aussaat der Zellen in multiplen Cluster-Schalen (Becton & Dickinson) und einer Anwachsphase von 2 Tagen wurde der Zellrasen mit Medium, das 1 % Aktivkohle behandeltes Serum enthielt, gespült. Anschließend wurden die zu prüfenden Hormone in den jeweils angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Als Kontrollen wurden Kulturen mit 10 % oder 1 % bzw. 0.1 % unbehandeltem oder Aktivkohle behandeltem FCS ohne Hormonzusatz im Medium mitgeführt. Zur Erstellung der Wachstumskinetik der Zellen wurde in der gleichen Weise verfahren.

Berechnung der Verdopplungszeit:

$$\ln \times \frac{\text{Tage der Inkubation} \times \ln 2}{\frac{Zz/\text{cm}^2 \text{ nach Behandlung}}{Zz/\text{cm}^2 \text{ vor Behandlung}}} = T$$

Die untersuchten Zelllinien wurden mit 5α-Dihydrotestosteron (DHT; Sigma), dem steroidalen Antiandrogen Cyproteronacetat (CPA; Sigma) und dem nicht-steroidalen Antiandrogen Casodex (Bicalutamid, CAS; Zeneca; London) behandelt (**Abb. 7**).

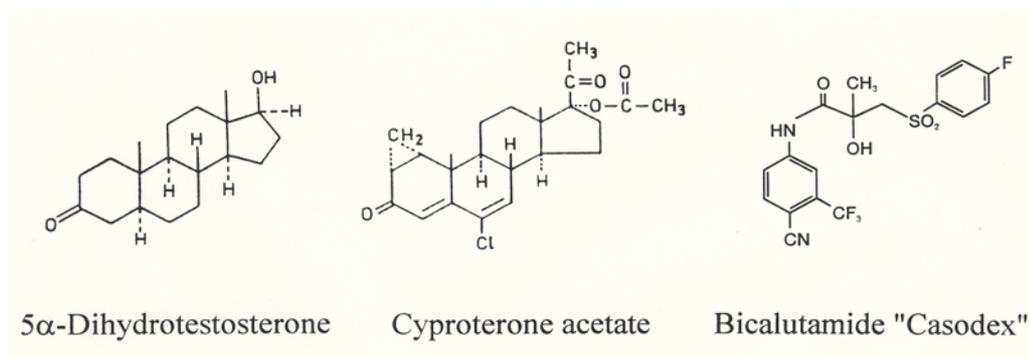


Abb. 7. Strukturformeln von 5α-Dihydrotestosteron, Cyproteronacetat und Casodex (chem. Bezeichnung Bicalutamid).

2.2 Extraktion zellulärer Proteine

Die Zellen wurden in Kulturschalen (145 cm²; Nunc) bis zur Subkonfluenz kultiviert. Der Zellmonolayer wurde auf Eis zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Im Anschluß daran wurden die Zellen in 5 ml kaltem PBS mit einem Gummischaber vom Schalenboden abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen (Nunc) überführt. Nach der Zentrifugation bei 1000 rpm und 4°C in einer Christ IKS Zentrifuge wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette entfernt und verworfen. Die pelletierten Zellen wurden in 500 µl Lysispuffer (RIPA) resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch wiederholtes Durchmischen mit einem "Vortex" (Heidolph; Göttingen) für 45 Minuten auf Eis. Das Lysat wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 30 Minuten bei 4°C und 13000 rpm in einer Tischzentrifuge (Heraeus; Hanau) zentrifugiert. Der Überstand wurde danach in neue Reaktionsgefäße portioniert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung verwahrt.

Lysispuffer (RIPA):

1	% (v/v)	Igepal CA-630 (Sigma)
0.5	% (w/v)	Natriumdeoxycholat
0.1	% (w/v)	SDS
50	mM	Tris-HCl, pH 7.5
150	mM	NaCl
10	µl/ml	Aprotinin (Sigma)
10	µl/ml	Leupeptin (Sigma)
10	µl/ml	Pepstatin A (Sigma)
1	mM	PMSF (Sigma)

PBS: pH 7.5:

140	mM	NaCl
3	mM	KCl
8	mM	NA ₂ HPO ₄
1.5	mM	KH ₂ PO ₄

Quantitative Proteinbestimmung

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Lowry et al., 1951 besteht darin, daß Proteine unter alkalischen Bedingungen zweiwertiges Kupfer zu einwertigem Kupfer reduzieren. Nach Zugabe des Folin-Ciocalteu Reagenz oder eines anderen chromogenen Reagenz fällt das reduzierte Kupfer als farbiger Komplex aus. Die Absorbtion bei 562 nm ist dabei direkt proportional zur Proteinkonzentration.

Für jede quantitative Proteinbestimmung wurde eine Standard Eichkurve erstellt. Dazu wurde ein BSA-Eichstandard von 1mg BSA/ml in Abstufungen von 0-100 µg/µl verwendet. Die Proben und der Eichstandard wurden mit aqua bidest. auf 100 µl aufgefüllt. Danach wurde 1 Teil Lösung A (Kupfersulfat; Sigma) mit 50 Teilen der Lösung B (Bicinchoninic acid solution; Sigma) zu dem eigentlichen Reagenz gemischt. Jede Probe wurde mit 2 ml Reagenz versetzt und sofort durchmischt. Im Anschluß daran wurden die Proben bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Extinktion wurde in Einmalküvetten bei 562 nm im Spektralphotometer (PMQ II; Zeiss; Oberkochen) gemessen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde eine Eichgerade aus den BSA Eichwerten ermittelt und mittels linearer Regression zurückgerechnet. Die Werte wurden in Zweifachbestimmungen ermittelt.

2.3 Gel-elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die isolierten Proteine wurden in SDS-haltigen Polyacrylamid (PAA)-Gelen nach Sambrook et al., 1989 aufgetrennt. Das anionische Detergenz SDS bindet an die denaturierten Proteine. Durch die Bindung erhalten die Proteine eine negative Ladung. Die Menge des gebundenen SDS verhält sich nahezu proportional zum Molekulargewicht der Proteine. Die Auftrennung der Proteine erfolgt daher auf Grund des unterschiedlichen Molekulargewichtes. Als Kontrolle wurde ein Gemisch aus Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht (6.4 bis 201 kD; Kaleidoscope Prestained Standards; BioRad; München) mitgeführt.

Zunächst wurden die Glasplatten und Spacer gründlich mit aqua bidest. gereinigt. Anschließend wurden sie mit Ethanol gereinigt. Nach dem Zusammenbau der Gießvorrichtung wurde ein 10 % Fußgel (1 cm Höhe) gegossen, um ein Auslaufen des Trenngels zu vermeiden. Im Anschluss daran wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Auf diese Weise wurde ein gleichmäßiger Abschluß des Trenngels erzielt. Die Höhe des Trenngels betrug 14 cm. Die Auftrennung erfolgt in diesem Gelabschnitt entsprechend dem Molekulargewicht der Proteine. Die Konzentration des Trenngels (10 % oder 15 %) wurde gemäß dem Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine ausgewählt. Bei niedermolekularen Proteinen wurde eine Acrylamidkonzentration von 15 % verwendet. Höhermolekulare Proteine wurden in 10 % PAA-Gelen getrennt. Nach Auspolymerisieren des Trenngels (1 Stunde) wurde das Isopropanol durch dreimaliges Waschen mit aqua bidest. entfernt. Zuletzt wurde das Sammelgel mit einer PAA-Konzentration von 5 % hergestellt und auf das Trenngel gegossen. Danach wurde der zuvor mit Ethanol gereinigte Probenkamm eingesetzt. Das Sammelgel unterscheidet sich vom Trenngel durch höhere Porösität, pH und Salzgehalt. Auf Grund dieser Gelkonstellation werden die Proteine in einer Front gebündelt, bevor sie im Trenngel auf Grund der unterschiedlichen Molekulargewichte separiert werden. Das Verhältnis zwischen Acrylamid und Bisacrylamid betrug in allen drei Geltypen 29:1. Das fertiggestellte Gel wurde erst am darauffolgenden Tag verwendet, um ein vollständiges Auspolymerisieren des Acrylamids zu gewährleisten.

Fußgel:

10 % PAA

1.25	ml	40 % Acrylamid/Bisacrylamid (30:1) (Biorad)
0.025	ml	SDS (20 %)
1.3	ml	1.5 M Tris-HCl pH 8.8
0.002	ml	Temed
0.05	ml	Ammoniumpersulfat
2.4	ml	aqua bidest.

Trenngel:

10 % PAA 15 % PAA

10	15	ml	40 % Acrylamid/Bisacrylamid (30:1)
0.2	0.2	ml	SDS (20 %)
10	10	ml	1.5 M Tris-HCl pH 8.8
0.016	0.016	ml	Temed
0.4	0.4	ml	Ammoniumpersulfat
19.4	14.4	ml	aqua bidest.

Sammelgel:

5 % PAA

1.25	ml	40 % Acrylamid/Bisacrylamid (30:1)
0.05	ml	SDS (20 %)
1.25	ml	1 M Tris- HCl pH 6.8
0.01	ml	Temed
0.1	ml	Ammoniumpersulfat (10 %)
2.34	ml	aqua bidest.

Nach dem Entfernen des Probenkamms wurden die Geltaschen mit Laufpuffer gespült. Auf diese Weise wurde nicht auspolymerisiertes Acrylamid im Taschenboden entfernt. Die Pufferreservoirs wurden mit Laufpuffer gefüllt.

Laufpuffer:

25	mM	Tris-HCl (pH 8.3)
192	mM	Glycin
0.1	% (v/v)	SDS

Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese

Die Proteinlysate wurden im Eisbad aufgetaut und wurden auf dem "Vortex" gemischt. Es wurden 80 bzw. 40 µg Gesamtprotein eingesetzt. Das Probenvolumen wurde mit aqua bidest. auf 30 µl eingestellt. Es wurden 10 µl des 4-fach konzentrierten Probenpuffers zugesetzt. Die Proben wurden bei 95°C für 5 Minuten denaturiert und an zentrifugiert, danach sofort zurück ins Eisbad gestellt und aufgetragen.

4 x Probenpuffer:

0.125	M	Tris-HCl (pH 6.8)
4	% (v/v)	SDS
10	% (v/v)	Glycerin
0.02	% (v/v)	Bromphenolblau
4	% (v/v)	β-Mercaptoethanol

Elektrophorese

Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 40 V für eine Stunde gestartet, damit die Proteine im Sammelgel an der Trennschicht vom Sammelgel zum Trenngel vereinigt wurden. Die Spannung wurde dann auf 60 V erhöht. Die Elektrophorese erfolgte über 12-14 Stunden.

2.4 Western-Blot Analysen

Zur Durchführung von spezifischen, immunchemischen Reaktionen wurden die Proteine nach der Elektrophorese aus dem Gel heraus mobilisiert und auf eine Membran transferiert. Diese Membran bestand aus Nitrocellulose oder Polyvinylidendifluorid (PVDF). Das Gel wurde zu diesem Zweck auf eine Trägermembran gelegt und senkrecht zu der Auftragefläche eine Spannung angelegt. Nach einigen Stunden sind die Proteine aus dem Gel herausdiffundiert und auf der Oberfläche der Membran fixiert. Sie wurden dort angefärbt und weiteren immunchemischen Verfahren unterworfen.

Für die Durchführung wurde eine Trans-Blot Zelle (BioRad) (**Abb. 8**) verwendet, mit der die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran ("HybondTM-C extra") mit einer Porengröße von 0.4 µm (Amersham; Braunschweig) oder auf eine PVDF-Membran (BioRad) mit einer Porengröße von 0.2 µm transferiert wurden. Die Auswahl der Membran erfolgte abhängig vom Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins. Zur Analyse von niedermolekularen Proteinen wurde eine Porengröße von 0.2 µm gewählt, um möglichst wenig Protein während des Transfers zu verlieren. Der elektrochemische Transfer erfolgte in einem sogenannten Transfer-Sandwich, das in eine Transferkammer zwischen zwei Elektroden gehängt und in den Transferpuffer getaucht wird. Das Sandwich besteht aus zwei sogenannten Faserschwämmen, jeweils 2 Filterpapieren, der Nitrocellulose- oder PVDF-Membran und dem Gel. Vor dem Zusammenbau des Sandwiches wurden alle Komponenten in Transferpuffer für 10 Minuten äquilibriert. Die PVDF-Membran erfuhr eine andere Vorbehandlung. Sie wurde 2 Sekunden in Methanol getaucht, 5 Minuten in aqua bidest. und anschließend für 15 Minuten in Transferpuffer inkubiert. Zur Stapelung des Transfer-Sandwiches wurde in den geöffneten Gelhalter zunächst ein eingeweichter Schwamm gelegt, anschließend zwei Lagen Filterpapier und darauf das Gel. Auf das Gel wurde die Membran möglichst gerade und luftblasenfrei plaziert. Die Position der Membran wurde durch Abschneiden einer Ecke markiert. In umgekehrter Reihenfolge wurden dann die Filterpapiere und der Faserschwamm auf das Gel gelegt und der Gelhalter geschlossen. Der Gelhalter wurde daraufhin in die Transfer-Kammer gestellt. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 210 mA für 3-4 Stunden. Die Membran wurde nach Beendigung des Transfers sofort in TBS-T-Puffer pH 7.6 gelegt und vor Austrocknung geschützt. Da ein vorgefärbter Standard an Molekulargewichtsmarkern in der Gel-Elektrophorese mitgeführt wurde, konnte die Qualität des Transfers direkt kontrolliert werden.

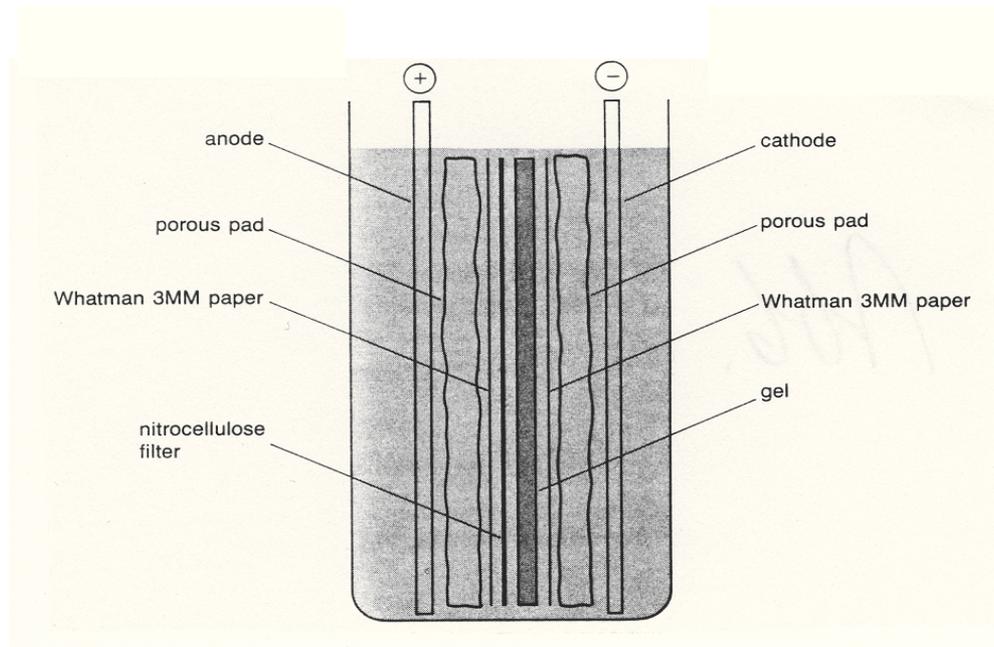


Abb. 8. Sambrook: Schematischer Aufbau der Trans-Blot Cell (BioRad).

Transferpuffer:

25	mM	Tris-HCl pH 8.3
192	mM	Glycin
20	% (v/v)	Methanol

Anfärben der immobilisierten Proteine auf der Membran mit Ponceau S-Lösung

Nach erfolgtem Transfer wurden die Membranen mit Ponceau S-Lösung behandelt. Ponceau S (Sigma) färbt die immobilisierten Proteine auf der Membran. Die Membran kann nach Anfärben mit Ponceau S weiterhin für immunchemische Untersuchungen verwendet werden. Mit dieser Methode wurde geprüft, ob in allen Spuren des PAA-Gels die gleiche Menge Protein aufgetragen war. Die Membran wurde hierzu 1 Minute in der Ponceau S-Lösung geschwenkt und anschließend mit aqua bidest. entfärbt.

Ponceau S-Lösung:

2	% (w/v)	Ponceau S (Sigma)
30	% (w/v)	TCA
30	% (w/v)	Sulfosalicylsäure

2.5 Immunoblotting

Die Behandlung der immobilisierten Proteine mit spezifischen Antikörpern erlaubt deren Identifizierung und Quantifizierung. Die Membran wurde dazu mit einem Antikörper versetzt, der spezifisch nur mit einem der immobilisierten Proteine eine Antigen-Antikörper-Reaktion eingeht. Der Nachweis der Antikörperbindung kann mit einer Farbreaktion oder mit Hilfe einer Chemolumineszenz-Reaktion durchgeführt werden.

In dieser Arbeit wurde mit dem "ECL Western Blotting System" (Amersham) gearbeitet. Mit diesem System werden Antigen-Antikörperbindungen mit Hilfe der Chemilumineszenz dargestellt. Dabei bindet der primäre Antikörper, der an das zu detektierende, immobilisierte Protein gebunden ist, einen sekundären Antikörper. An diesen sekundären Antikörper ist eine "horseraddish" Peroxidase gekoppelt (**Abb. 9**). Unter alkalischen Bedingungen katalysiert die Peroxidase die Oxidation von Luminol. Das Luminol wird dabei in einen metastabilen Zustand überführt und zerfällt unter Emission von Licht. Diese Lichtemission wurde mit Hilfe von Röntgenfilmen sichtbar gemacht.

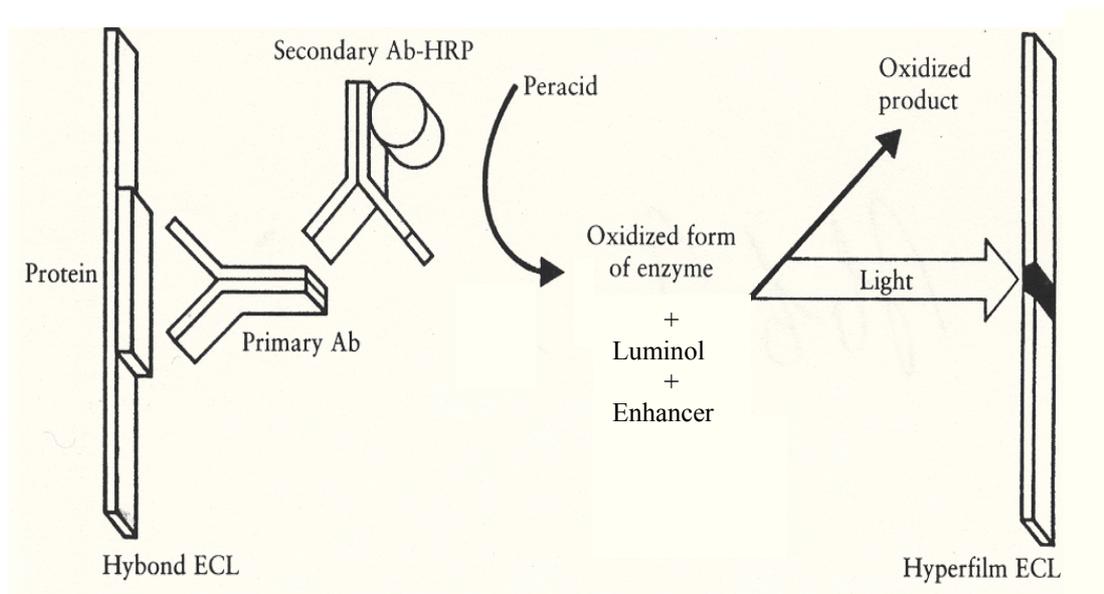


Abb. 9. Prinzip der ECL Western Blotting Methode; aus Assay Information; Amersham, 1998.

Tab. 3. Primäre Antikörper für Western-Blot Analysen

Antikörper gegen	Epitop Aminosäuren	Konzentration für Immunoblotting ($\mu\text{g/ml}$)	Firma
Androgen Rezeptor , monoklonal; Maus IgG2a	33-485	2	Pharmingen; Hamburg
BAX ,;polyklonal; Kaninchen IgG	150-165	2	Oncogene Res. Prod.; Hamburg
BCL-2 ; monoklonal; Maus IgG1 κ	41-54	2	Oncogene Res. Prod.
MDM2 ; monoklonal Maus IgG2b	26-168	2	Oncogene Res. Prod.
p53 (Ab-2) ; mono- klonal Maus IgG1 κ	WT und MT 46-55	1	Oncogene Res. Prod.
p21 ; monoklonal; Maus IgG1	vollständiges Protein	1	Pharmingen
FAS ; monoklonal; Maus IgG3 κ	nicht bestimmt	0.5	Oncor (Heidelberg)
Caspase 8 ; mono- klonal; Maus IgG2a	335-469	2	Pharmingen

2.6 Immunodetektion

1. Blockieren der Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in TBS-T mit 5 % Magermilchpulver (Nestlé; Frankfurt am Main).
2. Waschen 2 x für 5 Minuten in TBS-T.
3. Inkubation mit dem primären Antikörper (**Verdünnungen s. Tab. 3**) für 2 Stunden in TBS-T mit 0.5 % Milchpulver.
4. Waschen der Membran 2 x kurz, 1 x 15 Minuten und 2 x 5 Minuten in TBS-T.
5. Inkubation mit dem sekundären HRP-markierten Antikörper (Verdünnung 1:2500) für eine Stunde in TBS-T mit 0.5 % Magermilchpulver.
6. Waschen der Membran 2 x kurz, 1 x 15 Minuten und 4 x 5 Minuten in TBS-T.
7. Zur Detektion wurde die Membran mit 0.125 ml/cm² der Detektionslösung (entsprechend Lösung 1 und Lösung 2 (Amersham); im Verhältnis 1:1) für 1 Minute bei Raumtemperatur überschichtet.
8. Die Exposition erfolgte in der Dunkelkammer auf einem Röntgenfilm (Amersham) für 1 Minute. Bei ungenügender Schwärzung des Röntgenfilms wurde mit einem weiteren Röntgen-Film erneut exponiert bei verlängerter Einwirkzeit.

TBS-T:

137	mM	NaCl
3.8	ml	Salzsäure
0.1	% (v/v)	Tween-20

2.7 Immunfluoreszenz an kultivierten Zellen**Vorbereitung der Objektträger**

Die Objektträger wurden zunächst über Nacht in 1 N HCl eingelegt, damit sollte die Glasoberfläche angeraut werden, um die Anheftung der Zellen zu erleichtern. Danach wurden sie dreimal mit aqua bidest. gewaschen. Zuletzt wurden die Objektträger mit 80 % Ethanol geputzt, um letzte Fettreste zu entfernen. Sie wurden dann bei 180°C für 3 Stunden in einem Heißluft-Sterilisator sterilisiert. Die Objektträger wurden steril in QuadriPerm-Schalen (Heraeus) gelegt und mit 7 ml der Zellsuspension überschichtet.

Fixierung der Zellen

Der Zellrasen wurde vor dem Fixieren einmal mit serumfreiem Medium gespült. Danach wurden die Zellen in Aceton für 5 Minuten bei -20°C fixiert. Die fixierten Präparate wurden bei -20°C verwahrt.

Durchführung der Immunfluoreszenz

1. Die Objektträger wurden 2 x je 5 Minuten mit PBS (37°C) gespült.
2. Jeder Zellrasen wurde im Anschluß mit 50 µl FCS überschichtet zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert.
3. Inkubation mit dem primären Antikörper (**Verdünnung s. Tab. 4, S. 28**), der in 1 % BSA und 0.1 % Tween-20 in PBS verdünnt wurde, bei 37°C für 2 Stunden in einer feuchten Kammer.
4. Waschen mit PBS (37°C) 3 x für 5 Minuten.
5. Auftragen des sekundären Antikörpers (Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H + L); Jackson ImmunoRes. Labor.; Baltimore) in einer Konzentration von 70 µg/ml in 1 % BSA, 1 % Humanserum und 0.1 % Tween 20 in PBS. Inkubation für 1 Stunde bei 37°C im Dunkeln in einer feuchten Kammer.

6. Waschen mit PBS (37°C) 3 x für 5 Minuten in der Dunkelkammer.
7. Eindeckeln mit Mounting-Medium in der Dunkelkammer.

Tab. 4. Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenz an Zellen

Antikörper	Epitop Aminosäuren	Konzentration für Immunfluoreszenz (µg/ml)	Firma
p53 (Ab-2) , mono- klonal Maus IgG1κ	WT und MT 46-55	2.5	Oncogene Res. Prod.
α-Tubulin , mono- klonal, Maus IgG1a	nicht bestimmt	2	Oncogene Res. Prod.

Herstellung des Mounting-Mediums

In Modifikation der beschriebenen Rezeptur (Osborn and Weber, 1982) wurden zunächst 6 g Mowiol 4-88 (Hoechst; Frankfurt) in 15 ml kaltes (4°C), doppelt destilliertes Wasser eingebracht und unter kräftigem Rühren 30 ml 0.2 M Tris-Base-Lösung zugegeben. Nach exakter Einstellung des pH-Wertes auf 8.5 mit zunächst 37 % HCl, dann 2 N HCl wurde die Suspension über Nacht stehengelassen. Am folgenden Tag erfolgte ein vorsichtiges Erhitzen im Schüttelwasserbad auf 90°C. Die entstandene Lösung wurde 45 Minuten bei dieser Temperatur belassen. Nach langsamer Abkühlung auf etwa 50°C wurden 15 ml Glycerin (wasserfrei) vorsichtig eingerührt. Das so hergestellte Mounting-Medium wurde noch warm in Kryoröhrchen (Volumen: 3.6 ml; Nunc) portioniert und nach vollständiger Abkühlung bei -20°C gelagert.

Fotografische Auswertung

Nach vollständiger Aushärtung des auf den Objektträgern befindlichen Mounting-Mediums bei Raumtemperatur für mindestens 24 Stunden erfolgte die Fotodokumentation mit einem PMQ III RS Fotomikroskop (Zeiss; Oberkochen). Für die Fotografie wurden DIA-Farbfilm verwendet (Kodak EPH p1600 x; 1600 ASA; entwickelt für 1600 ASA; push III). Die Auflicht-Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Neofluar 40 Objektiv mit der Filterkombination 450/490 nm durchgeführt.

2.8 Apoptose-Nachweis mittels Fluoreszenz-Detektion von digoxigeninmarkierter genomischer DNA

Für den Nachweis apoptotischer Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurde der ApopTag®Plus in situ Apoptosis Detection Kit (Oncor) verwendet. Mit dieser Methode werden die durch DNA-Fragmentation während der Apoptose neu entstandenen 3'-OH-DNA-Enden (TUNEL assay) mit Hilfe der Fluoreszenz sichtbar gemacht. Dazu werden Digoxigenin-markierte-Nukleotide mit Hilfe des Enzyms terminale Deoxynukleotidyl-Transferase mit den freien 3'-OH-DNA-Enden der fragmentierten DNA verbunden. Der Anti-Digoxigenin Antikörper trägt einen Fluoreszein-Farbstoff, der mit Hilfe von UV-Licht sichtbar wird.

Die Objektträger wurden wie oben beschrieben vorbereitet. Die Zellen wurden unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen auf den Objektträgern in Quadriperm-Schalen kultiviert. Nach einmaligem Waschen mit serumfreiem Medium (37°C) wurden die Zellen in 1 % Paraformaldehyd für 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Zellen wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung verwahrt.

1. 2 x waschen in PBS bei Raumtemperatur für 3 Minuten
2. Die beschichtete Seite jedes Objektträgers wurde mit 75 µl des Äquilibriumspuffers versetzt. Die Objektträger wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur gelagert.
3. Inkubation der Objektträger mit jeweils 54 µl des TDT-Enzyms bei 37°C für 1 Stunde.
4. Beendigung der Reaktion durch 10-minütige Inkubation in Stop-Puffer.
5. 3 x waschen in PBS bei Raumtemperatur für 3 Minuten
6. Zugabe von jeweils 52 µl Anti-Digoxigenin-Fluoreszein/Blocking Reagenz für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Dunkelkammer.
7. 3 x waschen in PBS bei Raumtemperatur für 5 Minuten im Dunkeln
8. Eindeckeln der Objektträger mit Propidium Iodid/Antifade in einer Dunkelkammer. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.
9. Fotografische Auswertung im Fotomikroskop (PMQ III RS) mit der Filterkombination 450/490 nm.

2.9 DNA-Sequenzierung

DNA Extraktion

Die genomische DNA wurde mit Hilfe des NucleoSpin C&T/NucleoSpin Blood Kit (Machery-Nagel; Düren) extrahiert.

Vorbereitung: Puffer B2 wurde für 5 Minuten im Wasserbad (70°C) vorgewärmt. Danach wurden Puffer B2 und Puffer B1 im Verhältnis 1:4 gemischt. Zusätzlich wurde eine 1% Proteinase K-Lösung in H₂O hergestellt.

1. Zellen einer konfluenten 80 cm² Kulturflasche (25 mg Zellen) wurden durch Trypsinbehandlung vom Flaschenboden gelöst. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation für 1-2 Minuten bei 4°C und 1000 rpm pelletiert, in ein Reaktionsgefäß (1.5 ml) überführt und mit 180 µl Puffer T1 sowie mit 25 µl Proteinase K-Lösung bei 56°C für 2 Stunden lysiert. Das Lysat wurde alle 10-15 Minuten mit einem "Vortex" gemischt.
2. Danach wurden 200 µl Puffer B3 zugegeben. Das Lysat wurde bei 70°C für 10 Minuten inkubiert.
3. Zur Fällung der DNA wurden 210 µl Ethanol (70 %) zugegeben und der Extrakt sofort auf einem "Vortex" durchmischt.
4. Die Probe wurde auf eine NucleoSpin Säule übertragen und 1 Minute bei 6000 x g in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert; der Durchlauf wurde verworfen.
5. Die NucleoSpin Säule mit der Probe wurde daraufhin mit 500 µl Puffer B5 gewaschen. Es wurde erneut für 1 Minute bei 6000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Der Vorgang wurde 2 mal wiederholt.
6. Danach wurde die Säule erneut ohne Zugabe von Flüssigkeit zentrifugiert, um letzte Rückstände des Waschpuffers B 5 zu entfernen.
7. Zuletzt wurde die Säule auf ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und die DNA mit 100-200 µl vorgewärmten Puffer BE (70°C) durch Zentrifugation bei 6000 x g für eine Minute und Raumtemperatur eluiert.

Konzentrationsbestimmung der DNA

Die photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA erfolgte in einem UV-Spektrometer (Pharmacia; Freiburg). Gegen aqua bidest. als Referenz wurden Messungen in Quarzküvetten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm durchgeführt. Die Konzentration der DNA wurde wie folgt errechnet.

$$\text{DNA Konzentration [mg/ml]} = E_{260} \times V \times K$$

E ist die gemessene Extinktion, V die Verdünnung der DNA-Lösung und K eine empirisch ermittelte Konstante, die darauf beruht, daß bei der Schichtdicke von 10 mm eine OD₂₆₀ von 1.0 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (K=50) entspricht. Die Reinheit der DNA wurde durch die Messungen bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Die Reinheit der extrahierten Proben ist gegeben, wenn der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ in einem Bereich zwischen 1.8 und 2.0 liegt.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR bietet eine Möglichkeit; DNA-Fragmente in vitro zu amplifizieren. Bei dem zyklischen Prozess wird die Zahl spezifischer DNA-Abschnitte mit jedem Durchlauf exponentiell erhöht. Es werden hitzestabile DNA-Polymerasen verwendet, die einen DNA-Strang komplementär zu einem Matrizenstrang synthetisieren, wenn als Ausgangspunkt eine sogenannte Primer-DNA mit einem freien 3'-Ende vorliegt. Die Primer werden so ausgewählt, daß sie dem 5'- bzw. 3'-terminalen Ende der zu amplifizierenden ds-DNA entsprechen. Durch Erhitzen auf 95°C wird aus der ds-DNA Einzelstrang-DNA hergestellt. Während der darauffolgenden Abkühlung binden die synthetisch hergestellten Oligonukleotide (Primer für Sense und Antisense) definierter Länge und Basenzusammensetzung an die komplementären Abschnitte von den DNA-Strängen. Die DNA-Polymerase synthetisiert dann die komplementären DNA-Stränge durch den 3'-Anbau von Nukleotiden. Die Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) ermöglicht eine Automatisierung der Reaktion durch den Einsatz von sogenannten Thermocyclern.

Auf diese Weise wurden die Exons 5-8 des p53 Gens aus der genomischen DNA von MFM-223 Zellen im "PCR-Cycler" (Biometra; Göttingen) amplifiziert. Es wurde mit vier verschiedenen Primerpaaren gearbeitet. Die Primersequenzen sind in **Tab. 5** aufgeführt. Ein Teil der Primersequenzen stammte aus Vorräten von früheren Untersuchungen und war biotinyliert. Die Biotinylierung war für die durchgeführten Untersuchungen nicht mehr

notwendig. Die Primer wurden trotzdem eingesetzt, da die Reaktionen durch diese Markierung nicht beeinträchtigt wurden. Es wurden dreifache Ansätze hergestellt, um genug Ausgangsmaterial für die Sequenzierungs-Reaktionen zu erhalten.

Tab. 5. Amplifikationsprimer:

Exon	Richtung	Sequenz	Referenz
5	sense	5'- TTCCTCTTCCTGCAGTACTC -3'	Metzger et al., 1991
	antisense	5'-AGCTGCTCACCATCGCTA-3'	Löning et al., 1993
6	sense	5'-ACGACAGGGCTGGTTGGCCCA-3'	Kappes et al., 1994
	antisense	5'-CAAATAAGCAGCAGGAGAAAGC-3'	Kappes et al., 1994
7	sense	5'-TCTCCTAGGTTGGCTCTGACTG-3'	Kappes et al., 1994
	antisense	5'-GGTCAGAGGCAAGCAGAGGC-3'	Kappes et al., 1994
8	sense	5'-ATGGACAGGTAGGACCTGAT-3'	Kappes et al., 1994
	antisense	5'-CCGCTTCTTGCTCTGCTTGCTT-3'	Kappes et al., 1994

Ansatz der PCR

Die PCR wurde mit einem "Hot-Start"-Programm begonnen, um unspezifische Bindungen und Verlängerungen des zu amplifizierenden Fragments zu vermeiden. Dazu war es erforderlich, jeden Versuchsansatz in zwei Teilen anzusetzen. Der eine Teil des PCR-Gemisches im Reaktionsgefäß enthielt die Primer und die zu amplifizierende DNA. Zunächst wurde dieser Teil des PCR-Gemisches angesetzt und mit einem Wachskügelchen (Ampli-Wax[®]PCR Gem 50; PE Applied Biosystems; Langen) überschichtet. Dann wurde die zweite Hälfte des PCR-Gemisches daraufgegeben. In diesem Teil waren die dNTP's und die Taq-Polymerase enthalten. Das Ampli-Wax hat die Eigenschaft erst bei einer Temperatur von 80°C zu schmelzen, so daß Primer, DNA, Taq-Polymerase und dNTP's erst bei dieser hohen Temperatur gemischt wurden. Vor dem Reaktionsstart wurde so durch die räumliche Trennung der Einzelkomponenten verhindert, daß die Primer bei Temperaturen unter 80°C unspezifisch anlagern und unerwünschte DNA-Fragmente durch die Taq-Polymerase synthetisiert werden.

Teil 1:

10 x PCR-Reaktionspuffer J	5 μ l
Primer (sense und antisense)	jeweils 25 μ mol
DNA MFM-223	0.25 μ g
aqua bidest.	ad 25 μ l

Teil 2:

dNTP's	5 nmol
Taq-Polymerase	0.5 unit
aqua bidest.	ad 25 μ l (entspr. 1xPCR Puffer im Endansatz)

Parallel wurden Negativkontrollen (Ansätze ohne DNA) mitgeführt, um etwaige Kontaminationen mit Fremd-DNA zu detektieren.

10 x PCR-Reaktionspuffer J:	600 mM	Tris-HCl, pH 9.5
	20 mM	MgCl ₂
	150 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄

Temperaturprogramm für die PCR

Zunächst wurden die Proben bei 95°C für 5 Minuten erhitzt, um die DNA-Doppelstränge voneinander zu trennen. Danach begannen die Zyklen mit dem Denaturierungsschritt, 30 Sekunden bei 95°C. Durch langsames Abkühlen folgte die Anlagerung der Primer ("Annealing") ebenfalls für 30 Sekunden. Es bildet sich ein Hybrid jeweils zwischen einem Strang der Ziel-DNA und dem entsprechenden Primer. Dieser Schritt ist entscheidend, da jetzt festgelegt wird, ob das richtige Fragment amplifiziert wird. Als Richtwert für die optimale Anlagerungstemperatur wird die sogenannte "Wallace"-Temperatur [$2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})$] ausgerechnet. Die optimale Anlagerungstemperatur liegt etwa bei diesem Richtwert. Sie betrug für die jeweiligen Primerpaare (Exon 5/8) 55°C und (Exon 6/7) 60°C. Das DNA-Primer Hybrid dient als Ansatzpunkt für die Taq-Polymerase. Die Extension erfolgte für 60 Sekunden durch den Anbau von Desoxynukleosid-5'-monophosphaten (dNTP's als Vorstufen) bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase. Die Dauer der einzelnen Zyklen ist abhängig von Fragmentlänge und

-qualität. Die Anzahl der Zyklen kann mit hinreichender Genauigkeit des Syntheseprodukts bis zu 40/45 Zyklen variiert werden. In diesem Fall wurden 40 Zyklen gewählt. Mit jedem Zyklus wird die Reaktionsfolge wiederholt, dabei kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation beider Stränge des von den Primern flankierten DNA-Fragments. Nach dem Durchlauf der Zyklen fand die Abschlußextension bei 72°C für 7 Minuten statt. Unvollständig amplifizierte Fragmente sollen mit diesem Schritt vervollständigt werden. Die PCR-Produkte wurden bei 4°C über Nacht, bei -20°C für längere Zeiträume gelagert.

Aufreinigung der PCR-Produkte über Centricon

Mit dieser Methode werden die DNA-Fragmente aufkonzentriert und gleichzeitig von Primern, dNTP's und Salzen mittels Zentrifugation über eine Ultrafiltrationsmembran mit bestimmter Porengröße (≥ 125 bp) befreit. Es wurde das Centricon-100 System (Amicon; Witten) verwendet.

1. Das PCR-Produkt wurde auf die Säule pipettiert und 2 ml aqua bidest. zugegeben.
2. Es folgte die Zentrifugation im Festwinkelrotor für 10 Minuten bei 2900 rpm und 10°C in einer Centrikon H-401 (Kontron /Hermle; Eichingen bei München) Zentrifuge.
3. Das Filtrat wurde entfernt und anschließend wurde die Säule einmal mit 2 ml aqua bidest. gewaschen.
4. Es wurde für 20 Minuten bei 2900 rpm und 10°C zentrifugiert und das Filtrat verworfen.
5. Zur Elution der DNA wurde das Centricon-100 System gemäß der Anweisung umgesteckt
6. Es wurde ein letztes Mal bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, um die DNA in dem Auffanggefäß zu sammeln.
7. In einer Agarosegelelektrophorese (s.o.) wurden die Reinheit der Produkte und die verbliebene Menge der DNA nach der Centricon-Ultrafiltration überprüft.

Horizontale Agarosegelelektrophorese von DNA

Um die Qualität der PCR-Produkte zu prüfen, wurde jede Probe in einem Agarosegel aufgetrennt. Die Trennung erfolgt sowohl nach der Molekülgröße als auch nach elektrophoretischer Beweglichkeit. Dabei verringert sich je nach Porengröße die Beweglichkeit großer Moleküle relativ zu kleineren. Das Gel wird vollständig von der Pufferlösung umspült. Der pH-Wert gewährleistet, daß die DNA negativ geladen ist. Die Auftrennung erfolgt im Verlauf der Wanderung zur Anode.

Jedes Fragment wird im UV-Licht bei 366 nm auf Grund der Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar und zeigt gemäß seiner Größe im Agarosegel eine charakteristische Lauflänge. Als Längenstandard dienen hierbei Molekulargewichtsmarker, die DNA-Fragmente definierter Größe enthalten. Durch die Elektrophorese ist es möglich, die Reinheit des PCR-Produktes zu überprüfen. Es können unspezifische PCR-Fragmente detektiert werden. Verunreinigungen der PCR-Substanzen mit DNA können mit Hilfe der Negativkontrolle (H₂O an Stelle von Proben-DNA) erfaßt werden.

Herstellung des Agarosegels

Die Agarose wurde durch Kochen gelöst. Die Agaroselösung wurde in die dafür vorbereitete Flachbettkammer gegossen. Es wurde ein 50 ml- ("8 Slots") Gel angefertigt. Das Gel mußte für mindestens 30 Minuten erstarren.

Zusammensetzung des Gels:	3 % w/v	Agarose NuSieve (3:1)
	1 x v/v	Tris-Acetat-EDTA Puffer pH 7.8
	1.3 mM	Ethidiumbromid
Tris-Acetat-EDTA Puffer:	40 mM	Tris, pH 7.8
	2 mM	EDTA
	0.15 % v/v	Essigsäure

Vorbereitung der Proben

Nach Abkühlen der PCR-Proben auf Raumtemperatur wurden sie zunächst in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Auf diese Weise wurden die Proben von dem Ampli-Wachs getrennt. Danach wurden 10-15 µl Probe mit 1/10 v/v Probenpuffer gemischt. Der Probenpuffer verhindert durch seinen Glyceringehalt eine Vermischung der Proben mit dem Reservoirpuffer; Bromphenol-Blau (MG: 699) dient als Markierung für den Verlauf

der Wanderung im elektrischen Feld. Auf die gleiche Weise wurde der Molekulargewichtsmarker V (Boehringer Mannheim) behandelt.

Probenpuffer:	43 % v/v	Glycerin (100 %)
	10 mM	EDTA
	6 mM	Bromphenol-Blau (Sigma)

Durchführung der Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophorese wurde in einer Agarosegelelektrophoresekammer (BioRad) durchgeführt. Nach Erstarren des Gels wurde die Elektrophoreseapparatur mit Elektrodenpuffer ("Laufpuffer") gefüllt. Anschließend wurden die vorbereiteten Proben (10-15 μ l) in die "Slots" pipettiert, wobei jedes Gel einen Molekulargewichtsmarker enthielt. Die Proben sollten bei einer Spannung von 60 V zunächst für 10 Minuten langsam ins Gel einlaufen. Die eigentliche Elektrophorese erfolgte bei 80 V für 30 Minuten.

Elektrodenpuffer:	40 mM	Tris, pH 7.8
	2 mM	EDTA
	0.15 % v/v	Essigsäure

Sequenzierungsansatz mit dem Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)

Mit Hilfe dieses Kits werden Polynukleotide unterschiedlicher Länge hergestellt. Neben den normalen, im Überschuß enthaltenen Nukleotiden werden zu 1 % jeweils fluoreszenzmarkierte 2',3' Dideoxy-Nukleotide dem Reaktionsansatz zugefügt. Dabei trägt jedes der vier Nukleotide eine andere Fluoreszenzmarkierung. Wird eines der Dideoxy-Analoga anstelle eines normalen Nukleotids eingebaut, so wird das Kettenwachstum abrupt beendet, da keine 3'-OH Gruppe zur Anbindung des nächsten Nukleotids mehr vorhanden ist. Zunächst wurde für jede zu sequenzierende Probe ein "Premix" erstellt. Bestehend aus dem "Terminator Ready Reaction Mix", aus dem Reaktionskit und jeweils einem Primer (Sense oder Antisense des zu amplifizierenden Fragments), so daß einzelsträngige Fragmente im Überschuß entstanden. Es wurden 8 Ansätze jeweils mit den Primern (**Tab. 6**) vorbereitet. Als "Template" wurden die amplifizierten und aufgereinigten PCR Produkte verwendet.

Ansatz:	Terminator Ready Reaction Mix	8 µl
	PCR Produkt	90 ng
	Primer (sense oder antisense)	3.2 pmol
	aqua bidest.	ad 20 µl

Die Ansätze wurden mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um ein Verdunsten des PCR-Gemisches zu verhindern.

Tab. 6. Primer für die Sequenzierung:

Exon	Richtung	Sequenz	Referenz
5	sense	5'-TTCCTCTTCCTGCAGTACTC-3'	Metzger et al., 1991
	antsense	5'-AGCTGCTCACCATCGCTA-3'	Löning et al., 1993
6	sense	5'-ACGACAGGGCTGGTTGGCCCA-3'	Kappes et al., 1994
	antsense	5'-CAAATAAGCAGCAGGAGAAAGC-3'	Kappes et al., 1994
7	sense	5'-bio-AAAGGCCTCCCCTGCTTGCC-3'	Kappes et al., 1994
	antsense	5'-GGTCAGAGGCAAGCAGAGGC-3'	Kappes et al., 1994

8	sense	5'-ATGGACAGGTAGGACCTGAT-3'	Kappes et al., 1994
	antisense	5'-bio-GCAGTGCTAGGAAAGAGGCA-3'	Kappes et al., 1994

Isopropanol-Fällung der amplifizierten DNA für die Sequenzierungs-Reaktion

Zur Entfernung von überschüssigen Primern und nicht eingebauten dNTP's wurden die PCR-Produkte einer Isopropanol-Fällung unterzogen. Dazu wurde zunächst das PCR-Produkt (ca. 40 µl Volumen) in eines neues Reaktionsgefäß überführt. Dabei wurde darauf geachtet, daß möglichst kein Mineralöl mitgeführt wurde.

1. Es wurden 80 µl 75 %-iges Isopropanol zugegeben und die Proben auf einem "Vortex" gemischt.
2. Das PCR Produkt wurde bei Raumtemperatur für 15 Minuten gefällt.
3. Die Proben wurden daraufhin für 20 Minuten bei maximaler Umdrehungszahl in einer Tischzentrifuge zentrifugiert.
4. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat mit 250 µl 75 %-igen Isopropanol gewaschen.
5. Danach wurden die Proben erneut bei maximaler Umdrehungszahl für 5 Minuten zentrifugiert.
6. Der Überstand wurde verworfen und die Proben für 1 Minute bei 90°C in einem Heizblock getrocknet.

Sequenzierungsreaktion

Die aufgereinigten Proben wurden an ein Servicelabor (Dr. Buck; Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie; Süderfeldstr. 24) weitergegeben und mittels eines Fluoreszenz-Sequenzierungsgerätes Modell 373 A von PE Applied Biosystems ausgewertet. Die Proben wurden dort auf ein Sequenziergel aufgetragen. Im Sequenziergel werden die unterschiedlichen Fragmente, gemäß ihrer Länge, in einer einzigen Lauflinie elektrophoretisch getrennt. Sie weisen jeweils die Fluoreszenz auf, die für das am 3'-Ende eingebaute, modifizierte Nukleotid charakteristisch ist. Es entsteht so eine Serie von Banden, deren Fluoreszenz schrittweise der Basenfolge der sequenzierten Fragmente entspricht. Die Auswertung der Gele erfolgte computergesteuert.

3 Ergebnisse

3.1 Wachstum von Prostatakarzinomzellen

3.1.1 Wachstum nach Kultivation mit DHT oder CPA

In vitro etablierte Karzinomzelllinien sind weitgehend stabil. Die Sensitivität gegenüber Steroidhormonen kann sich jedoch während der Langzeit-Kultivation ändern, wie bereits früher an Zellen der humanen Mammakarzinomlinie EFM-19 gezeigt (Simon et al., 1984). Das Wachstum von ursprünglich androgensensitiven Zellen der Prostatakarzinomlinie LNCaP kann z.B. nach längerer Kultivation ohne Zugabe von DHT androgenunabhängig werden (Kokontis et al., 1998). Für die Untersuchung von androgeninduzierten Effekten ist daher die erneute Feststellung der DHT-Sensitivität unabdingbar. Von den untersuchten Prostatakarzinom-Zelllinien DU-145 und PC-3 ist bekannt, daß der Androgen-Rezeptor in Folge von Mutation bzw. Genverlust nicht mehr exprimiert wird (Tilley et al., 1990). Das Wachstum dieser Zellen wird daher weder positiv noch negativ durch eine Behandlung mit DHT oder Antiandrogenen beeinflusst (Averesch et al., 1997 a und b).

In den eigenen Untersuchungen wurde die Androgen-Sensitivität von LNCaP Zellen jeweils in multiplen parallelen Ansätzen unter verschiedenen Kulturbedingungen überprüft (**Abb. 10**). Nach Inkubation der Zellen in regulärem Wachstumsmedium mit 10 % Nativ-FCS ("FCS normal") ließ sich durch den Zusatz von 10^{-7} M DHT keine Änderung der Proliferation erzielen (**Abb. 10 A**). Offenbar ist in Anwesenheit von 10 % Nativ-FCS das maximale Zellwachstum erreicht, so daß keine weitere Steigerung durch DHT erfolgen kann. In diesen Ansätzen wurde nach der Anwachsphase von 2 Tagen eine Zellzahl von 1.3×10^3 pro cm^2 bestimmt (1x), und nach 10-tägiger Inkubation in Medium mit 10 % Nativ-FCS ergab sich eine Zellzahl von 5.2×10^4 cm^2 . Dies entspricht einem Zuwachs von 5.1×10^4 Zellen pro cm^2 oder einer Vermehrung um den Faktor 40 (40x). In 10 % Aktivkohle-behandeltem FCS ("FCS stripped") wurde dagegen nur ein Zuwachs um ca. 4×10^3 Zellen pro cm^2 während der experimentellen Inkubation erreicht; das entspricht lediglich einer Vermehrung um den Faktor 4. Das Wachstum der Zellen in Medium mit vorbehandeltem FCS war somit wesentlich geringer im Vergleich zu Zellen, die in Medium mit 10 % Nativ-FCS wuchsen. Offenbar wurde die Reduktion des Zellwachstums durch die weitgehende Entfernung von Wachstumsfaktoren und Hormonen während der Behandlung des Serums mit Aktivkohle erzielt. Demzufolge wurde nach Zusatz von DHT in Medium mit 10 % Aktivkohle behandeltem Serum eine Steigerung des Wachstums beobachtet, die auf die alleinige Wirkung von DHT zurückzuführen ist. Bei 10^{-7} M DHT

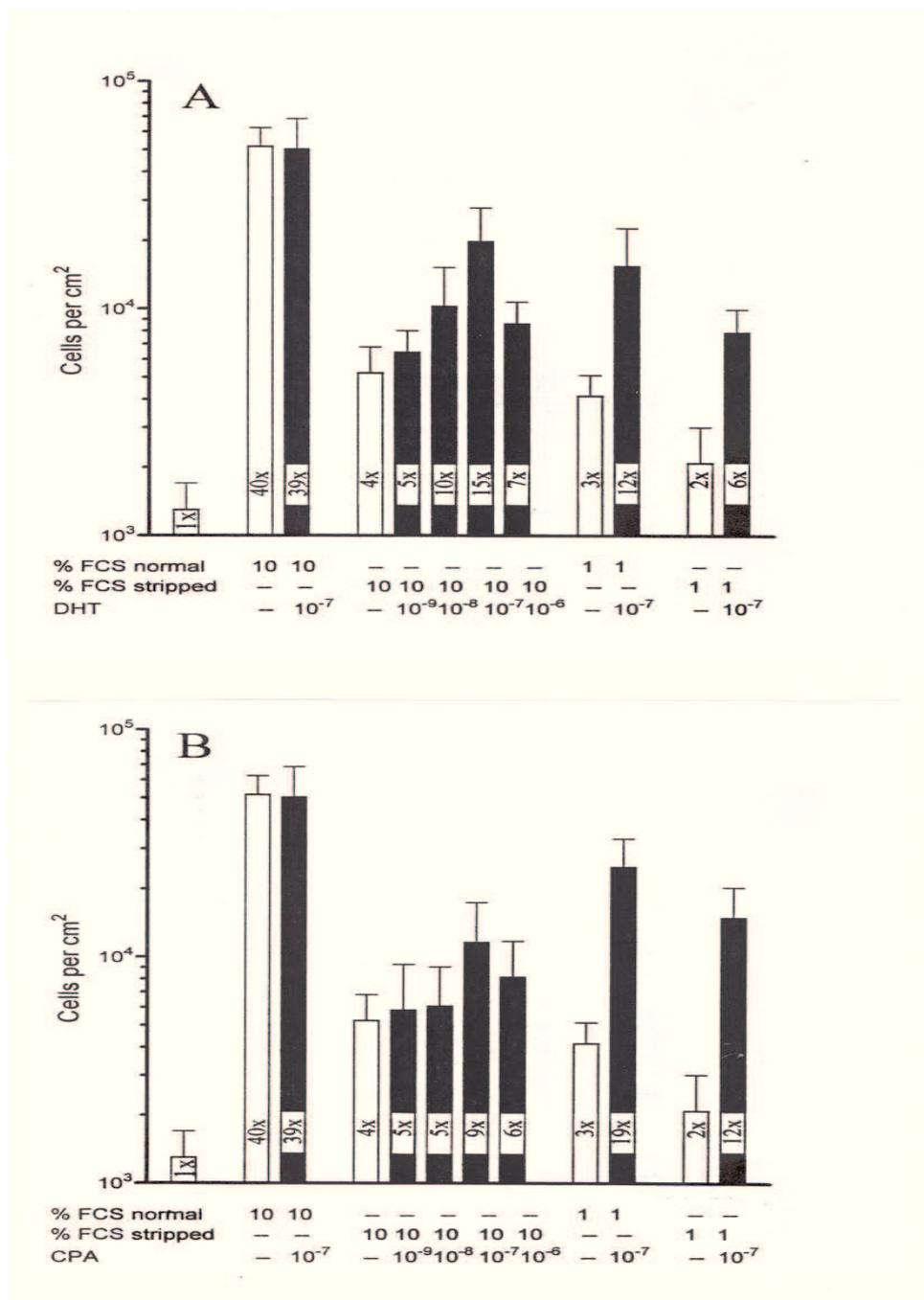


Abb. 10. Stimulierende Wirkung unterschiedlicher Molaritäten des Androgens DHT und des Antiandrogens CPA auf das Wachstum von LNCaP Prostatakarzinomzellen. Die Versuche wurden in Medium mit 1 % oder 10 % Nativ-FCS ("FCS normal") durchgeführt sowie in Medium, das Aktivkohle behandeltes FCS enthielt ("FCS stripped"). **(A)** proliferationssteigernder Effekt von DHT in Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS oder in Medium mit 1 % Nativ-FCS. **(B)** Stimulation des Zellwachstums durch CPA unter denselben Bedingungen wie in **(A)**. Keine Wirkung von DHT oder CPA in Medium mit 10 % Nativ-FCS. Die Zellzahlen nach der Anwuchsphase und in unbehandelten Kulturen sind durch offene Säulen markiert. Die Behandlungsdauer betrug 10 Tage nach der Anwuchsphase von 2 Tagen in Wachstumsmedium. Die Zellzahlen pro cm^2 wurden jeweils aus dreifach geführten Kulturen bestimmt (\pm SD). Der proliferative Effekt ist als Vielfaches der Zellzahl vor Beginn der Behandlung (1x) angegeben.

war der Stimulationseffekt maximal und entsprach einem Faktor von 15x bezogen auf die Ausgangszellzahl von 1.3×10^3 Zellen pro cm^2 . Kulturen in 1 % Nativ-FCS erreichten nach 10-tägiger Inkubation fast den gleichen Zuwachs (3x) wie unbehandelte Zellen in 10 % Aktivkohle behandeltem FCS (4x). Dagegen ließ sich durch 10^{-7} M DHT in Medium mit 1 % Nativ-FCS eine Wachstumsstimulation um den Faktor 12 im Vergleich zur Ausgangszellzahl erzielen. Erfolgte die Inkubation in 1 % Aktivkohle behandeltem FCS und 10^{-7} M DHT, zeigte sich nur eine Wachstumssteigerung um den Faktor 6 gegenüber der Ausgangszellzahl. Somit konnte nur in Medium mit Serumzusatz, das kein maximales Wachstum der Zellen zuläßt, die Androgen-Sensitivität von LNCaP Zellen eindeutig nachgewiesen werden, nicht dagegen in Medium mit 10 % Nativ-FCS.

In der gleichen Weise war das Wachstum von LNCaP Zellen durch das steroidale Antiandrogen CPA regulierbar (**Abb. 10 B**). In Medium mit 10 % Nativ-FCS war durch 10^{-7} M CPA kein proliferationssteigernder Effekt zu erzielen; in 10 % Nativ-FCS wurde offenbar das maximale Wachstum erreicht, das durch CPA nicht weiter zu steigern war, vergleichbar mit den Effekten nach Zusatz von DHT (**vergl. Abb. 10 A**). Nach Zugabe von 10^{-7} M CPA in Medium mit 10 % Aktivkohle behandeltem Serum wurde der maximale Stimulationseffekt mit dem Faktor 9 im Vergleich zum Ausgangswert bestimmt. In Medium mit 1% Nativ-FCS und 10^{-7} M CPA wurde eine Wachstumsstimulation um den Faktor 19 erzielt und damit in gleichem Maße wie bei Verwendung von 10^{-7} M DHT (**vergl. Abb. 10 A**). Offenbar wirkt das steroidale Antiandrogen CPA bei LNCaP Zellen ähnlich wachstumstimulierend wie DHT. Zur Erklärung für den proliferativen Effekt des CPA kann eine Mutation im Androgen-Rezeptorgen herangezogen werden (Veldscholte et al., 1990). Diese Mutation führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors in der hormonbindenden Domäne. Daher kann das steroidale Antiandrogen CPA gebunden werden, und möglicherweise am Rezeptorprotein in gleicher Weise aktivierende Strukturveränderungen wie bei der Bindung von DHT bewirken, durch die eine Transkription wachstumsstimulierender Gene ausgelöst wird.

Im Unterschied zu LNCaP Zellkulturen ließ sich bei den Prostatakarzinomzellen DU-145 und PC-3 in den eigenen Untersuchungen keine Änderung des Zellwachstums durch die Kultivierung mit DHT oder CPA erzielen (nicht gezeigt). Entsprechend ist aus der Literatur bekannt, daß sowohl DU-145 als auch PC-3 Zellen keine Androgen-Rezeptoren exprimieren, und somit nicht auf eine Behandlung mit Androgen oder Antiandrogen ansprechen.

3.1.2 Wachstum nach Behandlung mit CAS

Die Vermehrung des Zellwachstums ist an den gesteigerten Ablauf des Zellzyklus gekoppelt, der bei LNCaP Zellen offenbar sowohl durch DHT, als auch durch das steroidale Antiandrogen CPA induziert wird. Daher ergibt sich die Frage nach der Wirkung eines nicht-steroidalen Antiandrogens, das möglicherweise auch über rezeptorvermittelte Effekte den Zellzyklus beeinflussen kann. Zur Klärung dieser Frage wurde unter vergleichbaren Bedingungen wie in den vorherigen Experimenten der Einfluß des nicht-steroidalen Antiandrogens CAS auf die Proliferation von LNCaP Zellen überprüft (**Abb. 11**). Im Gegensatz zur Wirkung von DHT und dem steroidalen Antiandrogen CPA ließ sich das Wachstum von LNCaP Zellen durch CAS dosisabhängig reduzieren. Bei Anwesenheit von Medium mit 10 % Nativ-FCS war die Zellzahl von unbehandelten Kontrollkulturen in diesem Experiment während der 10-tägigen Inkubation um den Faktor 85 gestiegen (**Abb. 11 A**). Bei der geringsten verwendeten Konzentration von 10^{-9} M CAS wurde nach der 10-tägigen Kultivierung in 10 % Nativ-FCS nur eine Zellzahl/cm² von 6.1×10^5 pro cm² erreicht, entsprechend einem Zuwachs um den Faktor von 61 im Vergleich zur Ausgangszellzahl (1x). Mit 10^{-5} M CAS wurde der stärkste Hemmeffekt erzielt. Das Wachstum stieg unter dieser Behandlung nur um den Faktor 9. Damit war das Wachstum der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf fast 10 % reduziert.

Die Anwesenheit von 10 % Nativ-FCS führte zum maximalen Wachstum der LNCaP Zellen, das sich durch DHT oder CPA nicht weiter steigern ließ (**vergl. Abb. 10 A u. B, S. 41**). Ein Großteil der Serum-Wachstumsfaktoren ließ sich durch die Vorbehandlung des FCS entfernen, wie oben gezeigt wurde, und durch zusätzliche Reduzierung des FCS auf 1 % konnte die Wachstumsgeschwindigkeit weiter eingeschränkt werden. Dies wird deutlich durch die Reduktion der Zellvermehrung von 85x in Medium mit 10 % Nativ-FCS auf 12x in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem FCS (**Abb. 11 A und B**). Auch unter den reduzierten Wachstumsbedingungen ließ sich dosisabhängig ein hemmender Effekt von CAS nachweisen (**Abb. 11 B**). Demnach war eine wachstumshemmende Wirkung des nicht-steroidalen CAS sowohl unter optimalen Wachstumsbedingungen als auch bei suboptimaler Kultivierung festzustellen.

Ein Effekt von CAS auf das Zellwachstum von DU-145 und PC-3 Zellen konnte, wie erwartet, nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die nicht vorhandene Sensitivität für das Antiandrogen CAS kann auf die fehlenden Androgen-Rezeptoren bei den beiden Zelllinien zurückgeführt werden.

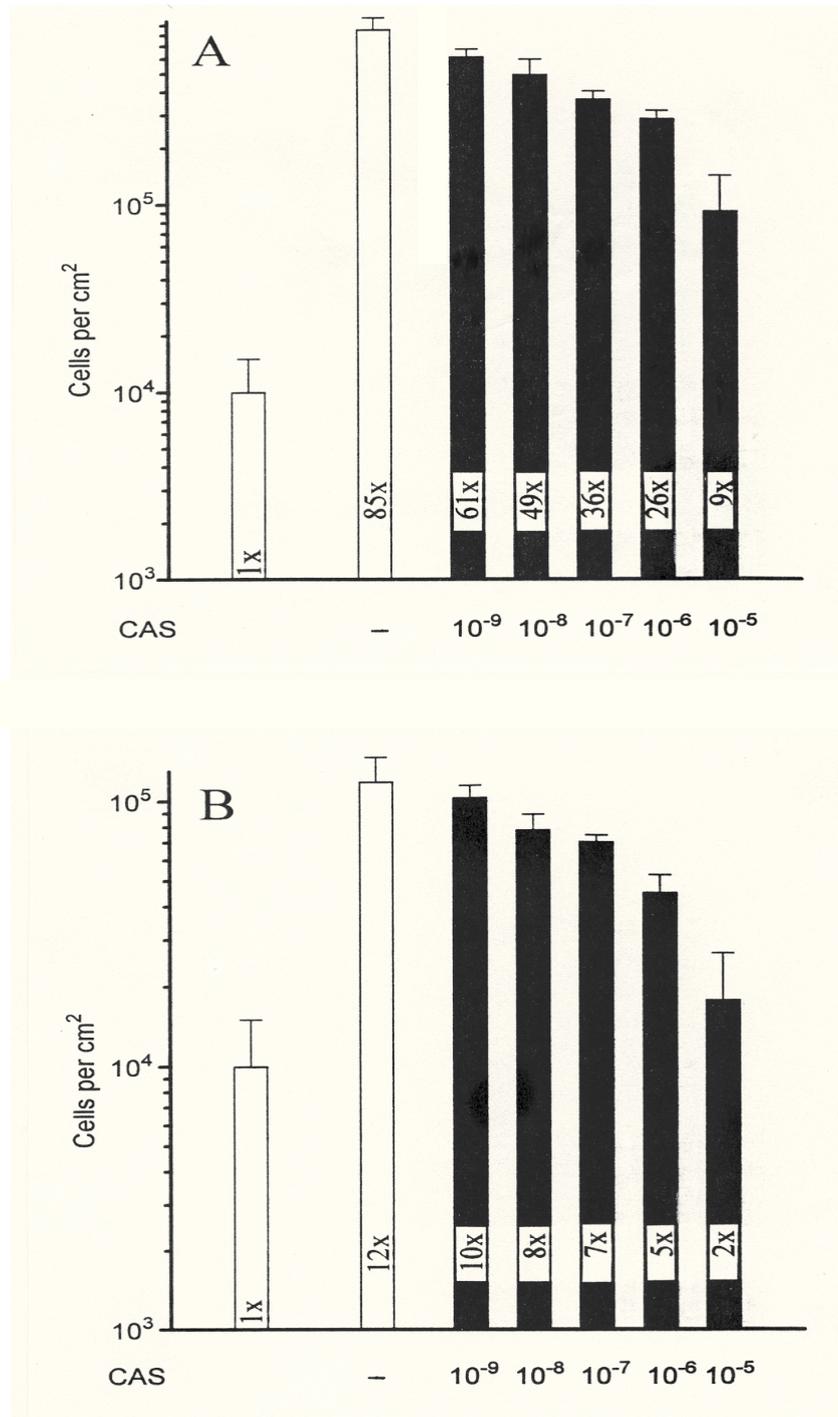


Abb. 11. Hemmung des Wachstums von LNCaP Zellen durch unterschiedliche Molaritäten von CAS in Medium mit 10 % Nativ-FCS (**A**) oder 1 % Aktivkohle behandeltem Serum (**B**). Die Zellkulturen wurden nach einer Anwachsphase von 2 Tagen für die Dauer von 10 Tagen in den angegebenen Konzentrationen mit CAS behandelt. Die Höhe der Säulen entspricht dem jeweiligem Mittelwert (\pm SD=standard deviation) aus drei parallel geführten Kulturen. Die gefüllten Säulen zeigen die Zellzahlen der behandelten Kulturen, die offenen Säulen repräsentieren das Wachstum der unbehandelten Kulturen im Vergleich zur Zellzahl vor Beginn der experimentellen Inkubation (1x).

3.1.3 Morphologie von LNCaP Zellen nach Variation der Wachstumsbedingungen

Im Unterschied zu den epitheloiden Zellen der Linien DU-145 und PC-3 besitzen LNCaP Zellen eine fibroblastoide Morphologie (**vergl. Abb. 6, S. 16**). Tumorzellen diesen Typs sind offenbar eher geneigt, ihre phänotypische Ausprägung zu ändern, als epitheloide Zellen. So lassen sich durch die Behandlung mit Glucocorticoid-Hormonen bei Kulturen von HH-16 cl.2/1 Fibrosarkomzellen der Ratte starke Veränderungen des zellulären Phänotyps erzeugen (Steffen et al., 1988). HH-16 cl.2/1 Zellen ändern ihren fibroblastoiden in einen epitheloiden Phänotyp, der nach Abbruch der Hormonbehandlung wieder in die ursprüngliche fibroblastoide Morphologie zurückfällt. In den eigenen Untersuchungen (**Abb. 12**) war bei LNCaP Zellen nach Behandlung mit DHT oder CPA keine Veränderung der fibroblastoiden Morphologie erkennbar (**Abb. 12 A und B**). Dagegen bildeten die Zellen, die mit CAS behandelt waren, nahezu doppelt so lange Ausläufer, und der Zelleib war schmaler (**Abb. 12 C**). Diese Änderung des zellulären Phänotyps ließ sich auch an den Zellen der Kontrollkulturen in 1 % Aktivkohle behandeltem Serum (**D**) und besser noch an Zellen in 0.1 % Nativ-FCS (**F**) beobachten. Im Wachstumsarrest durch Serum-Entzug sind die Ausläufer verlängert, und der Zelleib ist verkleinert. Die beobachtete Änderung der Morphologie ist somit an die reduzierten Wachstumsbedingungen gekoppelt, verursacht entweder durch CAS-vermittelte Wachstumshemmung oder durch zu geringe Menge von Wachstumsfaktoren und Hormonen. LNCaP Zellen, die in Aktivkohle behandeltem Serum, allerdings unter Zugabe der proliferationssteigernden Hormone DHT (**A**) oder CPA (**B**) kultiviert wurden, zeigen die reguläre Morphologie wie in Wachstumsmedium mit 10 % FCS (**E**). Die durch CAS bewirkte Änderung der Zellmorphologie in 1 % Aktivkohle behandeltem FCS (**G**) war reversibel nach weiterer Kultivation derselben Zellen in Medium mit 10 % Nativ-FCS ohne CAS (**H**).

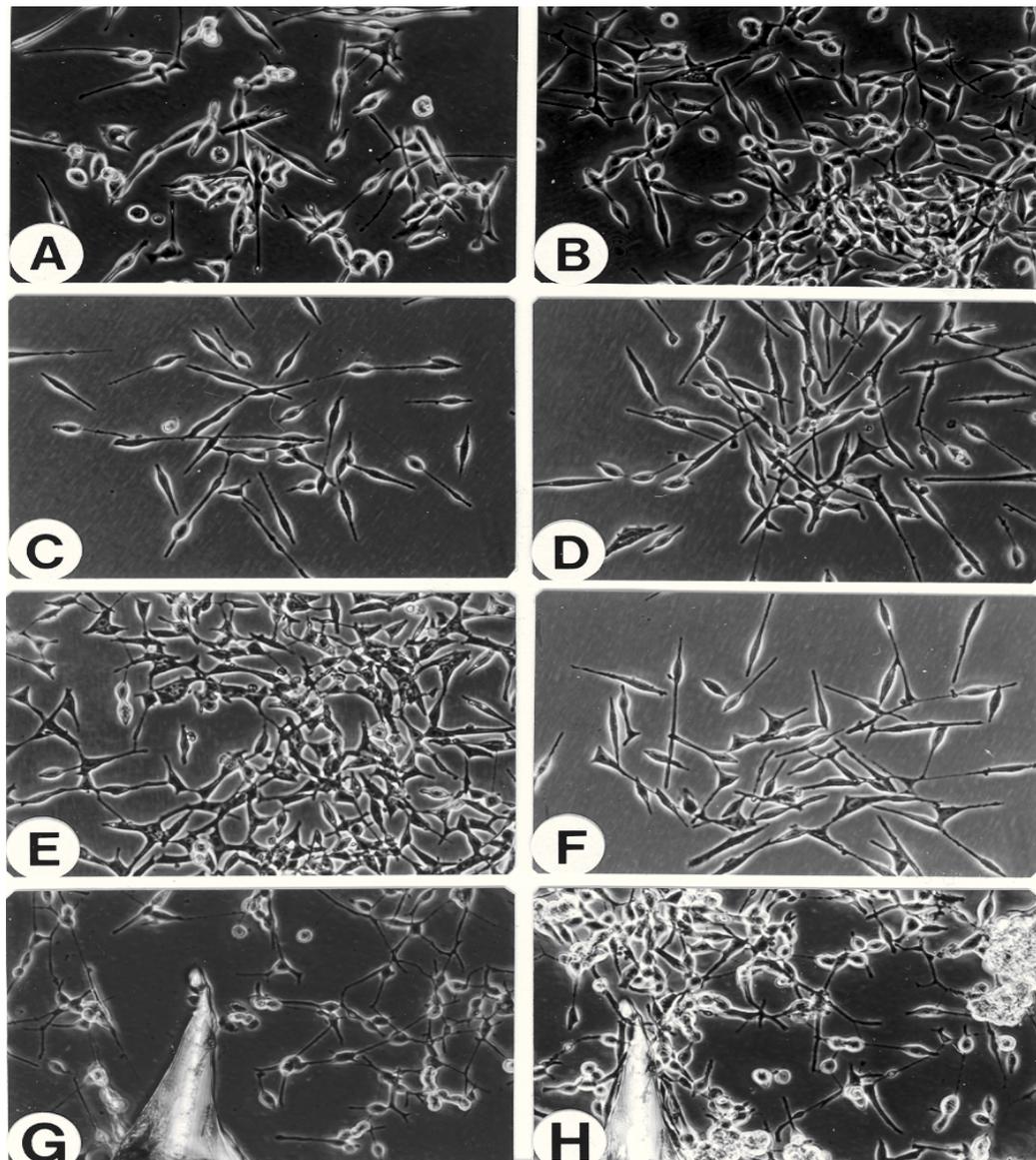


Abb. 12. Morphologie und Wachstum von LNCaP Zellen nach Behandlung mit 10^{-7} M DHT, CPA oder CAS in 1 % Aktivkohle behandeltem Serum. Keine morphologischen Veränderungen nach Wachstum in DHT (A) oder CPA (B). Spindelförmige Morphologie und auf ca. das Doppelte verlängerte Zellausläufer bei Wachstumshemmung durch CAS in 1 % Aktivkohle behandeltem Serum (C). Unbehandelte Kontrollzellen in 1 % Aktivkohle behandeltem Serum (D), nach Inkubation in regulärem Wachstumsmedium mit 10 % Nativ-FCS (E) sowie wachstumsarretierte Zellen in 0.1 % Nativ-FCS (F). Nach der Anwachsphase von 2 Tagen wurde jeweils das entsprechende Medium zugesetzt. Die Zellkulturen wurden nach 10 Tagen der experimentellen Inkubation fotografiert. Veränderte Morphologie bei Inkubation mit CAS (G), erneute Proliferation und Rückführung zur regulären Morphologie nach Weiterkultivation derselben Zellen des gleichen Bildausschnitts in Wachstumsmedium (10 % Nativ-FCS) für 7 Tage (H). Strichmarkierung in G und H. Phasenkontrast, 100x.

3.1.4 Konkurrenzexperimente

Das Wachstum von LNCaP Zellen war in den bisherigen Untersuchungen sowohl durch das Androgen DHT als auch durch das steroidale Antiandrogen CPA positiv zu beeinflussen (vergl. **Abb. 10 A und B, S. 41**). Das nicht-steroidale Antiandrogen CAS führte zur Reduktion des Zellwachstums sowohl in 10 % Nativ-FCS, als auch in 1 % Aktivkohle behandeltem FCS (vergl. **Abb. 11 A und B, S. 44**). Daher ergab sich die Frage, ob CAS die Androgen-Rezeptor vermittelte, proliferative Wirkung von DHT oder CPA aufheben kann.

In der Versuchsanordnung wurden die wachstumsstimulierenden Effekte von jeweils 10^{-7} M und 10^{-8} M DHT oder CPA mit steigenden Konzentrationen des proliferationshemmenden CAS kompetiert (**Abb. 13**). Die Versuche wurden im Zeitraum von 10 Tagen in Medium mit 1 % Aktivkohle-behandeltem Serum durchgeführt. Ohne DHT zeigten die Kontrollkulturen eine Vermehrung um den Faktor 3 bezogen auf die Ausgangszellzahl (**Abb. 13 A**). Im gleichen Medium mit 10^{-7} M DHT wurde das Zellwachstum auf das 29-fache des Ausgangswertes gesteigert (29x). Durch die gleichzeitige Anwesenheit von zunehmenden Konzentrationen CAS ließ sich die stimulierende Wirkung von 10^{-7} M DHT reduzieren bis zu einer Zellzahl von 6×10^4 pro cm^2 (6x) in Kulturen mit 10^{-5} M CAS, also bei einem 100-fachen Überschuß von CAS. Analog ließ sich die proliferationssteigernde Wirkung von 10^{-8} M DHT durch 10^{-6} M CAS bis zu einem Vermehrungsfaktor von 8x reduzieren. Der stärkste Konkurrenzeffekt wurde beim 1000-fachen Überschuß von CAS in der Kombination 10^{-8} M DHT und 10^{-5} M CAS erzielt. Diese Kulturen erreichten nur die 5-fache Zellzahl bezogen auf den Ausgangswert. Der Einsatz äquimolarer Mengen von DHT und CAS führte in jeweils 10^{-7} oder 10^{-8} M Konzentration gleichermaßen zu einer Reduzierung des Zellwachstums. LNCaP Kulturen mit jeweils 10^{-7} M DHT und 10^{-7} M CAS als Mediumzusatz erreichten einen Zellzuwachs um den Faktor 17 bezogen auf die Ausgangszellzahl. Im Vergleich mit den Kontrollkulturen, die unter alleinigem Zusatz von 10^{-7} M DHT wuchsen und eine 29-fache Steigerung des Wachstums erzielten, entspricht dies ungefähr einer Reduzierung des Wachstums auf fast die Hälfte durch den Zusatz von CAS. Somit dürfte etwa weniger als die Hälfte der Androgen-Rezeptoren bei äquimolaren Mengen beider Substanzen das nicht-steroidale Antiandrogen CAS binden und damit die Anheftung des wachstumsstimulierenden Androgens DHT reduzieren. Dies bedeutet eine etwas geringere Affinität von CAS als von DHT für die Bindung an den Androgen-Rezeptor.

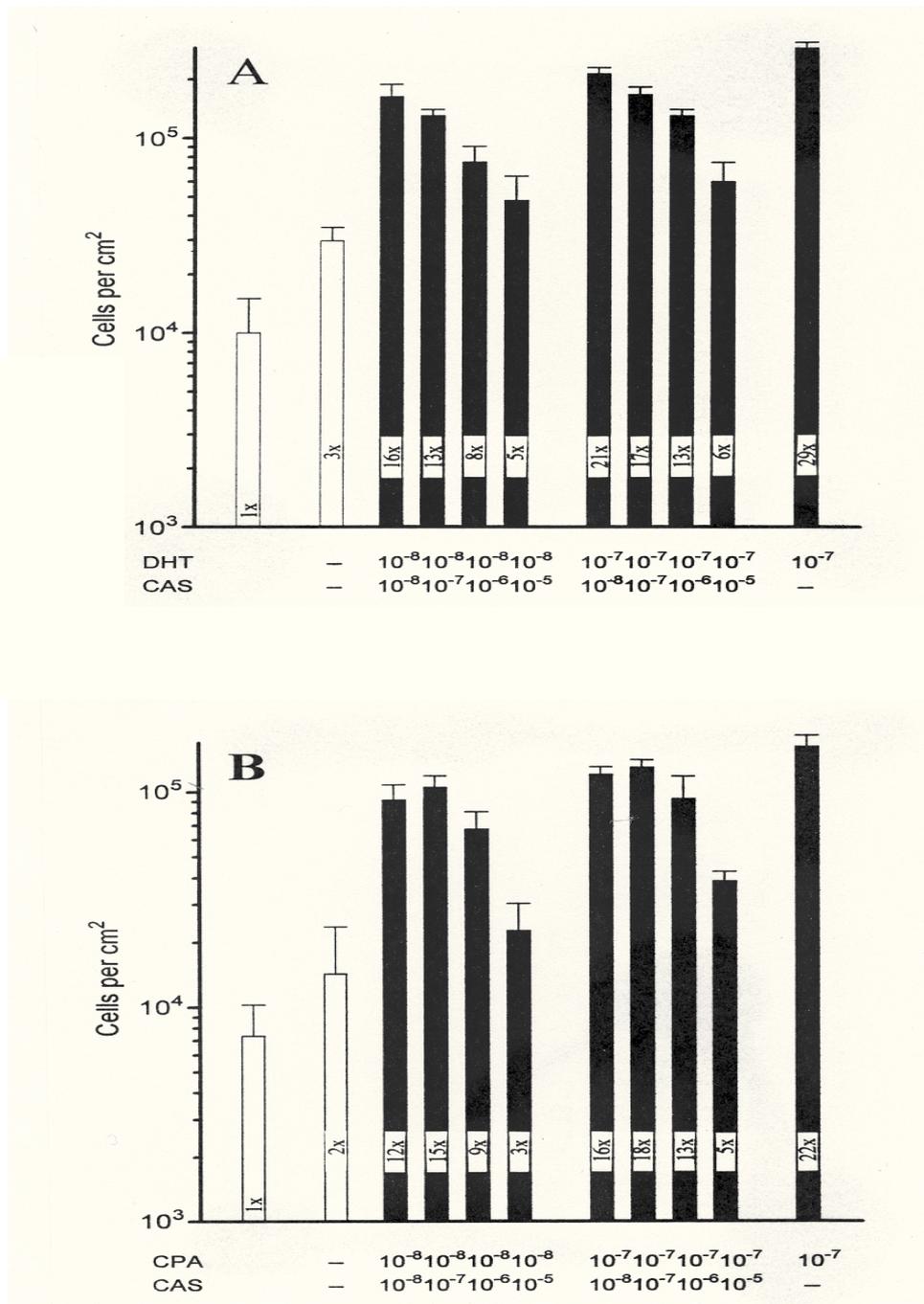


Abb. 13. Konkurrenzeffekte mit CAS bei Stimulation des LNCaP Zellwachstums durch DHT oder CPA. Es wurden Konzentrationen von jeweils 10^{-8} - 10^{-7} M DHT oder CPA mit 10^{-8} - 10^{-5} M CAS kombiniert. Die Behandlung der Zellen erfolgte nach der Anwachsphase von 2 Tagen. Die Versuche wurden in 1 % Aktivkohle behandeltem Serum ("FCS stripped") für die Dauer von 10 Tagen durchgeführt. **(A)** Verminderung des proliferationssteigernden Effektes von DHT in Abhängigkeit von der Konzentration des nicht-steroidalen Antiandrogens CAS. Bei 1000-fachem Überschuss von CAS wurde der größte Effekt erzielt. **(B)** Konzentrationsabhängige Reduktion der wachstumssteigernden Wirkung des Antiandrogens CPA durch CAS. Stärkster Effekt beim 1000-fachen Überschuss von CAS. Durch die Säulenhöhe angegeben ist jeweils der Mittelwert (\pm SD) aus drei parallel geführten Kulturen. Der proliferative Effekt ist als Vielfaches der Zellzahl vor Beginn der Behandlung angegeben (1x).

In vergleichbarer Weise wie bei der Verwendung von DHT ließ sich der stimulierende Effekt von CPA durch steigende Konzentrationen von CAS in Medium mit 1% Aktivkohle behandeltem Serum kompetieren (**Abb. 13 B**). Bei alleinigem Zusatz von 10^{-7} M CPA betrug der Zuwachs an Zellen im Versuchszeitraum von 10 Tagen 1.5×10^5 pro cm^2 . Das entspricht einem Faktor von 22x verglichen mit der Ausgangszellzahl von 7.3×10^3 pro cm^2 (1x). Die Kontrolle in 1 % Aktivkohle behandeltem Serum ohne Zusatz von CPA oder CAS erreichte im gleichen Zeitraum der Inkubation dagegen nur eine Zellzahl von 1.4×10^4 pro cm^2 (2x). Bei Anwesenheit von CAS in steigender Konzentration erfolgte dosisabhängig eine partielle Aufhebung des proliferativen Effektes von CPA. In 10^{-7} M CPA und bei gleichzeitiger Gabe von 10^{-5} M CAS, entsprechend einem 100-fachen Überschuß von CAS, erreichten die LNCaP Kulturen im Versuchszeitraum eine Zellzahl von 3.9×10^4 pro cm^2 (5x). In ähnlicher Weise ließ sich die proliferationssteigernde Wirkung von 10^{-8} M CPA dosisabhängig durch CAS kompetieren. Bei einem 100-fachen Überschuß von CAS (10^{-6} M) wurde eine Zellzahl von 6.7×10^4 pro cm^2 ermittelt (9x). Der stärkste Hemmeffekt wurde in 10^{-8} M CPA in einem 1000-fachen Überschuß bei 10^{-5} M CAS erzielt. In diesen Kulturen betrug die Zellvermehrung nur das 3-fache im Versuchszeitraum. Die Hemmung der Proliferation erfolgte bei Zusatz äquimolarer Mengen von CPA und CAS in deutlich geringerem Ausmaß als bei DHT. 10^{-7} M CPA und 10^{-7} M CAS bewirkten einen Zellzuwachs um den Faktor 18 bezogen auf die Ausgangszellzahl, während die alleinige Anwesenheit von 10^{-7} M CPA eine 22-fache Steigerung der Proliferation ergeben hatte. Dies spricht für einen geringeren Kompetitionseffekt des nicht-steroidalen Antiandrogens CAS auf die Bindung von CPA als bei Einsatz von DHT.

3.1.5 Wachstumskinetik

Im Unterschied zu den Zellen der Linie LNCaP war das Wachstum von DU-145 und PC-3 Zellen durch Androgene oder Antiandrogene nicht zu beeinflussen. Nach Kultivation in Aktivkohle behandeltem Serum war jedoch auch bei Zellen dieser beiden Linien eine deutliche, aber geringere Wachstumshemmung im Vergleich zur Verringerung der Proliferation bei LNCaP Zellen in Aktivkohle reduziertem Serum zu beobachten (Averesch et al. 1997 a und b). Bei länger dauernder Kultivation unter regulären Wachstumsbedingungen wuchsen Zellen der Linien DU-145 und PC-3 etwa doppelt so schnell wie LNCaP Zellen (**Abb. 14**). In den Kinetikexperimenten mit multiplen Parallelkulturen erreichten Zellen der Linien DU-145 und PC-3 bereits nach 7-tägiger

Inkubation unter regulären Wachstumsbedingungen in Medium mit 10 % Nativ-FCS die stationäre Wachstumsphase (**Abb. 14 A und C**). In der exponentiellen Wachstumsphase von DU-145 Zellen entsprach die Verdopplungszeit ca. einem Tag, zwischen Tag 3 und Tag 6 der Inkubation, während LNCaP Zellen in Anwesenheit von 10 % FCS weniger schnell proliferierten. Durch Dehnung der Abzisse in **Abb. 14 B** ergibt sich nur scheinbar ein ähnlicher Wachstumsverlauf wie in **Abb. 14 A und C**. Die Kulturen der drei Zelllinien erreichten eine maximale Dichte bei ca. 2×10^5 Zellen pro cm^2 . Die Verdopplungszeit wurde in dem Zeitraum bestimmt, in dem die Proliferation bei den drei geprüften Zelllinien nahezu linear verlief. In Medium mit reduzierter Serumkonzentration (0.1 % Nativ-FCS) wuchsen DU-145 und PC-3 Zellen in den Parallelkulturen deutlich langsamer im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle mit 10 % Nativ-FCS. Die Verdopplungszeit zwischen Tag 3 und 6 der Inkubation in 0.1 % Nativ-FCS betrug 1.6 oder 1.3 Tage bei DU-145 bzw. PC-3 Zellen. Restimulation des Zellwachstums wurde nach 4-tägiger Inkubation in Medium mit 0.1 % Nativ-FCS durch den Austausch gegen Medium mit 10 % Nativ-FCS erzielt. Die Verdopplungszeit verringerte sich daraufhin zwischen Tag 3 und 7 der Inkubation auf etwa einen Tag. Nach Aufhebung der Hemmung erreichten DU-145 und PC-3 Zellen somit wieder die Proliferationsgeschwindigkeit und die maximale Zelldichte der Kontrollkulturen in Medium mit 10 % Nativ-FCS.

LNCaP Zellen erreichten wegen der geringeren Proliferationsgeschwindigkeit erst nach 12-tägiger Inkubation in Medium mit 10 % Nativ-FCS die stationäre Wachstumsphase (**Abb. 14 B**). Zellen dieser Linie benötigten in 10 % FCS ca. 1.3 Tage zur Verdoppelung, gemessen von Tag 3 bis Tag 6 der Inkubation. Nach dem Wechsel zu Medium mit reduzierter Serumkonzentration (0.1 % Nativ-FCS) an Tag 1 der Gesamtinkubation, kam es zum kompletten Arrest des Wachstums. Die Zellzahl war stationär zwischen 2×10^3 und 4×10^3 Zellen pro cm^2 ; gemessen an der Zellzahl kam es jedoch nicht zum Absterben der LNCaP Kulturen. Nach 4-tägiger Inkubation in Medium mit 0.1 % FCS wurde durch die Zugabe von Medium mit 10 % Nativ-FCS das Wachstum in den Parallelkulturen wieder angeregt. Die Proliferationsgeschwindigkeit nach Restimulation durch den Serumwechsel betrug 1.1 Verdopplungen pro Tag, bestimmt zwischen Tag 5 und 8 der Inkubation. Dies entsprach etwa der Verdopplungszeit von 1.3 Tagen bei unbehandelten Kontrollzellen in Medium mit 10 % Nativ-FCS. Somit ließ sich die komplette Hemmung des Wachstums bei LNCaP Zellen durch Wiederherstellung der regulären Wachstumsbedingungen völlig aufheben.

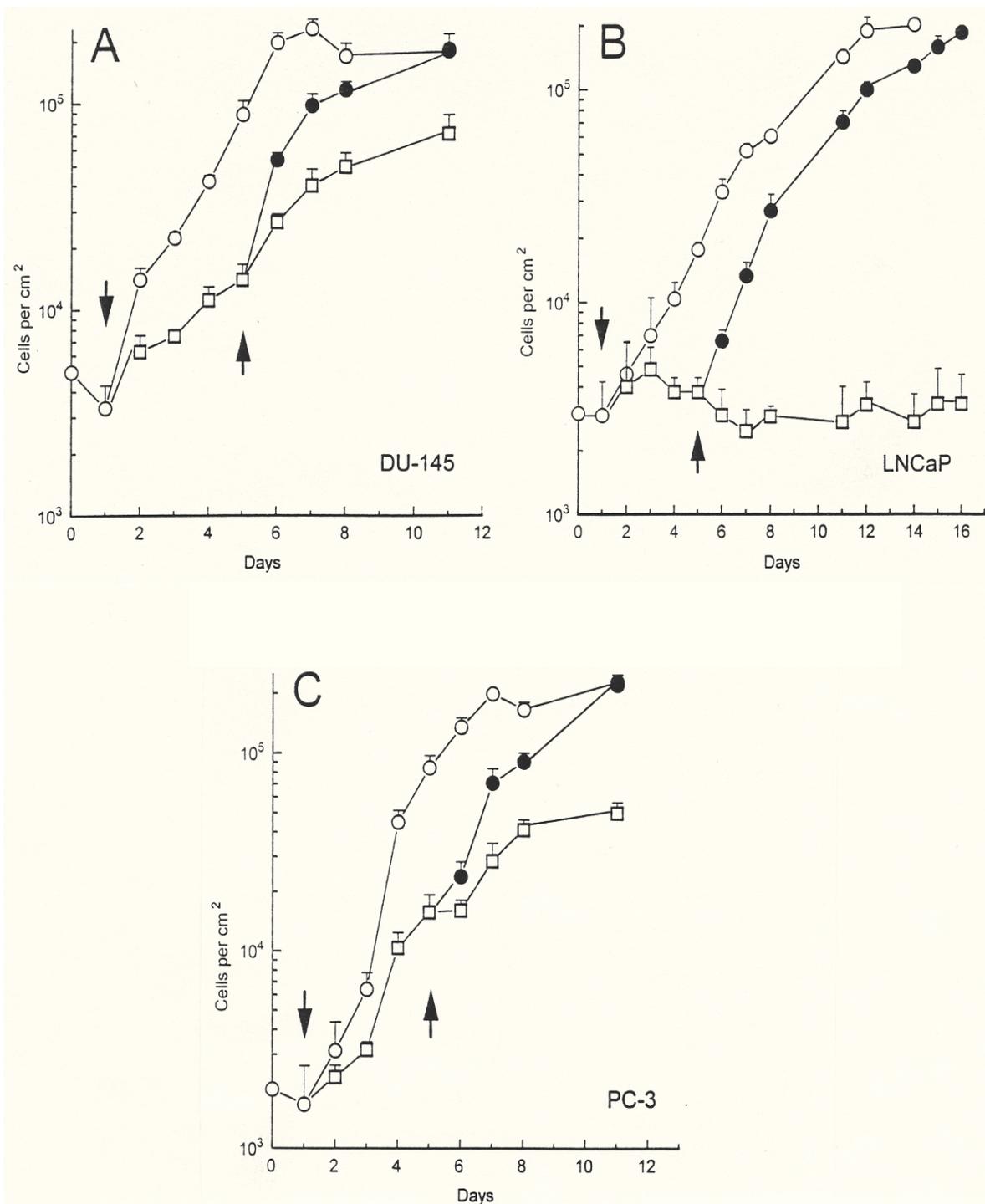


Abb. 14. Unterschiedliche Serumsensitivität der Wachstumskinetik von Zellen der Linien DU-145 (A), LNCaP (B) und PC-3 (C) in multiplen Parallelkulturen. Nach Ende der Anwachsphase (Zeitpunkt 0) und nach einem weiteren Tag in Kultur wurde die Konzentration des nativen FCS von 10 % (offene Kreise) auf 0.1 % reduziert (Pfeile abwärts; Vierecke). Restimulation des Zellwachstums erfolgte nach 4 weiteren Tagen durch erneute Zugabe von Medium mit 10 % FCS (Pfeile aufwärts; geschlossene Kreise). Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert (\pm SD) aus dreifach geführten Kulturen.

3.2 Analysen von p53

3.2.1 Immunzytochemie

Die Regulation des Zellwachstums und die Geschwindigkeit des Zellzyklus ist u.a. an die Menge des intrazellulär vorhandenen p53 gekoppelt. In normalen und proliferativ aktiven Zellen ist der p53 Gehalt kaum nachweisbar und steigt mit der Verzögerung des Zellwachstums (Levine, 1997). Dies gilt auch für Tumorzellen ohne p53 Mutation. Bei DU-145 Zellen liegt jedoch je eine Mutation in den Codons 223 und 274 von Exon 6 bzw. von Exon 8 des p53 Gens vor (**vergl. Tab. 2 auf S. 14**). Infolge dieser Mutationen akkumuliert p53 auf Grund der verlängerten Halbwertszeit im Zellkern (Carroll et al., 1993). Daher war p53 durch Immunfluoreszenz auch bei proliferierenden DU-145 Zellen deutlich nachweisbar (**Abb. 15**), nicht dagegen in LNCaP Zellen (nicht gezeigt). Die DU-145 Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Fixierung (Tag 7 der Inkubation bei

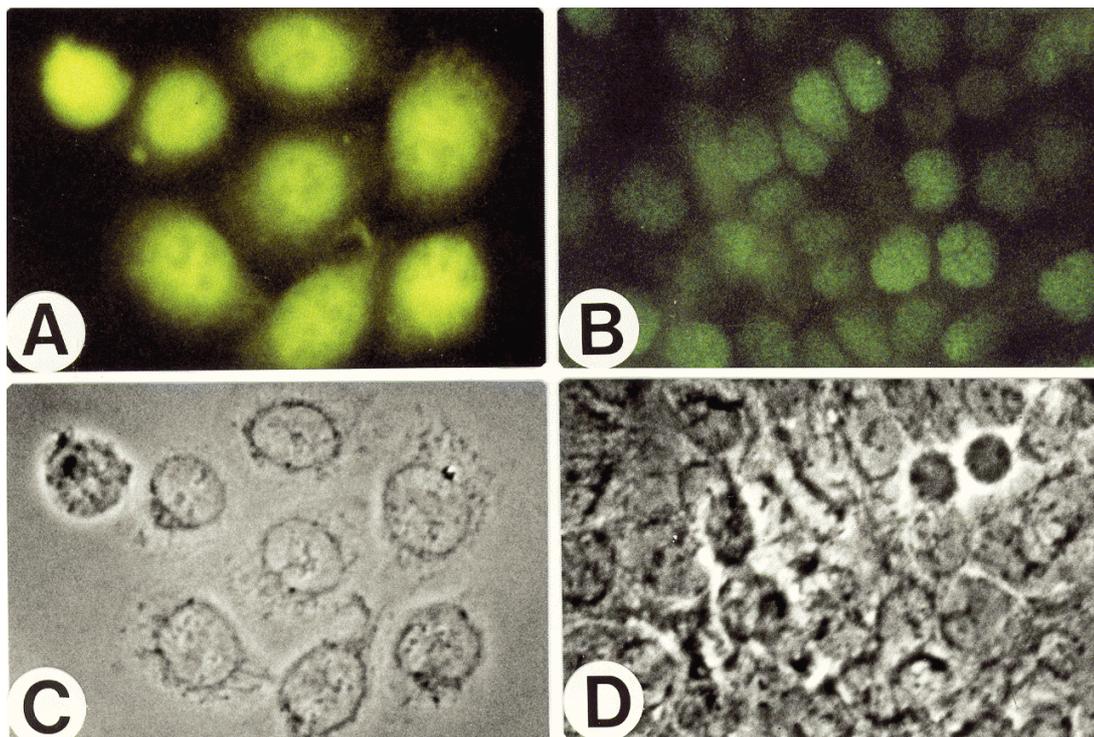


Abb. 15. p53 Immunfluoreszenz in DU-145 Zellen. Überhöhter Gehalt an p53 nach Kultivierung in Medium mit 0.1 % Nativ-FCS (**A**) gegenüber wachsenden Zellen in 10 % Nativ-FCS (**B**). Zur Kontrolle sind die entsprechenden Bildausschnitte im Phasenkontrast dargestellt (**C und D**). Nach der Anwachsphase von 2 Tagen wurde das Wachstumsmedium gegen das entsprechende Medium ausgetauscht. Am Ende der 7-tägigen Inkubation der parallelen Kulturen wurden die Zellen fixiert und die Immundetektion durchgeführt. 600x.

vergleichbarer Ausgangszellzahl) im Übergang zur stationären Wachstumsphase (**vergl. Abb. 14 A, S. 51**) und bildeten daher in Medium mit 10 % FCS einen dichten Zellrasen, in dem Zellen und Zellkerne in auffallender Weise verkleinert waren (**Abb. 15 D**). In der Immunfluoreszenz war der p53 Gehalt nach Kultivierung in Wachstumsmedium (10 % Nativ-FCS) deutlich sichtbar (**Abb. 15 B**), jedoch wesentlich geringer als bei Kulturen nach reduziertem Wachstum in 0.1 % FCS (**Abb. 15 A**). In Wachstumsmedium mit 10 % FCS wurde in DU-145 Zellen fast ausschließlich eine nukleäre Anfärbung des p53 Proteins, mit Ausnahme von zwei gerade in der Teilung befindlichen Zellen, beobachtet (**Abb. 15 B und D**). Dagegen war p53 nach Wachstum unter reduzierter Serumkonzentration enorm vermehrt und zum größten Teil nukleär, aber auch zytoplasmatisch lokalisiert.

3.2.2 Western-Blot Analysen

3.2.2.1 p53 Gehalt nach Entzug von Wachstumsfaktoren

Durch Western-Blot Analysen ließ sich das Verhältnis der p53 Akkumulation zum Wachstumszustand der DU-145 Zellen bestätigen (**Abb. 16**). Im Vergleich zum p53 Gehalt der Kontrollkulturen nach Kultivierung in 10 % FCS, war die p53 Akkumulation nochmals gesteigert, wenn das Wachstum der Zellen durch Reduzierung der Serumkonzentration vermindert war. Die Hemmung der Proliferation von DU-145 Zellen in 0.1 % Nativ-FCS war am 7. Tag der Inkubation deutlich ausgeprägt (**vergl. Abb. 14 A, S. 51**) und erklärt somit die bei Wachstumshemmung extrem gesteigerte Menge von p53 in der Immunzytochemie (**vergl. Abb. 15 A, S. 52**) und in späteren Blots. Demnach wurde der p53 Gehalt durch die Reduktion der Serum-Wachstumsfaktoren hochreguliert und könnte zur Proliferationshemmung führen, obwohl das Gen in der "Core Domäne" von beiden Allelen mutiert ist. Nach Zufuhr von FCS am 4. Tag der experimentellen Inkubation war durch den Austausch des Mediums mit 0.1 % Nativ-FCS gegen Medium mit 10 % Nativ-FCS eine geringere p53 Menge in DU-145 Zellen zu beobachten als in Anwesenheit von 0.1 % FCS (**Abb. 16; Spuren 1-3**). Der p53 Gehalt war bei restimulierten DU-145 Zellen am Ende des exponentiellen Wachstums jedoch deutlich höher im Vergleich zu den Kontrollzellen in 10 % Nativ-FCS und ähnlichem Wachstumszustand. Der erhöhte Gehalt an p53 ist möglicherweise durch eine verlängerte Halbwertszeit von p53 in den restimulierten DU-145 Zellen erklärbar. Wildtyp p53 hat eine Halbwertszeit von wenigen Stunden, während sich die Halbwertszeit des mutierten Proteins auf mehrere Tage verlängern kann (Berchuck und Bast, 1993).

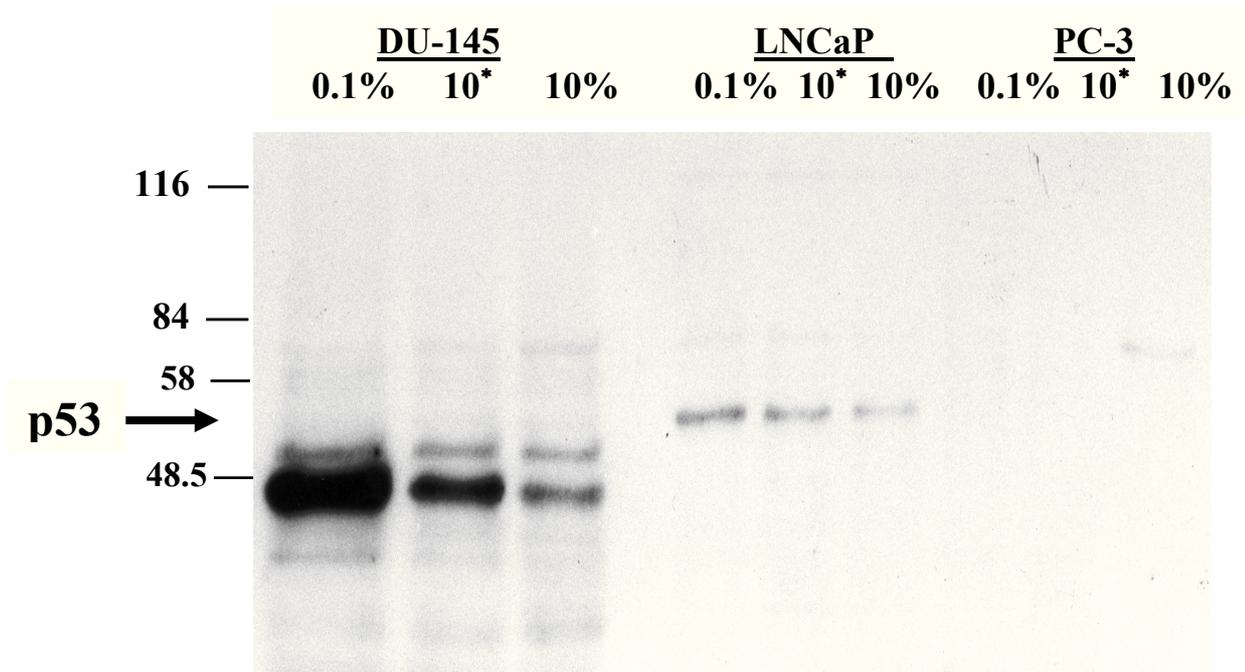


Abb. 16. Detektion von p53 und p53-ähnlichen Proteinen durch Western-Blot Analysen an Zellextrakten der Linien DU-145 und LNCaP nach Kultivierung in 0.1 % Nativ-FCS, bei Restimulation mit 10 % FCS für 4 Tage nach der vorhergehenden 4-tägigen Behandlung mit 0.1 % FCS (10*) oder in Wachstumsmedium (10 % Nativ-FCS). Zellen der Linien DU-145 und PC-3 wurden 6 Tage unter diesen Bedingungen inkubiert. LNCaP Zellen wurden für 10 Tage behandelt (**vergl. 14 A-C, S. 51**). Erhöhter p53 Gehalt bei 0.1 % Serum in den Zellen der Linien DU-145 und LNCaP. Keine Expression von p53 in PC-3 Zellen. Es wurden jeweils 40 µg Gesamtprotein aufgetragen. Das relative Molekulargewicht von p53 liegt bei 53 kD. Der schwarze Pfeil markiert das Signal für wt-p53. Bei p53 aus DU-145 Zellen ergaben sich Signale unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit und apparentem Molekulargewicht; davon war das Protein der Größe ca. 50 kD stärker vertreten und regulierbar durch die Reduktion von FCS auf 0.1 %.

In grundsätzlich ähnlicher Weise (**Abb. 16; Spuren 4-6**), wenn auch auf niedrigerem Niveau verhielt sich der p53 Gehalt in LNCaP Zellen in Abhängigkeit vom Wachstumszustand (**Abb. 16**). Das Protein dieser Zellen wurde auf Grund der in 10 % FCS vergleichsweise langsamen Proliferationsgeschwindigkeit am 10. Tag der Inkubation geerntet. Die Zellen befanden sich damit noch in der exponentiellen Wachstumsphase, etwas anders als beim Experiment mit DU-145 Zellen (**vergl. Abb. 14 B, S. 51**). Die nachweisbare Menge von p53 war gering in LNCaP Zellen, die in Medium mit 10 % Nativ-FCS proliferierten, im Vergleich zu wachsenden DU-145 Zellen mit mutiertem p53. LNCaP Zellen tragen eine stille Mutation in einem p53 Allel. Das verbleibende Allel entspricht dem Wildtyp. Die Zellen exprimierten folglich wt-p53. Daher war der p53

Gehalt unter regulären Wachstumsbedingungen sehr gering. Nach Arretierung des Wachstums durch Serumentzug war der p53 Gehalt vermehrt und erhöhte sich etwa um das Doppelte gegenüber der Kontrolle mit 10 % Nativ-FCS als Mediumzusatz. Im Vergleich dazu war die Restimulation des Zellwachstums durch den Zusatz von 10 % Nativ-FCS nach vorheriger Inkubation in 0.1 % Nativ-FCS (**vergl. Abb. 14 B, S. 51**) mit einem geringeren p53 Gehalt gekoppelt als bei Wachstumsarrest. Dieser entsprach fast der Menge von p53 unter regulären Wachstumsbedingungen in Medium mit 10 % Nativ-FCS und ist ein deutlicher Hinweis, daß der Turnover von p53 in LNCaP Zellen nahezu ungestört verlief.

In PC-3 Zellextrakten war erwartungsgemäß kein p53 detektierbar. Wie in der Einleitung beschrieben, wird p53, bedingt durch den Verlust eines Allels und durch Mutation im verbleibenden Allel, in diesen Zellen nicht exprimiert. Dennoch wird das Wachstum von PC-3 Zellen durch Serum-Reduktion deutlich verlangsamt. Dies bedeutet, daß die Wachstumshemmung offenbar nicht durch p53 gesteuert ist, sondern daß dafür andere Regulationsmechanismen verantwortlich sein müssen.

Bei DU-145 Zellen mit mutiertem p53 bewirkte der Entzug von Serum eine verstärkte Akkumulation von p53 und eine Retardierung der Proliferation. Das Wachstum war jedoch bei DU-145 Zellen in 0.1 % FCS nur verlangsamt, während bei LNCaP Zellen mit intaktem p53 eine vollständige Hemmung der Proliferation zu beobachten war. Die Retardierung des Wachstums bei DU-145 Zellen entsprach der Proliferationshemmung von PC-3 Zellen, die kein p53 exprimierten. In DU-145 Zellen liegen die Mutationen im p53 Gen in der Region, die für die DNA-bindende Domäne des Proteins kodiert. Daher sollte in DU-145 Zellen die Induktion anderer wachstumsregulierender Gene, wie z.B. WAF-1 (p21), durch p53 nicht möglich sein. Entsprechend dürfte in PC-3 Zellen ohne p53 Expression keine Regulation dieser Proteine erfolgen. Somit muß die Expression anderer wachstumsretardierender Proteine die partielle Hemmung der Proliferation von DU-145 und PC-3 Zellen nach Serumentzug bewirkt haben, da p53 als regulierender Faktor nicht in Frage kommt.

3.2.2.2 p53 Gehalt nach Behandlung mit DHT, CPA oder CAS

Auf Grund der oben gezeigten Verknüpfung der p53 Akkumulation mit der Wachstumsretardierung durch Serumentzug wurde das Wachstum durch hormonelle Faktoren manipuliert. Danach wurde intrazelluläres p53 bei DU-145 und LNCaP Zellkulturen, die mit Androgenen oder Antiandrogenen als Mediumzusatz wuchsen, in Western-Blot Analysen bestimmt (**Abb. 17**). Wie zuvor gezeigt, war der Entzug von Serum-Wachstumsfaktoren mit einer Hochregulierung des p53 Gehalts (**vergl. Abb. 15 und 16, S. 52 bzw. 54**) und einer Hemmung des Zellwachstums bei DU-145 und LNCaP Zellen (**vergl. Abb. 14 A und B, S. 51**) assoziiert. Eine partielle Wachstumshemmung von LNCaP Zellen konnte durch Inkubation mit dem nicht-steroidalen Antiandrogen CAS erzielt werden (**vergl. Abb. 11 A und B, S. 44**). In Anwesenheit des Androgens DHT oder

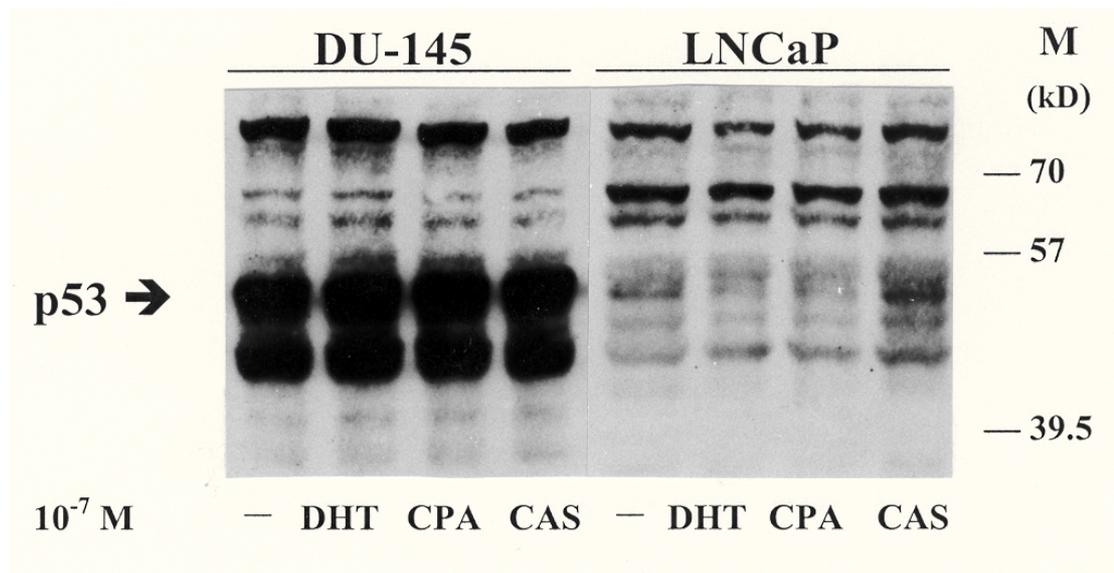


Abb. 17. Keine sichtbare Änderung der Konzentration von p53-ähnlichen in DU-145 Zellen nach Inkubation für 5 Tage mit 10^{-7} M DHT, CPA oder CAS im Vergleich zur Kontrolle in 1 % Aktivkohle behandeltem FCS. Erhöhter p53 Gehalt in LNCaP Zellen nach 10-tägiger Inkubation und Wachstumshemmung durch 10^{-7} M CAS. Reduzierte Menge an p53 unter der wachstumssteigernden Wirkung von DHT oder CPA im Vergleich zur Inkubation in 1 % FCS. Aufgetragen wurden jeweils 80 μ g Gesamtprotein.

des Antiandrogens CPA wurde die Proliferation dieser Zellen angeregt (**vergl. Abb. 10 A und B, S. 41**). Auf Grund der fehlenden Androgen-Rezeptoren war das Wachstum von DU-145 und PC-3 Zellen jedoch durch den Zusatz von Androgen oder Antiandrogenen

nicht zu beeinflussen (Averesch et., al. 1997 a und b). Dementsprechend war bei DU-145 Zellen im Western-Blot keine Änderung des p53 Gehalts zu sehen (**Abb. 17**). Dies entspricht dem unveränderten Wachstum von DU-145 Zellen nach Zusatz von DHT oder Antiandrogen im Vergleich zur Kontrolle ohne Hormonzusatz und ist durch den fehlenden Androgen-Rezeptor zu erklären. In DU-145 Zellextrakten wurden, wie bereits in **Abb. 16, S. 54** gezeigt, zwei starke Signale im Bereich und unterhalb des p53 Signals detektiert. Die Signale sind aus unbekanntem Gründen vergleichbar stark und den unterschiedlich starken Signalen in **Abb. 16** nicht angepaßt. Es sei daraufhin gewiesen, daß zwischen der Durchführung der beiden Experimente ein Zeitraum von ca. 1 Jahr verstrichen war, indem sich die Eigenschaften der DU-145 Zellen geändert haben könnten. Die Pfeil-Markierung entspricht p53, da bei LNCaP Zellen auf dieser Höhe eine Regulation der p53 Menge entsprechend dem Wachstumszustand festzustellen ist. Durch den Zusatz von CAS zeigte sich bei LNCaP Zellen in der Western-Blot Analyse ein stärkeres p53 Signal als in der Kontrolle. Dies entspricht der Hemmung des Wachstums von LNCaP Zellen durch CAS. Nach Zusatz des proliferationssteigernden Androgens DHT oder des Antiandrogens CPA war hingegen deutlich weniger p53 nachzuweisen als bei unbehandelten LNCaP Zellen in 1 % Aktivkohle behandeltem FCS. In Zellextrakten der Linie PC-3 wurde wie erwartet kein p53 detektiert (nicht gezeigt). Die in **Abb. 17** dargestellten Ergebnisse ließen, ebenso wie in der zuvor gezeigten Analyse (**vergl. Abb. 16, S. 54**) mehrere Signale für p53 sowie für andere Proteine mit unterschiedlicher Laufgeschwindigkeit und Intensität erkennen. Die Mehrzahl der detektierten Banden, die vom verwendeten Antikörper (anti-p53; Ab-2, Oncogene) erkannt wurden, waren nicht durch die Manipulation des Zellwachstums verändert und sind somit als unspezifisch anzusehen. Lediglich die p53 Bande in LNCaP Extrakten zeigte Veränderungen der Intensität in den verschiedenen, durch die endokrinen Faktoren beeinflussten Wachstumszuständen. Ausführung und Dauer der Zellinkubation entsprachen den schon vorgestellten Wachstumsexperimenten (**vergl. Abb. 10 B u. Abb. 11 B, S. 41 bzw. 44**). Vor jeder Immundetektion wurden die transferierten Proteine auf der Membran mit Hilfe der Ponceau-Färbung sichtbar gemacht. Auf diese Weise wurde geprüft, ob die Proteine gleichmäßig aufgetragen und transferiert wurden. Ebenso wurde sichergestellt, daß in jeder Spur des Western-Blots die gleiche Menge Protein enthalten war.

Zur Überprüfung der entgegengesetzten Wirkung der Antiandrogene CPA und CAS in LNCaP Zellen wurden die verwendeten Wirkstoffkonzentrationen im Bereich von 10^{-6} - 10^{-9} M variiert (**Abb. 18**). Der p53 Gehalt war nach Kultivation in Medium mit 10^{-7} M CPA bzw in 10 % FCS sehr gering, entsprechend den vorherigen Wachstumsstudien, in denen 10^{-7} M CPA oder 10 % FCS jeweils maximal stimulierende Effekte hatten (**vergl. Abb. 10 B, S. 41**). In geringerem Maße stimulierte Proliferation hatte sich bei LNCaP Zellen gezeigt, die mit 10^{-6} , 10^{-8} oder 10^{-9} M CPA inkubiert waren. Dies entspricht somit dem p53 Gehalt der Zellen. Dagegen nahm der p53 Gehalt in LNCaP Zellen, die mit wachstumshemmenden Konzentrationen von 10^{-6} - 10^{-9} M CAS behandelt wurden, kontinuierlich zu. Nach Zusatz von 10^{-6} M CAS war die größte p53 Menge nachzuweisen. Damit übereinstimmend, hatte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der

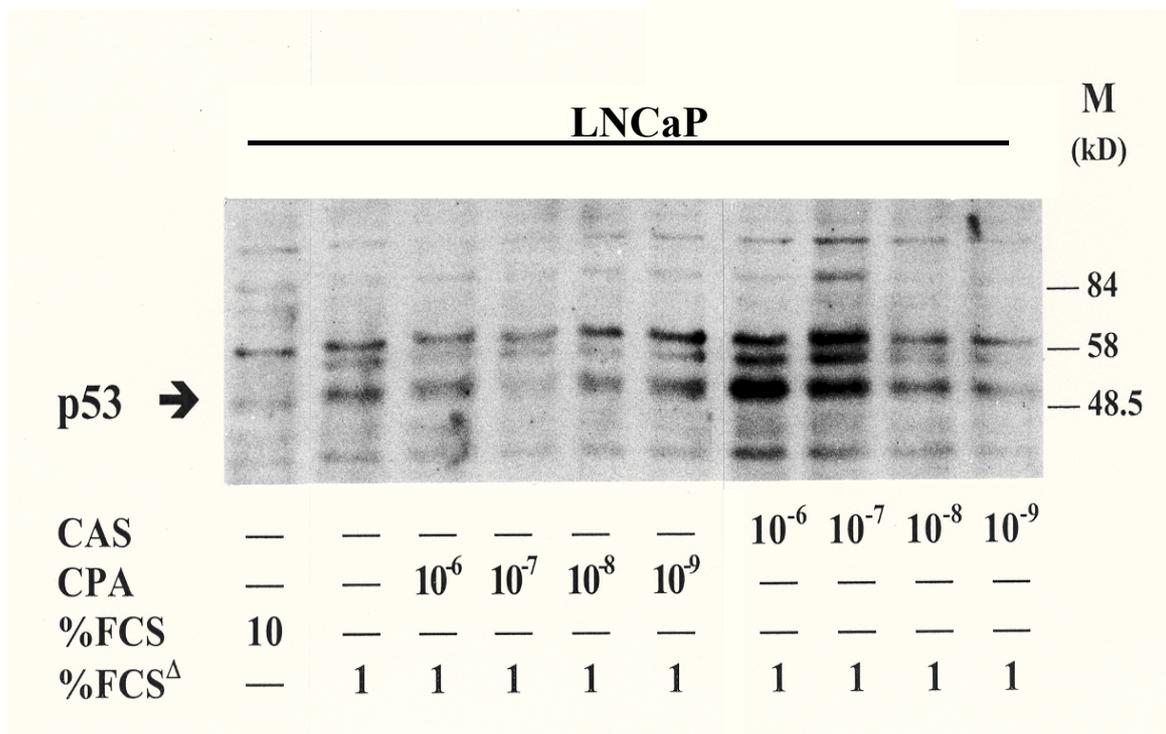


Abb. 18. Steigerung des p53 Gehalts in LNCaP Zellen nach Behandlung mit absteigender Konzentration von CPA sowie minimale Menge an p53 bei der am stärksten das Wachstum fördernden Konzentration von 10^{-7} M CPA (**vergl. Abb. 10 B, S. 41**). Verringerung des p53 Spiegels bei Abnahme der Proliferationshemmung durch CAS (**vergl. Abb. 11 B, S. 44**). In 10^{-6} M CAS bei 1 % FCS war die Wachstumshemmung deutlich stärker als in 1 % FCS im Vergleich zur Inkubation in 10 % FCS. Dementsprechend ist der p53 Gehalt in 10^{-6} M CAS und 1 % FCS am höchsten reguliert. Die Zellen wurden mit den angegebenen Wirkstoff-Konzentrationen in 1 % Aktivkohle behandeltem Serum (% FCS^Δ) für 10 Tage inkubiert. Es wurden 80 µg Gesamtprotein eingesetzt. Die Position von p53 ist durch den waagerechten Pfeil markiert.

Proliferation dieser Zellen im Bereich von 10^{-9} - 10^{-5} M CAS, sowohl in 10 % FCS, als auch in 1 % FCS gezeigt (**vergl. Abb. 11 A und B, S. 44**). Im Gegensatz zum Antiandrogen CPA konnte demnach beim Hemmstoff CAS weder für die Wachstumshemmung noch für die p53 Akkumulation ein maximaler Effekt im Dosisbereich von 10^{-6} - 10^{-9} M gezeigt werden. In 10^{-6} M CAS war p53 am stärksten vermehrt, im Vergleich zur Kontrolle in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem FCS ohne Hormonzusatz, obwohl die Wachstumshemmung durch 10^{-6} M CAS in 1 % FCS weniger als 50 % der entsprechenden Kontrolle betrug. Serumentzug von 10 % auf 1 % führte zum kompletten Arrest des Wachstums (**vergl. Abb. 14 B, S. 51**). Damit bewirkte CAS anscheinend in weit höherem Maß eine Vermehrung von p53 als der Wachstumshemmung durch CAS entsprechend, während bereits die moderate Erhöhung von p53 bei LNCaP Zellen in 1 % FCS den völligen Stillstand des Wachstums bewirken konnte. Offenbar addierte sich jedoch der Effekt von 10^{-6} M CAS mit der wachstumshemmenden Wirkung von 1 % FCS, so daß eine vermehrte Akkumulation von p53 entstehen konnte. Zur verbesserten Detektion von p53 wurde die doppelte Menge 80 µg Protein eingesetzt. Möglicherweise wurden aus diesem Grund vermehrt unspezifisch markierte Proteine detektiert.

3.3 Wachstum von MFM-223 Mammakarzinomzellen

Zum Vergleich für die Wirkung von Androgenen und Antiandrogenen bei den Prostatakarzinom-Zelllinien DU-145, LNCaP und PC-3 wurde die Mammakarzinom-Zelllinie MFM-223 herangezogen. MFM-223 Zellen sind androgensensitiv, indem ihr Wachstum durch DHT gehemmt und durch das Antiandrogen CPA stimuliert werden kann (Hackenberg et al., 1990). Dies steht im Gegensatz zur Stimulation der Proliferation von LNCaP Prostata-Tumorzellen durch DHT, während das Antiandrogen CPA das Wachstum der Zellen beider Linien stimuliert. Die Sensitivität gegenüber Wachstumsfaktoren und Hormonen kann sich während der Langzeit-Kultivation verändern. Aus diesem Grund wurde der Einfluß von Androgenen, Östrogenen und Antiandrogenen auf das Wachstum von MFM-223 Zellen überprüft. Außerdem wurde der Effekt des nicht-steroidalen Antiandrogens CAS auf die Proliferation von MFM-223 Zellen untersucht, da hierüber bisher noch keine Beobachtungen vorliegen.

In multiplen und parallelen Versuchsansätzen wurde die Proliferation von MFM-223 Zellen aus derselben Kulturflasche bei unterschiedlichen hormonellen Bedingungen verglichen (**Abb. 19**). In den eigenen Untersuchungen ließ sich in Medium mit 10 % Nativ-FCS und DHT, der in früheren Untersuchungen beschriebene, hemmende Effekt des Androgens auf das Wachstum von MFM-223 Zellen bestätigen (**Abb. 19 A**). Naturgemäß ist eine hemmende Wirkung besser nachweisbar, wenn die Zellen unter optimalen Bedingungen wachsen. Daher wurden diese Ansätze in 10 % Nativ-FCS mit steigenden Konzentrationen von DHT inkubiert. Die Proliferation der Zellen war im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollkulturen nach 7-tägiger Inkubation konzentrationsabhängig durch DHT gehemmt. Bei der geringsten verwendeten Konzentration von 10^{-11} M DHT in 10 % Nativ-FCS erreichten die Kulturen nur einen Zellzuwachs um den Faktor 11, die unbehandelten Kontrollkulturen erzielten dagegen einen Zuwachs um den Faktor 15 im Vergleich zur Ausgangszellzahl (1x). Der stärkste Hemmeffekt wurde mit der Konzentration von 10^{-8} M DHT erzielt. Die Zellzahl stieg unter diesen Kulturbedingungen nur um den Faktor 5; im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war die Proliferation somit auf ungefähr 30 % reduziert.

In weiteren Ansätzen wurde geprüft, ob die hemmende Wirkung von DHT durch E_2 aufgehoben wird (**19 B**). Dieser Wachstumsversuch wurde in Medium mit 10 % Serum durchgeführt, dessen Wachstumsfaktoren durch Aktivkohle-Behandlung entfernt waren.

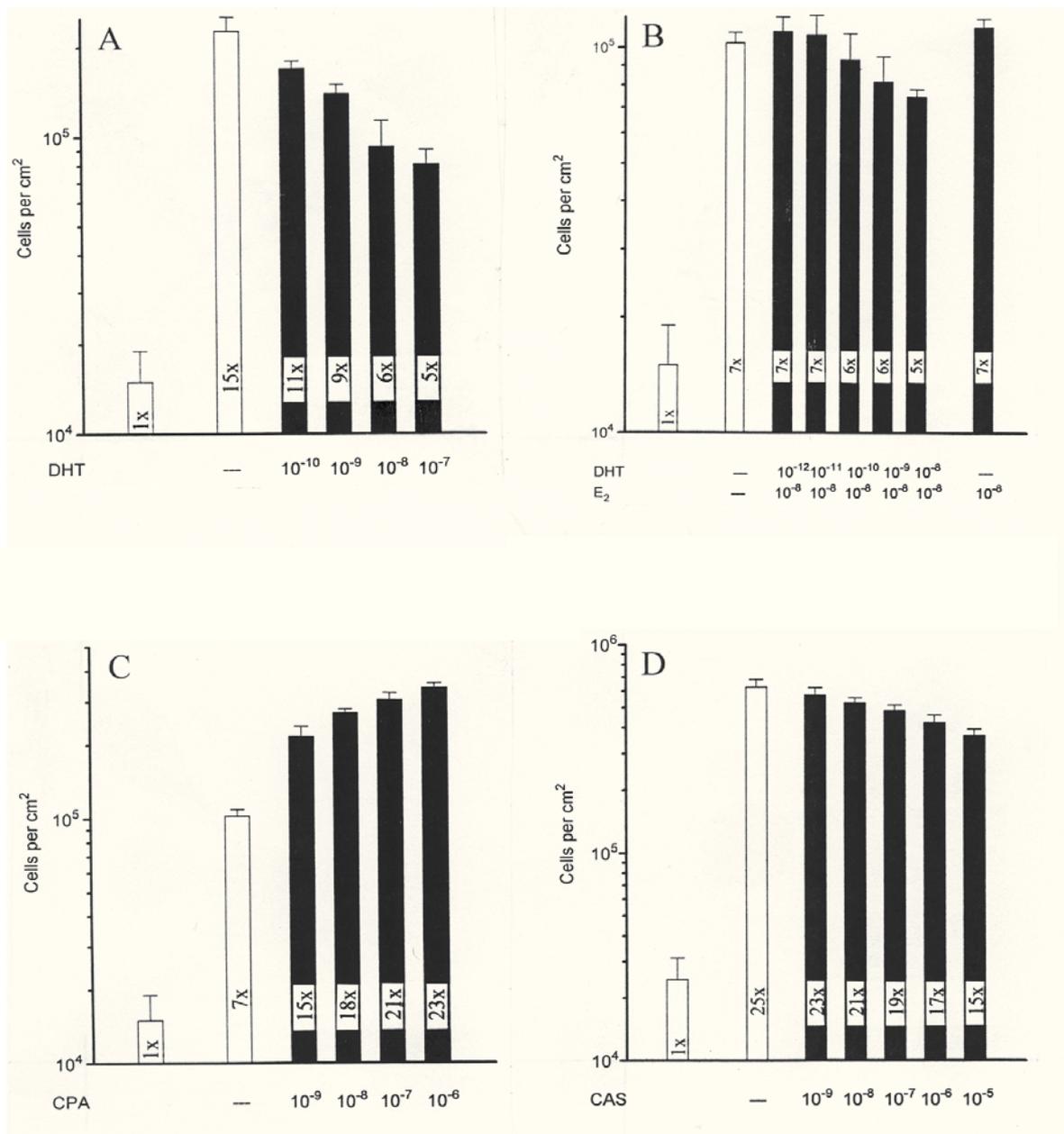


Abb. 19. Unterschiedliche Effekte von DHT, E₂ und Antiandrogenen auf das Wachstum von MFM-223 Zellen. **(A)** Wachstumshemmung durch DHT in Medium mit 10 % Nativ-FCS. **(B)** Keine Stimulation des Wachstums durch 10⁻⁸ M E₂ und wachstumshemmender Effekt von 10⁻¹⁰ -10⁻⁸ M DHT in Medium mit 10⁻⁸ M E₂ und 1 % Aktivkohle behandeltem FCS. **(C)** Steigerung der Proliferation durch CPA in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem FCS. **(D)** Antiproliferativer Effekt von CAS in Medium mit 10 % Nativ-FCS. Die Zellkulturen wurden nach einer Anwachsphase von 2 Tagen für die Dauer von 7 Tagen in den angegebenen Konzentrationen mit den genannten Wirkstoffen behandelt. Die Höhe der Säulen entspricht dem jeweiligem Mittelwert (± SD) aus drei parallel geführten Kulturen. Die gefüllten Säulen zeigen die Zellzahlen der behandelten Kulturen, die offenen Säulen repräsentieren das Wachstum der unbehandelten Kulturen im Vergleich zur Zellzahl vor Beginn der experimentellen Inkubation (1x).

So war die Überlagerung eines eventuell stimulierenden oder hemmenden Effektes auf die Proliferation von MFM-223 Zellen durch niedermolekulare Wachstumsfaktoren des Serums nicht möglich. Bei alleinigem Zusatz von 10^{-8} M E_2 in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem Serum betrug der Zuwachs an MFM-223 Zellen 1.1×10^5 pro cm^2 im Versuchszeitraum von 7 Tagen. Das entspricht einem Faktor von 7, verglichen mit der Ausgangszellzahl von 1.5×10^4 pro cm^2 (1x). Die Kontrolle ohne Zusatz von E_2 erreichte im gleichen Zeitraum der Inkubation eine Zellzahl von 1×10^5 pro cm^2 . Dies entspricht ebenfalls einem Zuwachs um den Faktor 7, verglichen mit der Ausgangszellzahl. E_2 hat somit auf das Wachstum von MFM-223 Zellen keinen Einfluß. Gleichzeitig wurde in parallelen Versuchsansätzen die Wirkung der Kombination von DHT mit E_2 auf das Zellwachstum geprüft. Nach Zusatz von DHT und gleichzeitiger Gabe von 10^{-8} M E_2 war im geprüften Konzentrationsbereich kein kompetitiver Effekt von E_2 auf die Wachstumshemmung durch DHT zu erzielen. Bei alleiniger Gabe von DHT traten in diesem Konzentrationsbereich vergleichbare Hemmeffekte auf (**vergl. Teil A der Abb. 19**). Somit ist die DHT Wirkung als unabhängig vom gleichzeitig eingesetzten E_2 anzusehen. Die fehlende Wirkung von E_2 auf das Wachstum von MFM-223 Zellen kann durch die geringe Menge an Östrogen-Rezeptoren (8 fmol/mg Protein), im Vergleich zur 20-fach größeren Menge an Androgen-Rezeptoren (160 fmol/mg Protein), erklärt werden (Hackenberg et al., 1990).

Zur Bestätigung der früheren Beobachtungen über die proliferationsstimulierende Wirkung des Antiandrogens CPA auf das Wachstum von MFM-223 Zellen (Hackenberg et al., 1990) wurden die Zellen in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem Serum und verschiedenen Konzentrationen von CPA kultiviert (**Abb. 19 C**). In diesem Versuchsansatz wurde mit 1 % Aktivkohle behandeltem Serum gearbeitet, da sonst die im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren einen wachstumssteigernden Effekt von CPA überlagern könnten. In den Ansätzen war nach der Anwachsphase von 2 Tagen eine Zellzahl von 1.5×10^4 pro cm^2 (1x) vorhanden, und nach 7-tägiger Inkubation in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem FCS ohne Zusatz von CPA ergab sich eine Zellzahl von 1×10^5 cm^2 (7x). Darüber hinaus war das Wachstum in Medium mit 10^{-9} - 10^{-6} M CPA konzentrationsabhängig gesteigert. Nach Zusatz von 10^{-6} M CPA in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem FCS erreichten die Kulturen eine Zellzahl von $3.4 \times 10^5/\text{cm}^2$,

entsprechend einem Zuwachs um den Faktor 23 bezogen auf die Ausgangszellzahl (**s.a. Tab. 7 auf S. 67**).

Zum Vergleich wurde in weiteren multiplen Versuchsansätzen die Wirkung des nicht-steroidalen Antiandrogens CAS auf das Wachstum von MFM-223 Zellen geprüft (**Abb. 19 D**). Die Wirkung von CAS auf das Wachstum dieser Mammakarzinomzellen ist bisher nicht untersucht. Im Gegensatz zur wachstumssteigernden Wirkung des steroidalen Antiandrogens CPA ließ sich die Proliferation durch CAS dosisabhängig reduzieren. In diesen Wachstumsversuchen wurde Medium mit 10 % Nativ-FCS verwendet, da eine Hemmung des Zellwachstums unter regulären Wachstumsbedingungen besser nachzuweisen ist als unter reduzierten Serumbedingungen. Während des Versuchszeitraums von 7 Tagen war im Ansatz mit 10 % Nativ-FCS die Zellzahl der unbehandelten Kontrollkulturen, bezogen auf die Ausgangszellzahl von 2.5×10^4 pro cm^2 , um den Faktor 25 gestiegen. Bei der geringsten verwendeten Konzentration von 10^{-9} M CAS wurde eine Zellzahl/ cm^2 von 6.3×10^5 pro cm^2 erreicht, entsprechend einem Zellzuwachs um den Faktor 23, im Vergleich zur Ausgangszellzahl (1x). Mit 10^{-5} M CAS wurde der stärkste Hemmeffekt erzielt; die Zellzahl stieg unter dieser Behandlung nur um den Faktor 15. Damit war das Wachstum der MFM-223 Zellen, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle durch 10^{-5} M CAS, auf nahezu 45 % reduziert.

3.4 p53 in MFM-223 Zellen

Das Wachstum der MFM-223 Mammakarzinomzellen war durch DHT negativ und durch das steroidale Antiandrogen CPA positiv zu beeinflussen, während das nicht-steroidale Antiandrogen CAS ebenfalls antiproliferativ wirkte (vergl. Abb. 19, S. 61). Untersuchungen zur Regulation des p53 Gehalts, nach Manipulation des Zellwachstums durch Androgene und Antiandrogene, hatten zuvor erwiesen, daß in LNCaP Prostatakarzinomzellen die Akkumulation von p53 mit Wachstumsstimmung und reduzierter p53-Gehalt mit Wachstumsstimulation assoziiert waren (vergl. Abb. 17, S. 56; s.a. Tab. 7, S. 67). In Western-Blot Analysen wurde daher in vergleichender Weise geprüft, ob die p53 Expression bei MFM-223 Zellen in ähnlicher Weise wie bei LNCaP Prostatakarzinomzellen mit dem Wachstum verknüpft ist.

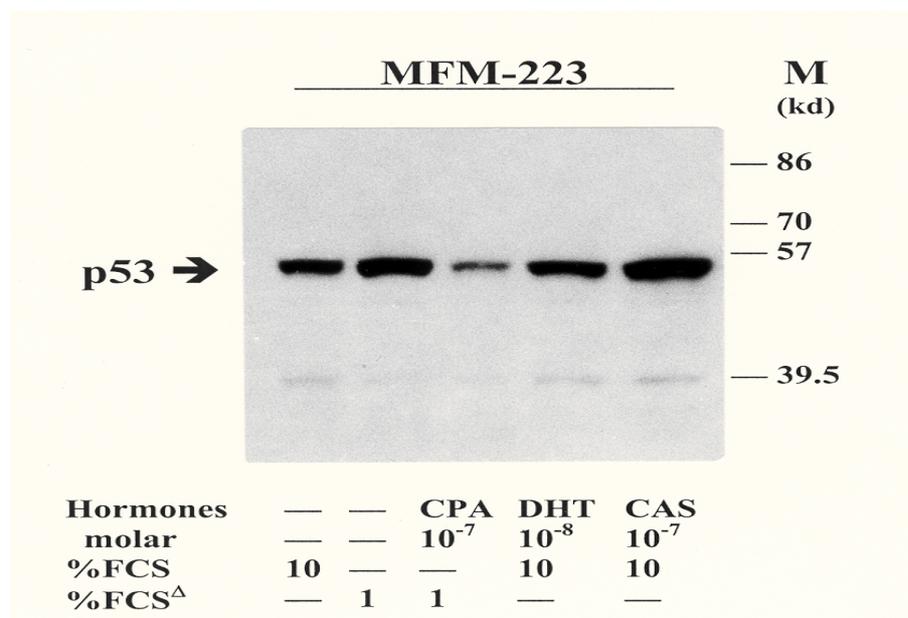


Abb. 20. Im Vergleich zu LNCaP Zellen (Abb. 16, S. 54) erhöhter p53 Gehalt in MFM-223 Zellen bei Wachstumsreduzierung nach 7-tägiger Inkubation in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem FCS^Δ oder nach Zusatz von 10^{-7} M CAS in Medium mit 10 % Nativ-FCS. Reduktion von p53 bei CPA-stimulierten Zellen. Aufgetragen wurden jeweils 80 µg Gesamtprotein. Die Position von p53 ist durch den Pfeil markiert.

Wie vermutet,, ergab sich ein vermehrter Gehalt von p53 in MFM-223 Zellen nach Wachstumsreduktion in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem Serum (FCS^Δ) im Vergleich zu den Kontrollkulturen in 10 % Nativ-FCS (Abb. 20). Der p53 Gehalt war in Zellen bei 1 % FCS etwa doppelt so hoch wie in Zellen, die in 10 % FCS gehalten wurden (vergl. Abb. 19, S. 60). MFM-223 Zellen parallel geführter Kulturen in Medium mit 1 %

Aktivkohle behandeltem Serum wiesen unter Zusatz von 10^{-7} M CPA einen deutlich geringeren p53 Gehalt auf, als die Kulturen in 1 % FCS^A. Dementsprechend war das Wachstum unter vergleichbaren Bedingungen in 10^{-7} M CPA in Bezug auf die Kontrolle ohne Hormonzusatz um das dreifache gesteigert (**vergl. Abb. 19 C, S. 61**). Der p53 Gehalt in MFM-223 Zellen, deren Wachstum durch CPA stimuliert wurde, war jedoch wesentlich geringer als in Zellen, die unter regulären Wachstumsbedingungen (10 % Nativ-FCS ohne Hormonzusatz) maximale Wachstumsraten zeigten. Offenbar ist die Assoziation von p53 Gehalt und Zellwachstum nicht verhältnismäßig umgekehrt proportional in diesen Zellen. Dies wird auch deutlich in MFM-223 Zellen, deren Wachstum durch den Zusatz von 10^{-8} M DHT in Medium mit 10 % Nativ-FCS auf weniger als 50 % der Kontrolle vermindert war (**vergl. Abb. 19 A, S. 61**), während der p53 Gehalt kaum erhöht war, gegenüber der Kontrolle in 10 % Nativ-FCS. Möglicherweise ist bereits eine geringfügige Erhöhung des p53 Spiegels ausreichend, um die beobachtete, mehr als 50%-ige Hemmung des Wachstums durch 10^{-8} M DHT zu gewährleisten. Dagegen war der p53 Gehalt von Zellen, die in Medium mit 10 % Nativ-FCS und 10^{-7} M CAS kultiviert wurden, deutlich erhöht im Vergleich zur Kontrolle in 10 % Nativ-FCS, obwohl das Wachstum in 10^{-7} M CAS nur etwa um ca. 20 % reduziert war (**vergl. Abb. 19 D, S. 61**).

Zur Sicherung der beobachteten Wirkung von CAS wurde die Konzentrationsabhängigkeit der p53 Spiegel in Korrelation zum Wachstum überprüft (**Abb. 21**). In MFM-223 Zellen, die mit 10^{-8} - 10^{-6} M CAS in Medium mit 10 % Nativ-FCS behandelt wurden, kam es zur unverhältnismäßig starken konzentrationsabhängigen Zunahme des p53 Gehalts. Dabei war z.B. die Proliferation durch 10^{-6} M CAS nur auf ca. 70 % gegenüber der Kontrolle gehemmt (**vergl. Abb. 19 D, S. 61**). Auch in diesem Experiment war demnach die massive p53 Erhöhung unproportional zur relativ geringfügigen Hemmung des Zellwachstums. Offenbar treibt der Einsatz von CAS bei MFM-223 Zellen die Akkumulation von p53 wesentlich höher, als dies der Wachstumshemmung entspricht. Die für LNCaP Zellen beschriebene unproportionale Beziehung von Wachstums-hemmung und p53 Anstieg ist bestätigt (**Tab. 7, S. 67**). Andererseits kam es bei LNCaP Zellen durch Serum-Entzug zum völligen Stillstand der Proliferation, während p53 nur mäßig erhöht war in den Western-Blots (**vergl. Abb. 14, S. 51; Abb. 16, 17 u. 18, S. 54, 56 bzw. 58**).

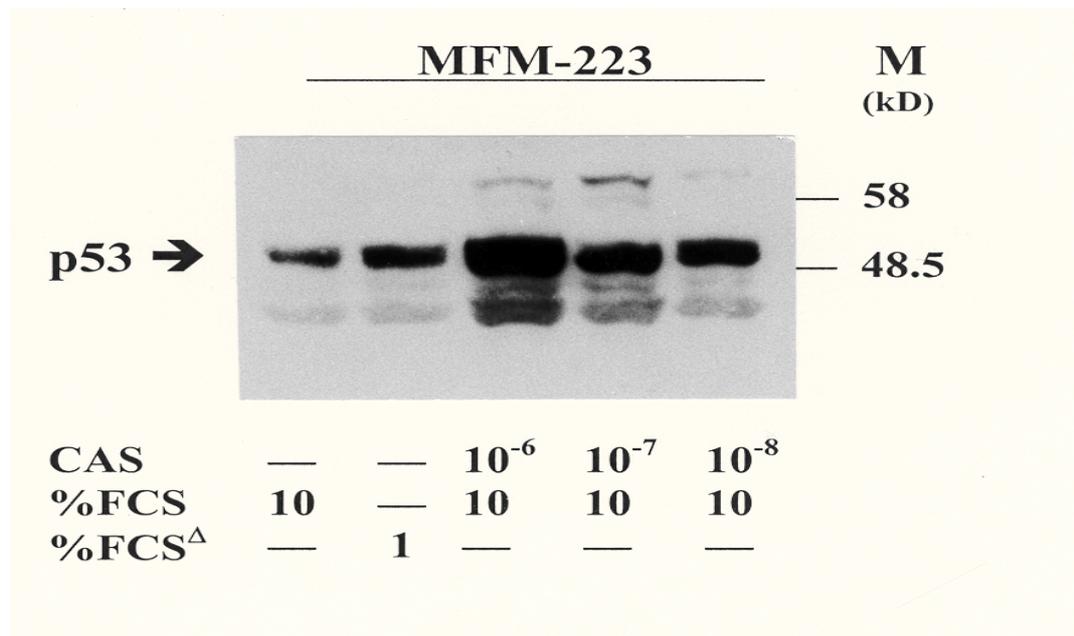


Abb. 21. Konzentrationsabhängige Erhöhung des p53 Gehalts durch 10^{-8} - 10^{-6} M CAS nach 7-tägiger Inkubation von MFM-223 Zellen in Medium mit 10 % Nativ-FCS. Unbehandelte Kontrollen in 10 % Nativ-FCS oder 1 % FCS^Δ (Aktivkohle behandelt). Aufgetragen wurden jeweils 80 μ g Gesamtprotein. Die Position von p53 ist durch den Pfeil markiert.

Tab. 7. Vergleich von p53 Akkumulation und Zellwachstum bei unterschiedlichen Kulturbedingungen. Erhöhter oder reduzierter p53 Gehalt ist bezogen auf die entsprechenden Kontrollkulturen in 10 % Nativ-FCS ohne Hormonzusatz. Als 1 % FCS wurde Aktivkohle behandeltes Serum verwendet. Die Effekte beziehen sich auf Wirkstoff-Konzentrationen von jeweils 10^{-7} M, mit Ausnahme von 10^{-8} M DHT bei MFM-223 Zellen.

Zelllinien	p53 Status	FCS	p53 Gehalt					Wachstum				
			10 %	1 % ^Δ	DHT	CPA	CAS	10 %	1 % ^Δ	DHT	CPA	CAS
DU-145 ⊗ Mutation in beiden Allelen	10 %	↓	—	nd	nd	nd	↑	—	nd	nd	nd	
	1 % ^Δ	—	↑	±	±	±	—	↓	±	±	±	
LNCaP stille Mutation	10 %	↓	—	nd	nd	nd	↑	—	±	±	↓	
	1 % ^Δ	—	↑	↓	↓	↑↑	—	STOP	↑	↑	↓	
PC-3 ⊗ keine Expression	10 %	∅	—	nd	nd	nd	↑	—	nd	nd	nd	
	1 % ^Δ	—	∅	∅	∅	∅	—	↓	±	±	±	
MFM-223 AS-Austausch im Protein eines Allels	10 %	↓	—	↗	nd	↑↑	↑	—	↓	nd	↓	
	1 % ^Δ	—	↑	nd	↓	nd	—	↓	nd	↑	nd	

Δ = Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem FCS

⊗ = kein Androgen-Rezeptor

nd = nicht durchgeführt

∅ = keine Expression

± = unverändert (kein Effekt)

↓ = reduziert

↗ = gering erhöht

↑ = erhöht

↑↑ = stark erhöht

3.5 Sequenzanalysen des p53 Gens bei MFM-223 Zellen

Wie zuvor gezeigt, ist der p53 Gehalt in MFM-223 Zellen im Vergleich zu LNCaP Zellen mit wt-p53 und regulärem Turnover auch unter normalen Wachstumsbedingungen in 10 % FCS deutlich erhöht (vergl. Abb. 20, S. 64 mit Abb. 16 u. 17, S. 54 bzw. 56). Von MFM-223 Zellen ist der p53 Status nicht bekannt; die erhöhte Anwesenheit von p53 in den Western-Blot Analysen läßt jedoch eine Akkumulation und ein mutiertes p53 Gen vermuten. Ein Gendosis-Effekt durch Vermehrung von Chromosom 17 (Polysomie 17) kann auf Grund früherer Untersuchungen ausgeschlossen werden (Hackenberg et al., 1990). Es wurde daher eine Sequenzanalyse der sogenannten "Hot spots", entsprechend den Exons 5-8 des p53 Gens, durchgeführt (Methode s. S. 31-39). Die Sequenzdaten wurden mit der wt-Sequenz des p53 Gens verglichen, und in Exon 5 des p53 Gens ließ sich nach Amplifikation mit den Antisense-Primern, wie auch mit den Sense-Primern, eine Punktmutation in Exon 5 nachweisen. Es handelt sich um einen Austausch der Base Adenin gegen Guanin. Infolgedessen ändert sich die Kodierung des Basentriplets an der Stelle 132 der Aminosäure-Sequenz von AAG für Lysin zu AGG für Arginin. Beide Aminosäuren besitzen basische polare Seitenketten und ähneln sich daher in ihren physikalischen Eigenschaften. Die von Exon 5 kodierten Aminosäuren sind Teil der "Core-Domäne" von p53, die an DNA bindet.

Wegen der relativ moderaten p53 Akkumulation im Vergleich zu DU-145 Zellen wird vermutet, daß in MFM-223 Zellen nur ein Allel von der Mutation betroffen ist. Es ergaben sich in der Sequenzierung keine Hinweise für Mutationen in den Exons 6-8.

R															
13051	<u>Mutation</u> ⇒ AGG								13100						
ACAGTACTCC	CCTGCCCTCA	AC <u>AAG</u> ATGTT	TTGCCAACTG	GCCAAGACCT											
Q	Y	S	P	A	L	N	K	M	F	C	Q	L	A	K	T
125			130			132				136					140

Abb. 22 . Punktmutation (Transition) des Nukleotids 13074 mit einem Austausch von Adenin gegen Guanin. Das mutierte Basentriplett 132 kodiert für Arginin (R) und ersetzt Lysin (K) der wt-Sequenz. Dargestellt ist die p53 Sequenz von Aminosäure 13051-13100 des Exons 5. Außerdem sind die benachbarten Aminosäuren 125-140 gezeigt. Das von der Mutation betroffene Triplet ist hervorgehoben und unterstrichen.

3.6 Expression von p53-regulierten Proteinen

3.6.1 MDM 2

Die Regulation von Zellzyklus und Apoptose erfolgt durch p53 über eine Reihe nachgeordneter Proteine (**vergl. Abb. 3, S. 6; Abb. 5, S. 12**), von denen zunächst das für Metabolisierung und Degradation von p53 verantwortliche Protein MDM2 untersucht wurde. Die Transkription des Proteins MDM2 wird, wie in der Einleitung beschrieben, durch p53 induziert. Aus den vorangegangenen Western-Blot Analysen (**vergl. Tab.7, S. 67**) geht hervor, daß der p53 Gehalt in den Prostatakarzinomzellen DU-145 und LNCaP sowie bei MFM-223 Mammakarzinomzellen, bei Wachstum reduziert und im Zustand der Wachstumshemmung erhöht ist. Wegen der unterschiedlichen Regulation der wachstumsassoziierten p53 Spiegel durch endokrine Faktoren oder Serum-Konzentrationen, war zu erwarten, daß sich die MDM2 Expression in LNCaP Zellen mit wt-p53 anders verhält, als bei Zellen der Linien DU-145 und MFM-223 mit mutiertem p53.

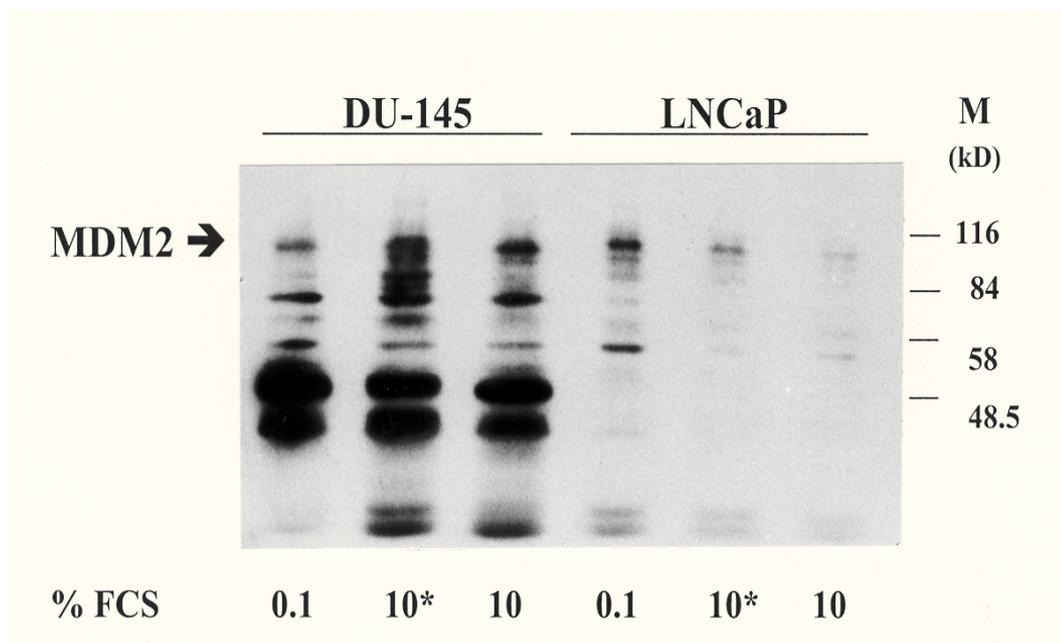


Abb. 23. MDM2 Gehalt in Zellen der Linien DU-145 und LNCaP nach Behandlung durch Serumentzug (0.1 % FCS), Restimulation mit 10 % FCS (10*) oder in Wachstumsmedium (10 % FCS). Keine deutliche Änderung der MDM2 Menge in DU-145 Zellen in Abhängigkeit vom Wachstumszustand. Erhöhter Gehalt an MDM2 Protein in arretierten (0.1 % FCS) bzw. nahezu kein MDM2 in proliferierenden LNCaP Zellen. Die Gesamtkubationszeit war 7 Tage bei der Zelllinie DU-145, bei LNCaP Zellen 10 Tage. Restimulation (10*) des Zellwachstums durch die Gabe von Wachstumsmedium mit 10 % FCS erfolgte jeweils nach 4 Tagen der Inkubation. Es wurden jeweils 80 µg Gesamtprotein eingesetzt. Das MDM2 Signal ist durch den Pfeil angezeigt.

In DU-145 Zellen war keine deutliche Änderung des MDM2 Gehalts in Abhängigkeit vom Wachstumszustand der Zellen zu beobachten (**Abb. 23**), obwohl p53 nach Serumreduktion sehr stark akkumuliert war (**vergl. Abb. 16, S. 54; Tab. 7, S. 67**). Offenbar kann p53 in DU-145 Zellen die Transkription von MDM2 infolge von mutationsbedingter Konformationsänderungen des Proteins nicht mehr induzieren. Eine Hochregulierung des MDM2 Proteins zeigte sich eindeutig bei LNCaP Zellen, in denen der p53 Gehalt bei Wachstumsarrest durch Serumentzug angestiegen war. Im Vergleich dazu war in restimulierten LNCaP Zellen der MDM2 Gehalt in ähnlicher Weise wie zuvor bei p53 beobachtet ungefähr auf die Hälfte reduziert. Die geringste MDM2 Menge wurde in LNCaP Kontrollzellkulturen sichtbar, die sich unter regulären Wachstumsbedingungen in 10 % Nativ-FCS befanden. Damit korreliert der MDM2 Gehalt der jeweiligen LNCaP Kulturen in etwa proportional mit den zuvor nachgewiesenen Veränderungen der p53 Menge. MDM2 Protein wird in LNCaP Zellen somit in Abhängigkeit vom Wachstumszustand durch p53 reguliert. Anhand der Aminosäureabfolge von MDM2 läßt sich ein relatives Molekulargewicht von 54 kD ableiten. Im SDS-PAA-Gel zeigt MDM2 Protein jedoch ein verändertes Laufverhalten. Die Bande erscheint bei ca. 90 kD (Moman et al. 1992; Oliner et al. 1992; Barak, et al., 1993; Leach et al. 1993).

Es ist denkbar, daß gerade das Ausbleiben der Induktion von MDM2 Protein bei DU-145 Zellen die starke Akkumulation des p53 verursacht (**vergl. Abb. 16, S. 54**), denn ohne ausreichende Menge an MDM2 Protein kann p53 dem Turnover nicht mehr zugeführt werden. Wie schon in vorangegangenen Versuchen bei der Detektion von p53 gezeigt wurde (**vergl. Abb. 17 u. 18, S. 56 bzw. 58**), erkannte der Antikörper für MDM2 (MDM2 Ab-1, Oncogene), außer dem MDM2 Protein, eine Reihe weiterer Proteine mit geringeren Molekulargewichten, von denen einige regulierbar waren durch die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen. Der Antikörper für das MDM2 Protein (MDM2 Ab-1, Oncogene) war offenbar in der Lage, ebenfalls p53 zu erkennen, denn es zeigten sich in den Extrakten von DU-145 Zellen jeweils zwei starke Banden bei 45 bzw. 50 kD, von denen die 50 kD Bande nach Wachstumshemmung der Zellen in 0.1 % FCS stärker ausgeprägt war. Dies wurde in vergleichbarer Weise bereits bei Einsatz von anti-p53 (p53 Ab-2, Oncogene) beobachtet (**vergl. Abb. 16, S. 54**). Zusätzlich fand sich eine kleinere Bande von ca. 53 kD, die in DU-145 Zellen bei Wachstumshemmung nicht regulierbar war. Nach Inkubation in 0.1 % FCS war p53 in Extrakten aus LNCaP Zellen sichtbar; bei wachsenden LNCaP Zellen kam es zur Down-Regulation der durch anti-MDM2 erkannten 53 kD Bande. Das entsprechende Protein wird offenbar in der gleichen Weise wie p53

reguliert und ist somit möglicherweise p53, das mit anti-p53 (p53 Ab-2; Oncogene) detektiert wurde (**vergl. Abb. 16, S. 54**). Die Darstellung der beiden Proteine von 45 und 50 kD durch anti-p53 (p53 Ab-2, Oncogene) und anti-MDM2 (MDM2 Ab-1; Oncogene) erfolgte spezifisch nur in Extrakten aus DU-145 Zellen und nicht bei Proteinen aus den übrigen untersuchten Zelllinien. Offenbar erkannte der Antikörper gegen MDM2 die Proteine mit 45 bzw. 50 kD, von denen nur p50 geringfügig reguliert ist. Diese Proteine werden möglicherweise auch von anti-p53 (p53 Ab-2; Oncogene) detektiert (**vergl. Abb. 16, S. 54**), sind jedoch im Western-Blot unterscheidbar von p53, denn das von anti-MDM2 (MDM2 Ab-1; Oncogene) in LNCaP Zellen erkannte p53 wird reguliert durch Serumentzug, ebenso wie die immunzytochemisch durch anti-p53 (p53 Ab-2; Oncogene) bei Serumentzug dargestellte Akkumulation von p53 in DU-145 Zellen (**vergl. Abb. 15, S. 52**). In PC-3 Zellen war keine Expression von MDM2 nachweisbar (nicht gezeigt in Abb. 23), dies beruht offenbar auf der völligen Abwesenheit von p53, so daß keine Induktion der Transkription des Gens für MDM2 stattfinden kann.

In den eingangs durchgeführten Untersuchungen an LNCaP Zellen war sowohl das Wachstum, als auch der p53 Gehalt durch DHT oder CPA regulierbar (**vergl. Tab. 7, S. 67**). In diesen Versuchen wurde eine Wachstumsstimulation durch DHT oder CPA bewirkt, während der p53 Gehalt reduziert war, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dagegen wiesen LNCaP Zellen, deren Wachstum durch Kultivierung mit CAS gehemmt war, erhöhte p53 Spiegel auf. Daher wurde in weiteren Western-Blot Analysen die MDM2 Expression nach Kultivierung von LNCaP Zellen in Medium mit 1 % Aktivkohle-behandeltem Serum und Zusatz von DHT oder der Antiandrogene CPA und CAS geprüft (**Abb. 24**). Als Kontrolle wurden Extrakte aus DU-145 Zellen und PC-3 Zellen mitgeführt, deren Wachstum auf Grund des fehlenden Androgen-Rezeptors durch Androgene oder Antiandrogene nicht zu beeinflussen war.

In DU-145 Zellextrakten ließ sich in diesem Versuch kein MDM2 Signal detektieren (**Abb. 24**). Dies bestätigt die oben gemachte Vermutung, daß zwar eine massive p53 Akkumulation bei Wachstumsreduktion gefunden wird, daß auf Grund der vorhandenen p53 Mutation jedoch die Funktion zur Induktion von MDM2 verloren gegangen ist. Dagegen konnte MDM2 Protein in Zellen der Linie LNCaP nach Behandlung mit 10^{-7} M CAS eindeutig nachgewiesen werden, während p53 leicht erhöht war (**vergl. Abb. 17, S. 56**), und ein völliger Arrest des Zellwachstums eingetreten war (**vergl. Abb. 14, S. 51**). Demgegenüber war in proliferierenden LNCaP Zellen, die mit 10^{-7} M DHT oder CPA kultiviert waren, sowie in unbehandelten Kontrollzellen (ohne

Hormonzusatz) kein MDM2 Protein nachweisbar. Somit war bei gering vermehrtem p53 Gehalt nur in LNCaP Zellen, deren Wachstum durch CAS auf ca. 70 % gehemmt war, MDM2 Expression nachweisbar. Offenbar besitzt CAS eine besondere Fähigkeit zur Erhöhung von MDM2 Protein in diesen Zellen. Es erscheint merkwürdig, daß in LNCaP Zellen bei kompletter Wachstumshemmung in 1 % FCS keine MDM2 Expression gefunden wurde, dagegen sehr wohl bei zusätzlicher Gabe von CAS. Offenbar stellt bei Wachstumsarrest durch Serum-Reduktion die Anwesenheit des antiandrogenen CAS eine zusätzliche Noxe dar, die zur Akkumulation von MDM2 Protein führt. In PC-3 Zellen war infolge der völligen Abwesenheit von p53 kein MDM2 Protein nachzuweisen.

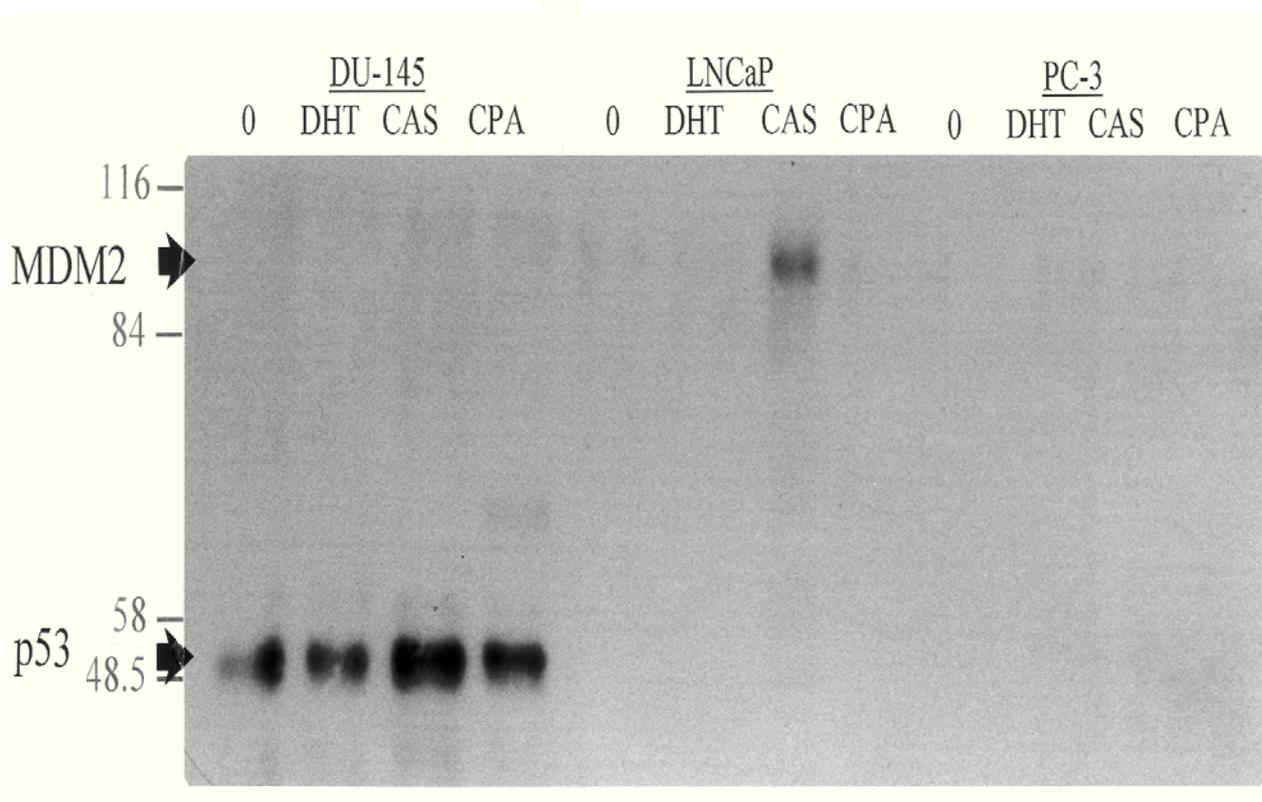


Abb. 24. Anwesenheit von MDM2 Protein in LNCaP Zellen, nach partieller Wachstumshemmung durch 10^{-7} M CAS in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem FCS für 10 Tage. Keine Expression nach 10 Tagen Inkubation von LNCaP Zellen bei Zusatz von 10^{-7} M DHT, CPA oder in Kontrollkulturen (ohne Zusatz von Androgen oder Antiandrogen) bei kompletter Wachstumshemmung durch 1 % FCS^A sowie in DU-145 und PC-3 Zellen. Von DU-145 und PC-3 Zellextrakten wurden jeweils 40 µg, von LNCaP Zellextrakt wurde 80 µg Gesamtprotein eingesetzt.

Zur Absicherung der Anwesenheit von MDM2 Protein in wachstumsgehemmten LNCaP Zellen sollte die Konzentrationsabhängigkeit der MDM2 Expression nach Behandlung mit dem Antiandrogen CAS untersucht werden (**Abb. 25**). Im Protein der Kontrollzellen war MDM2 unter regulären Wachstumsbedingungen in Medium mit 10 % Nativ-FCS nur in äußerst geringer Menge nachzuweisen. Bei Zellen, die unter reduzierten Wachstumsbedingungen in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem Serum wuchsen, war dagegen der MDM2 Gehalt erhöht, ebenso wie bei LNCaP Zellen in zunehmenden Konzentrationen von CAS (10^{-8} - 10^{-5} M), deren Konzentrationsabhängigkeit von CAS wegen mangelnder Qualität des Blots nicht deutlich wird. Im Gegensatz zu dem zuvor in **Abb. 24, S. 72** dargestellten Versuch waren in diesen Extrakten Proteine enthalten, die ebenfalls von dem verwendeten Detektionssystem erkannt wurden, deren Menge jedoch durch die Variation der Wachstumsbedingungen nicht reguliert wurde, und die somit als unspezifisch anzusehen sind.

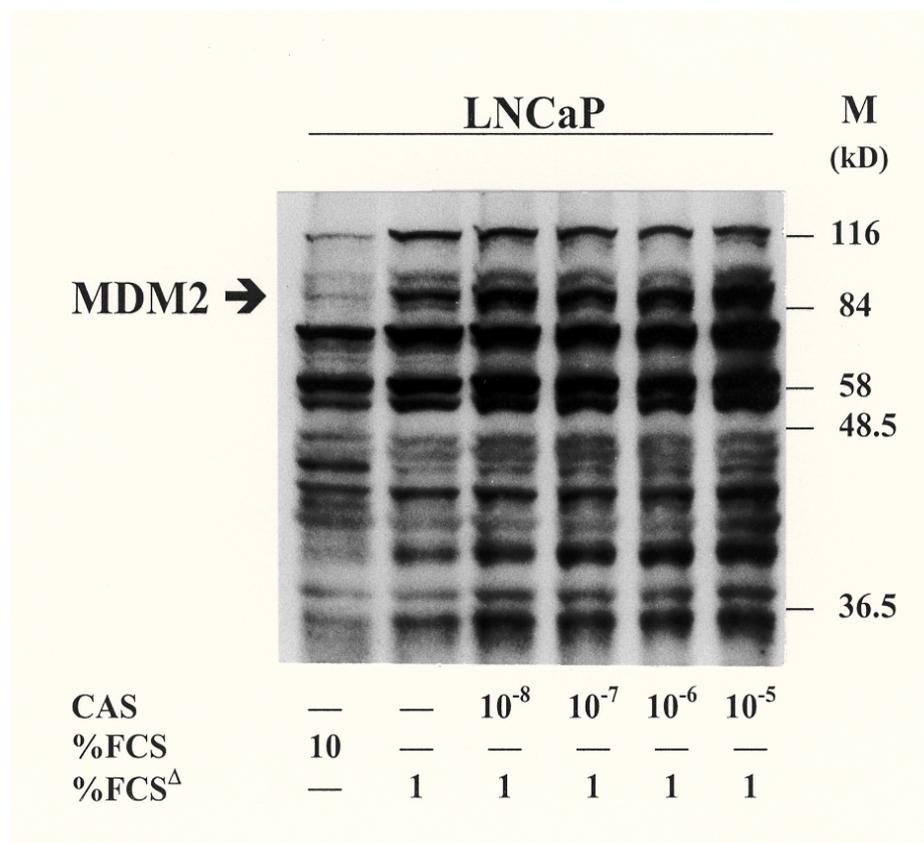


Abb. 25. MDM2 Protein in LNCaP Zellen in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen des Antiandrogens CAS im Vergleich zur Kontrolle ohne Wirkstoff-Zusatz (Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem FCS^Δ). Demgegenüber geringe Expression in Zellen, die in Wachstumsmedium wuchsen (10 % Nativ-FCS). Die Zellen wurden jeweils für 10 Tage inkubiert. In jeder Spur wurden 80 µg Gesamtprotein aufgetragen. Das MDM2 Signal ist durch den Pfeil markiert.

In ähnlicher Weise, ließ sich bei MFM-223 Mammakarzinomzellen der MDM2 Gehalt, jedoch mit erheblich besserer Auflösung als bei LNCaP Zellen darstellen (**Abb. 26**). Das Wachstum von MFM-223 Zellen wurde nach Zusatz von 10^{-7} M des nicht-steroidalen Antiandrogens CAS auf ca. 75 % der Kontrolle reduziert (**vergl. Abb. 19 D, S. 61**). Der Gehalt an p53 war unter diesen Bedingungen in MFM-223 Zellen überproportional vermehrt (**vergl. Abb. 20, S. 64 u. 21, S. 66**). Verglichen mit der relativ moderaten Wachstumshemmung durch CAS, war dagegen der MDM2 Gehalt nicht mehr erhöht, als bei Hemmung des MFM-223 Zellwachstums durch 10^{-8} M DHT auf ca. 33 % (**vergl. Abb. 19 A, S. 61**). Offenbar war das akkumulierte p53 nicht in der Lage, eine wesentliche Steigerung der MDM2 Expression zu bewirken; dies ist möglicherweise auf die oben gezeigte Punktmutation in Exon 5 des p53 Gens zurückzuführen (**vergl. Abb. 22, S. 68**). Somit darf angenommen werden, daß CAS selektiv eine Erhöhung von p53 bewirkt, nicht jedoch eine vergleichbare Steigerung des MDM2 Gehalts der MFM-223 Zellen. Die Expression von MDM2 Protein war jedoch erniedrigt in MFM-223 Zellen, deren Wachstum in 1 % FCS durch 10^{-7} M CPA um den Faktor 3 gesteigert wurde (**vergl. Abb. 19 C, S. 61**). Dies steht im Einklang mit der Reduktion des p53 in CPA-stimulierten MFM-223 Zellen (**vergl. Abb. 20, S. 64**). Der Antikörper gegen MDM2 Protein (MDM2 Ab-1, Oncogene) erkennt offenbar spezifisch im Extrakt von MFM-223 Zellen Proteine der Größe 55-75 kD, die jedoch nicht durch die Inkubationsbedingungen regulierbar sind.

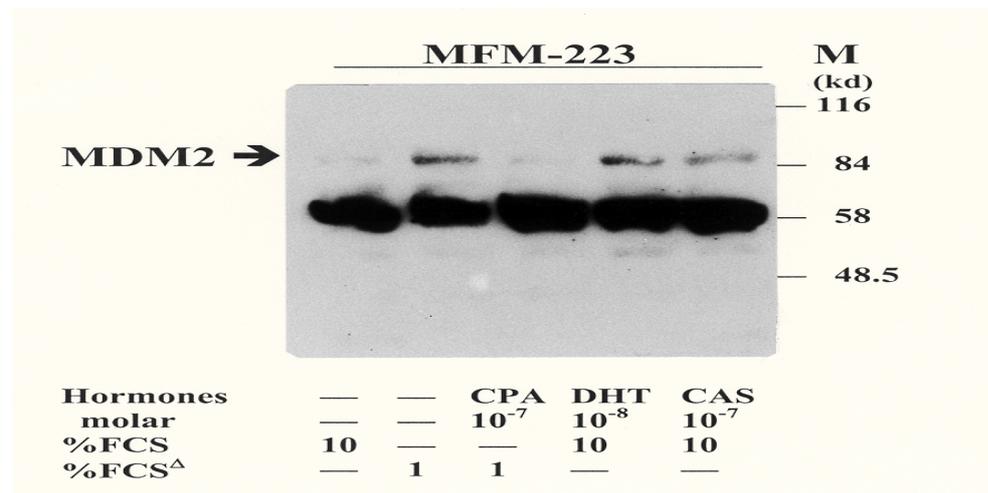


Abb. 26. Vermehrte Anwesenheit von MDM2 Protein in MFM-223 Zellen, die für 7 Tage in Medium mit 10 % Nativ-FCS und wachstumshemmenden 10^{-8} M DHT, 10^{-7} M CAS oder in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem Serum (FCS^Δ) kultiviert wurden. Dagegen geringe Expression in Zellen, die in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem Serum und Zusatz von wachstumstimulierenden 10^{-7} M CPA oder in 10 % Nativ-FCS (ohne Zusatz von Androgen oder Antiandrogenen) wuchsen. Es wurden jeweils 80 µg Gesamtprotein eingesetzt. Das MDM2 Signal ist durch den Pfeil markiert.

Auch durch Erhöhung der Konzentration von CAS bis zu 10^{-5} M (**Abb. 27**) ließ sich die Menge an MDM2 Protein in MFM-223 Zellen nicht in dem Ausmaß steigern wie die p53 Akumulation. Offenbar ist der Umsatz von p53 in MFM-223 Zellen in weitaus stärkerem Umfang durch CAS inhibiert als durch DHT (**vergl. Abb. 20, S. 64**). Somit steht auch in diesem Experiment mit MFM-223 Zellen die außerordentlich hohe Menge an p53 nach Inhibition der Proliferation mit CAS nicht im proportionalen Verhältnis zur moderaten Erhöhung von MDM2 Protein, so daß die Annahme bestätigt wird, daß ein Teil der p53 Moleküle auf Grund der mutationsbedingten Konformationsänderung nicht zur Induktion von MDM2 Protein befähigt ist. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Ergebnissen mit LNCaP Zellen, in denen die Erhöhung des p53 durch CAS von einer deutlichen Zunahme der MDM-2 Expression begleitet war (**vergl. Abb. 24, S. 72**). Im Vergleich zur Kontrollkultur in 10 % Nativ-FCS fand sich eine Hemmung der Zellproliferation durch CAS im Dosisbereich von 10^{-8} M (um ca. 14 %) bis 10^{-6} M (32 %) (**vergl. Abb. 19 D, S. 61**) mit einer Vermehrung von MDM2 Protein verbunden. Nach Inkubation der Zellen mit 10^{-5} M CAS (entsprechend einer Reduktion der Proliferation auf ca. 60 %) war keine weitere Steigerung der MDM2 Expression zu beobachten, so daß ein maximaler Effekt bei 10^{-6} M Konzentration von CAS anzunehmen ist. Somit darf angenommen werden, daß CAS selektiv eine Erhöhung von p53 bewirkt (**vergl. Abb. 21, S. 66**), nicht jedoch eine zusätzliche Steigerung des MDM2 Gehalts in MFM-223 Zellen. In der gleichen Weise wie im zuvor dargestellten Experiment wurden Proteine vom verwendeten Antikörper (MDM2 Ab-1, Oncogene) im Größenbereich von 50-75 kD erkannt, deren Menge nicht durch CAS regulierbar war (**vergl. Abb. 26, S. 74**).

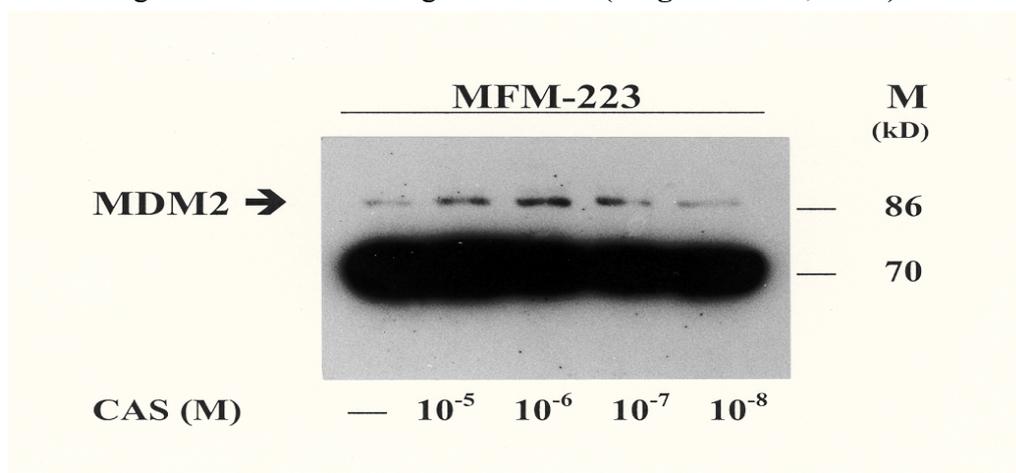


Abb. 27. Variation der MDM2 Expression in MFM-223 Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration des Antiandrogens CAS in Medium mit 10 % Nativ-FCS im Vergleich zur Kontrolle ohne Hormonzusatz (erste Spur). In jeder Spur wurden 80 µg Gesamtprotein aufgetragen. Das MDM2 Signal ist durch den Pfeil markiert.

3.6.2 p21 (WAF1)

Ein wichtiger negativer Regulator des Zellzyklus und damit der Proliferation ist das p21/WAF1 Protein (**vergl. Abb. 3, S. 6**). Die Transkription des p21 Inhibitors von Zyklin-Kinase-Komplexen wird in Stress-Situationen bei normalen Zellen u.a. auch durch p53 induziert (Cordon-Cardo, 1995). Eine vermehrte Expression von p21 kann, wie in der Einleitung beschrieben, einen G1-Arrest und damit eine Hemmung des Zellzyklus zur Folge haben. Für die Untersuchung der p21 Expression wurden die Karzinomzellkulturen durch den Entzug von Serum-Wachstumsfaktoren oder durch die Kultivierung in Medium mit DHT bzw. CAS im Wachstum gehemmt (**vergl. Abb. 10, 11 u. 19, S. 41, 44 bzw. 61**). Bei Wachstumshemmung in jeweils unterschiedlichem Ausmaß zeigte sich vermehrt p53 und eine erhöhte Expression von MDM2 Protein in LNCaP und MFM-223 Zellen. Obwohl der p53 Gehalt in DU-145 Zellen zunahm (**Abb. 15, S. 52 u. Abb. 16, S. 54**), war keine Expression von MDM2 in DU-145 Zellen zu sehen (**Abb. 17 u. 20, S. 56 bzw. 64**). Da p53 die Expression von p21 hochregulieren kann, wäre bei Wachstumshemmung eine vermehrte p21 Expression zu erwarten.

Wie **Abb. 28** erkennen läßt, weisen LNCaP Zellen bei komplettem Wachstumsstillstand durch Serumentzug (0.1 % FCS) einen erhöhten p21 Gehalt auf. Im Vergleich dazu war der p21 Gehalt in LNCaP Zellen nach Restimulation des Zellwachstums durch erneute Zufuhr von Serum und nach fortlaufender 10-tägiger Kultivierung in Wachstumsmedium (10 % FCS) gleich groß. Demnach ist p21 nach der Restimulation für 2 Tage offenbar bereits wieder auf den Level von regulär wachsenden LNCaP Zellen herunterreguliert. Dies zeigt offenbar einen regulären Turnover des p21 an und entspricht somit dem Abfall des wt-p53 Spiegels unter diesen Bedingungen (**vergl. Abb. 16, S. 54**). Auffallend ist der relativ moderate Anstieg von p21 und p53 in der Situation des kompletten Stillstands der Proliferation der LNCaP Zellen. In den Prostatakarzinomzellen DU-145 und PC-3 wurde kein p21 Signal detektiert. Offenbar wird p21 in diesen Zellen nicht exprimiert, da in beiden Zelllinien das intakte p53 fehlt. In DU-145 Zellen wird bei Wachstumshemmung vermehrt p53 akkumuliert, das Protein ist jedoch derart mutiert, daß die Induktion des nachgeordneten p21 ausfällt, ebenso wie zuvor gezeigt, die Induktion von MDM2 Protein (**vergl. Abb. 23, S. 69**). Eine Regulation von p21 durch p53 ist in PC-3 Zellen nicht möglich, da diese kein p53 exprimieren. Die Wachstumsretardierung muß also in DU-145 und PC-3 Zellen auf andere Weise reguliert werden als durch p21. Als Kontrolle für die Detektion von p21 im Western-Blot wurden Zellextrakte der Mammakarzinomlinie MCF-7 mitgeführt. Die Zellen wurden 5 Tage mit 4 ng/ml des

Zytostatikums Epirubicin in Medium mit 10 % Nativ-FCS kultiviert. Diese Behandlung führte zur Hochregulierung des p21 Proteins im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen (in 10 % Nativ-FCS ohne Zytostatikum). Demnach wurde auch in wachsenden MCF-7 Zellen durchaus p21 exprimiert, in ähnlicher Weise wie bei LNCaP Zellen. Die in einem Extrakt aus MCF-7 Zellen detektierten Signale wurden zur Identifizierung der p21 Bande auch bei den weiteren Untersuchungen verwendet.

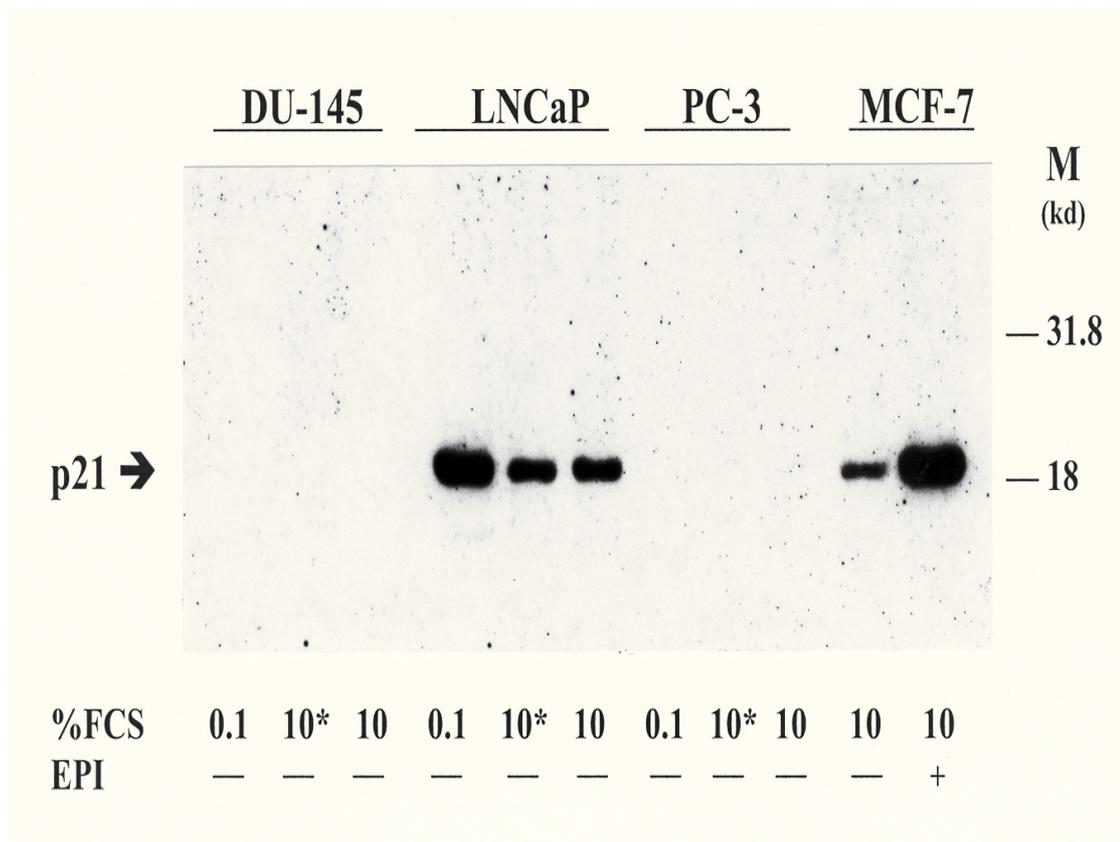


Abb. 28. Erhöhte Expression von p21/WAF1 in wachstumsarretierten LNCaP Zellen nach Serumentzug (0.1 %). Geringere Expression von p21 bei wachsenden (10 % FCS) oder bei restimulierten Zellen (10*). Keine Detektion von p21 in DU-145 und PC-3 Zellen. Unter den jeweils angegebenen Kulturbedingungen betrug die Inkubationsdauer 10 Tage bei LNCaP Zellen und 7 Tage bei DU-145 und PC-3 Zellkulturen. Restimulation des Zellwachstums erfolgte nach 4-tägiger Inkubation in 0.1 % Serum durch 2-tägige Inkubation in Wachstumsmedium mit 10 % Nativ-FCS. Als Kontrolle wurde Proteinextrakt aus MCF-7 Zellen analysiert und zeigte vermehrte Expression von p21 nach 5-tägiger Kultivierung und Wachstumshemmung in Medium mit 4 ng/ml Epirubicin (EPI). Aufgetragen wurden jeweils 80 µg Gesamtprotein. Das apparente Molekulargewicht liegt bei 21 kD (Xiong et al., 1992). Der Pfeil markiert das p21 Signal.

Der wachstumsstimulierende Zusatz von 10^{-7} M CPA war in LNCaP Zellen mit der Reduktion des p21 Gehalts assoziiert, während DHT eher eine Erhöhung des p21 Gehalts bewirkte (**Abb. 29**). Dies steht im Gegensatz zur Beobachtung, daß beide endokrine Faktoren das Wachstum von LNCaP Zellen steigerten (**vergl. Abb. 10 A u. B, S. 41**), und der p53 Spiegel sowie der MDM2 Gehalt relativ niedrig waren (**Abb. 17, S. 56 u. Abb. 25, S. 74, vergl. Tab. 7, S. 67**). In LNCaP Zellen, deren Wachstum durch CAS gehemmt war, zeigte sich eine deutliche Erhöhung von p21. Entsprechend war p53 sowie das MDM2 Protein erhöht (**vergl. Tab. 7, S. 67**). Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß überraschenderweise die DHT-induzierte erhöhte Expression von p21 in LNCaP Zellen mit der Wachstumssteigerung gekoppelt war. Die stimulierende Wirkung von DHT ist demnach nicht durch Reduktion von p21 hervorgerufen und muß zunächst ungeklärt bleiben. Die Wachstumshemmung durch CAS bei LNCaP Zellen und durch Epirubicin bei MCF-7 Zellen ist dagegen im Einklang mit der vermehrten Anwesenheit des p21 und dessen bremsender Wirkung auf den Zellzyklus.

In DU-145 und PC-3 Zellen konnte erneut kein p21 in den Western-Blot Analysen nachgewiesen werden (nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit den vorherigen Untersuchungen ist offenbar bei fehlendem p53 in PC-3 Zellen keine Expression von p21 möglich, so daß die Hemmung des Wachstums durch Serumentzug bei diesen Zellen auf andere Weise als über die Erhöhung der p21 Expression erfolgen muß. In diesem Experiment wurden eine Reihe weiterer Proteine mit höherem apparentem Molekulargewichten vom Antikörper (Anti-human p21, Pharmingen) gegen p21 erkannt, die mit einer Ausnahme nicht regulierbar waren; lediglich ein Protein von ca. 32 kD war in LNCaP Zellen durch DHT oder CPA down-reguliert, ebenso wie in MCF-7 Zellen durch Epirubicin.

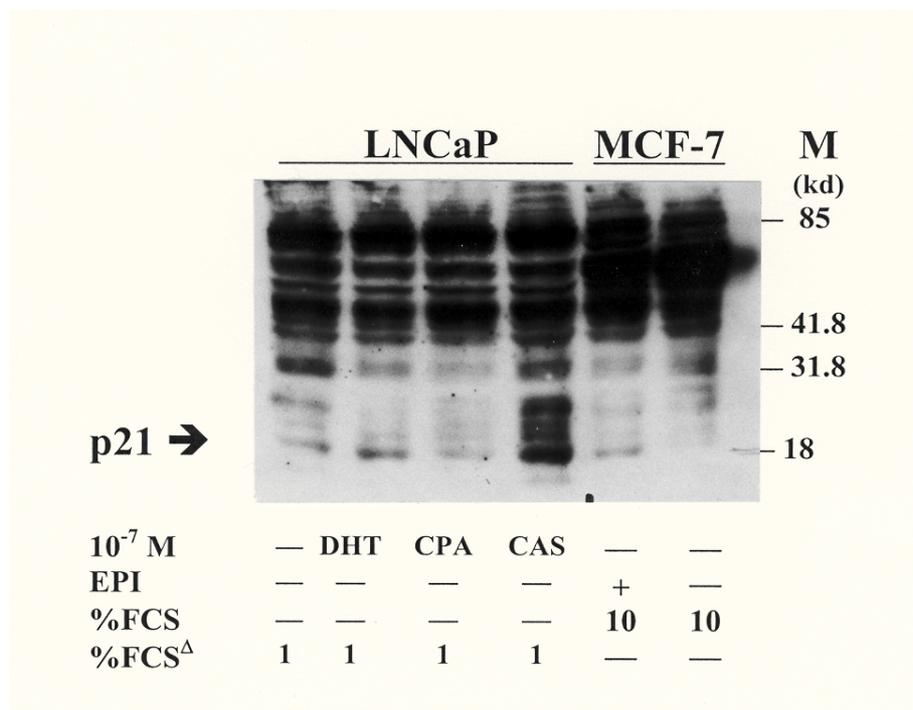


Abb. 29. Vermehrter p21 Gehalt bei Wachstumshemmung von LNCaP Zellen nach 10-tägiger Behandlung mit 10⁻⁷ M CAS gegenüber Kulturen, deren Wachstum durch 10⁻⁷ M DHT oder CPA stimulierbar war. Die Versuche wurden in 1 % Aktivkohle behandeltem Serum (FCS^Δ) durchgeführt. Erhöhte p21 Expression in der Kontrolle (ohne Wirkstoffzusatz) im Vergleich zu Zellen in 10 % FCS. Erhöhte Expression von p21 in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit dem Zytostatikum Epirubicin (EPI) und nach Inkubation von LNCaP Zellen mit DHT. Im Vergleich dazu keine Expression in MCF-7 Zellen, die ohne Zytostatikum in 10 % Nativ-FCS kultiviert wurden. Die Zellextrakte der Linie MCF-7 wurden als Kontrolle für die Detektion von p21 mitgeführt. Es wurden 40 µg Gesamtprotein aus MCF-7 Zellen und 80 µg Gesamtprotein aus LNCaP Zellen aufgetragen.

Zur Absicherung der Wirkung von CAS wurde der p21 Gehalt von LNCaP Zellen untersucht, die mit verschiedenen Konzentrationen des Antiandrogens behandelt waren (**Abb. 30**). Das Resultat zeigt eindeutig die Hochregulierung von p21 durch 10⁻⁵ und 10⁻⁶ M CAS, die eine starke Hemmung des Zellwachstums in 1 % FCS auf weniger als 20 % bzw. 40 % der Kontrolle bewirkten (**vergl. Abb. 11, S. 44**), in ähnlicher Weise wie der Effekt von Epirubicin bei MCF-7 Zellen. Im Vergleich mit der Hochregulierung von p21 in Epirubicin behandelten MCF-7 Zellen ist jedoch die Menge von p21 nur moderat durch CAS gesteigert. Das Experiment wurde in 1 % FCS durchgeführt, da sich bei Serum-Reduktion der stärkste Effekt von CAS in der Hochregulierung von p53 gezeigt hatte (**vergl. Tab. 7, S. 67**). Die p21 Menge sinkt in dieser Untersuchung mit der Abnahme der

CAS Konzentration, und in Relation zur abnehmenden Wachstumshemmung (**vergl. Abb. 11 B, S. 44**). Die vom Antikörper (Anti-human p21, Pharmingen) bei Extrakten von LNCaP Zellen erkannten Proteine mit niedrigeren Molekulargewichten (**vergl. Abb. 29, S. 79**) waren in diesem Versuch nicht detektierbar. Zuvor waren sie zwar auch bei MCF-7 Zellen zu beobachten. Sie waren jedoch mit Epirubicin nicht regulierbar und wurden daher als unspezifisch angesehen.

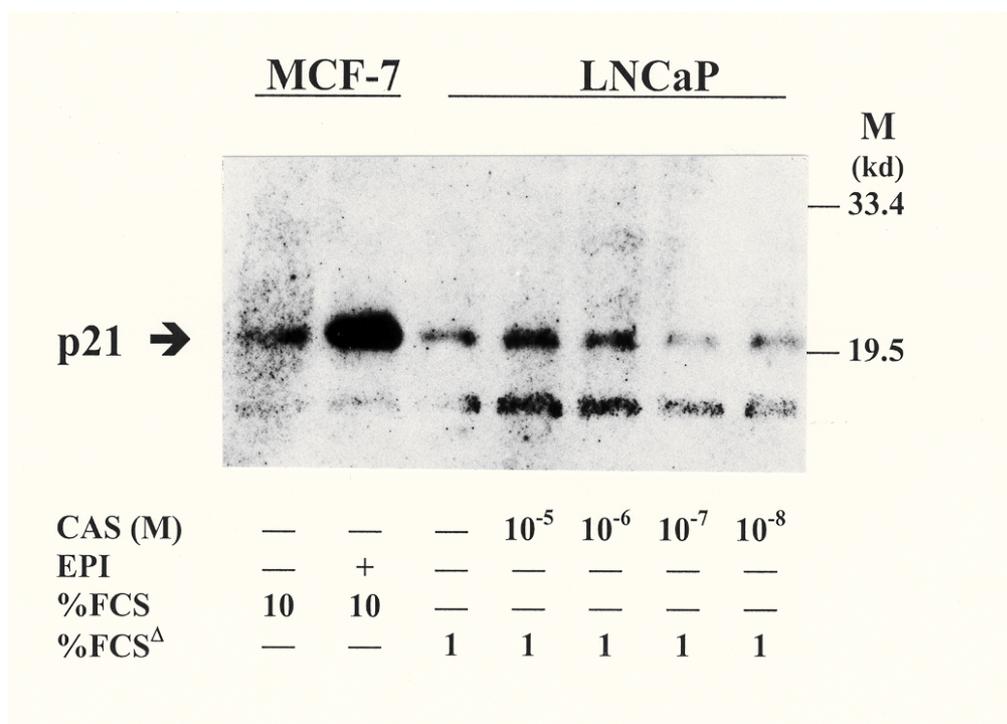


Abb. 30. Vermehrung des p21 Gehalts bei wachstumshemmenden Konzentrationen von CAS (10^{-5} M- 10^{-8} M) bei LNCaP Zellen im Vergleich zur Kontrolle ohne Hormonzusatz (Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem FCS). Deutlich erhöhte p21 Menge in den als Kontrolle eingesetzten MCF-7 Zellen, die mit dem Zytostatikum Epirubicin (EPI) behandelt wurden. Dagegen geringere Expression in MCF-7 Zellen, die ohne Zytostatikum (10 % Nativ-Serum) kultiviert wurden. Es wurden 40 μ g Gesamtprotein der Linie MCF-7 und 80 μ g Gesamtprotein von LNCaP Zellextrakten aufgetragen. In den beiden äußeren rechten Spuren ist weniger Protein eingesetzt worden, so daß die entsprechenden Signale quantitativ nicht auszuwerten sind. Das p21 Signal ist durch den Pfeil markiert.

Bei MFM-223 Zellen ließ sich das Wachstum durch DHT oder CAS reduzieren (vergl. Tab. 7, S. 67), dementsprechend war p21 erhöht (Abb. 31). Durch Serum-Entzug konnte kein Anstieg von p21 gezeigt werden, während in den zur Kontrolle mitgeführten MCF-7 Zellen bei Wachstumshemmung durch Epirubicin, wie in den vorher gezeigten Versuchen, ein deutlicher Anstieg von p21 eintrat (vergl. Abb. 28, 29 bzw. Abb. 30, S. 77, 79 bzw. 80).

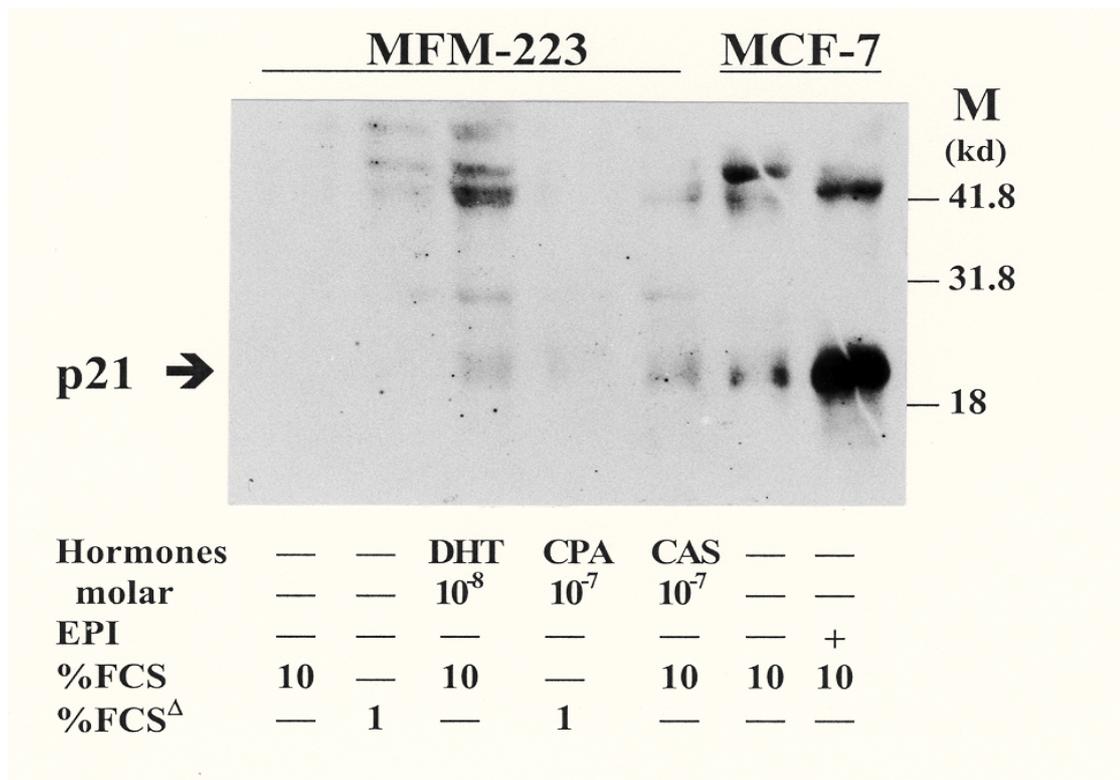


Abb. 31. Erhöhung des p21 Gehalts in MFM-223 Zellen bei Hemmung des Wachstums durch den Zusatz von DHT oder CAS. Die Zellen wurden für 7 Tage in Medium mit 10 % Nativ-FCS und DHT oder CAS kultiviert. Geringe p21 Expression in Kulturen, die mit 1 % Aktivkohle behandeltem Serum (FCS^Δ) und 10^{-7} M CPA behandelt wurden. Als Kontrolle für das p21 Signal wurde MCF-7 Extrakt eingesetzt aus Zellen, die mit dem Zytostatikum Epirubicin (EPI) behandelt waren. In diesen Zellen war die p21 Expression erhöht im Vergleich zu MCF-7 Zellen, die ohne EPI kultiviert wurden. Aufgetragen wurden jeweils 80 μ g Gesamtprotein. Die Position von p21 ist durch den Pfeil markiert.

Das Fehlen des p21 Anstiegs nach Serum-Entzug war auch im folgenden Experiment mit MFM-223 Zellen auffällig, in dem die Konzentrationen von CAS variiert wurden (**Abb. 32**). In den zugehörigen Kontrollansätzen mit verschiedenen Serumkonzentrationen war keine p21 Expression nachweisbar, obwohl die zweifache Menge Protein als von MCF-7 Zellextrakten für die Gel-Elektrophorese verwendet wurde. Dagegen war mit Zunahme der Wachstumshemmung bei steigender Dosierung von CAS eine vermehrte Expression von p21 sichtbar. Im Extrakt aus MCF-7 Kontrollzellkulturen war p21 deutlich nachweisbar, und bei Wachstumshemmung durch Epirubicin kam es zur vermehrten Expression von p21. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die Hochregulierung von p21 in MFM-223 Zellen durch Serum-Entzug nicht deutlich nachweisbar ist, und daß die Hemmung des Zellwachstums durch CAS jedoch in 1 % FCS zuverlässig mit dem Anstieg von p21 assoziiert ist.

Die Erhöhung der p21 Menge in MFM-223 Zellen entsprach jedoch nicht der starken p53 Akkumulation nach der Behandlung mit CAS (**vergl. Abb. 21, S. 66**), obwohl p21 durch p53 induziert werden kann. Daher ist dieses Ergebnis ein weiterer Hinweis darauf, daß ein Teil der p53 Moleküle auf Grund einer mutationsbedingten Konformationsänderung offenbar nicht zur regulären Induktion von p21 befähigt ist.

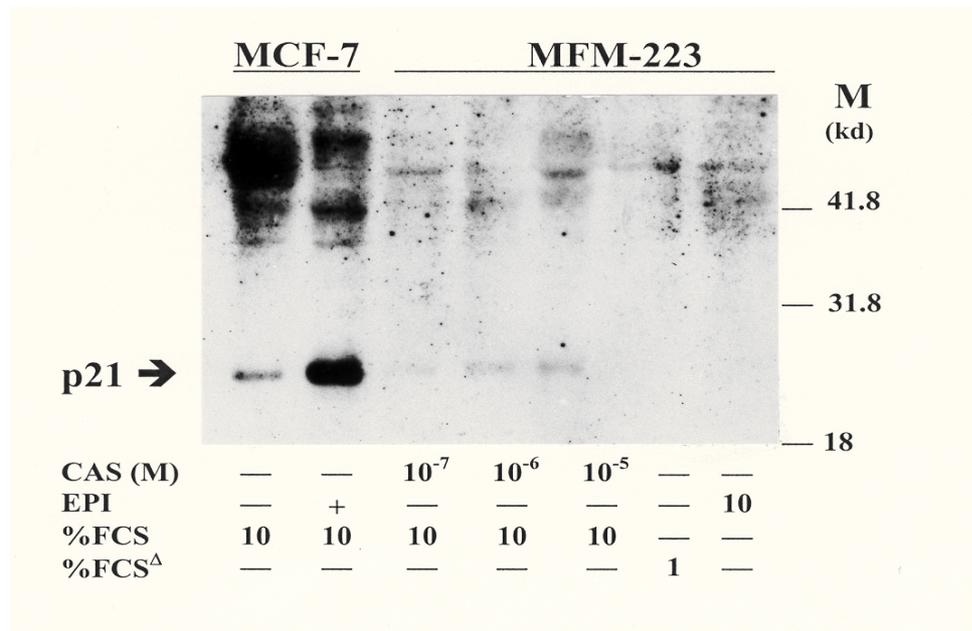


Abb. 32. Steigerung des p21 Gehalts bei MFM-223 Zellen nach Inkubation mit zunehmenden Konzentrationen von CAS, die zur Wachstumshemmung führen. Abwesenheit von p21 bei Reduktion des Zellwachstums durch Serum-Entzug. In der Kontrolle mit dem Zytostatikum Epirubicin (EPI) war p21 in MCF-7 Zellen deutlich erhöht. Es wurden 40 µg Gesamtprotein der Linie MCF-7 und 80 µg Gesamtprotein von MFM-223 Zellextrakten aufgetragen. Das p21 Signal ist durch den Pfeil markiert.

3.7 Apoptose

Der Vorgang der Apoptose wird durch mehrere Signal- und Effektorkaskaden ausgelöst. Auch p53 kann zur Induktion der Apoptose beitragen. So werden Regulator-Proteine wie das auf Mitochondrien gerichtete BAX oder das zellmembranständige FAS, die beide zur Auslösung der Apoptose führen können, durch vermehrtes p53 induziert. In den vorangegangenen Untersuchungen konnte sowohl bei LNCaP, als auch bei MFM-223 Zellen, nach Reduktion des Zellwachstums durch Entzug von Wachstumsfaktoren oder durch Einsatz von antiproliferativ wirkenden endokrinen Faktoren, ein Anstieg des p53 Gehalts bewirkt werden. Die Zellen wurden dabei unter Stress gesetzt, indem Serum entzogen oder eine Behandlung mit Antiandrogenen bzw. DHT durchgeführt wurde. Ein Sonderfall war gegeben bei der Verwendung von CAS, das bei völligem Wachstumsstillstand von LNCaP Zellen in 1 % FCS einen starken Anstieg von MDM-2 hervorrief, jedoch in MFM-223 Zellen wenig Einfluß auf MDM-2 hatte.

3.7.1 Immunzytochemie

In den folgenden Untersuchungen wurde geprüft, ob durch die Behandlung mit hormonellen Wirkstoffen oder mit CAS die Apoptose in LNCaP oder MFM-223 Zellen ausgelöst wird. Zum Nachweis der Apoptose wurde zur Detektion bei Einzelzellen ein immunzytochemisches Verfahren mit Hilfe des TUNEL Assays (ApopTag) gewählt, da voraussichtlich nur wenige Zellen der asynchron wachsenden Kulturen gleichzeitig in die Apoptose gehen. Im biochemischen Nachweis durch Western-Blot Analysen werden dagegen Extrakte von allen Zellen eingesetzt, auch von solchen, die nicht in Apoptose befindlich sind. Mit der immunzytochemischen Methode werden die durch DNA-Fragmentation während der Apoptose neu entstandenen 3'-OH-Enden der DNA-Deoxyribose mit Hilfe einer Fluoreszenz-Markierung durch wachsenden Deoxynukleotid-Einbau sichtbar gemacht. Die Zellen wurden dazu auf Objektträgern kultiviert und mit den jeweiligen Wirksubstanzen behandelt oder einer Serumreduktion unterworfen. Die Kultivationsbedingungen waren die gleichen wie in den vorangestellten Experimenten.

In multiplen Versuchsansätzen wurde die Ausbildung der Apoptose in LNCaP Zellen bei unterschiedlichen Proliferationsbedingungen verglichen (**Abb. 33**). Serumreduktion von 10 % auf 0.1 % Nativ-FCS bewirkte bei LNCaP Zellen einen Wachstumsarrest (**vergl. Abb. 14, S. 51**). Mit dem TUNEL-Assay ließen sich unter denselben Bedingungen apoptotische Zellen feststellen (**Abb. 33 A**). Die in Auflösung befindlichen Kerne dieser

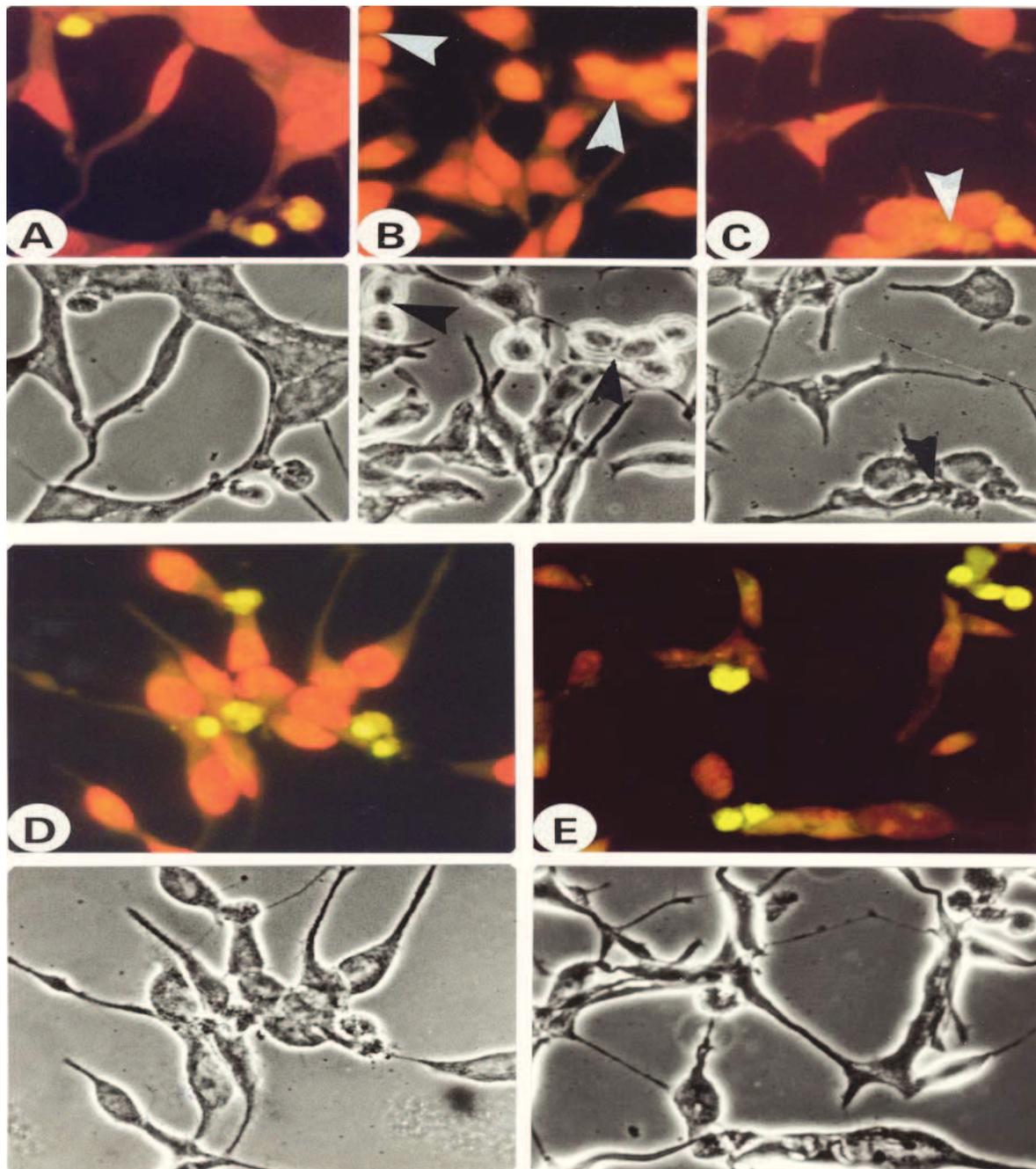


Abb. 33. Bestimmung der Apoptose im TUNEL-Assay bei LNCaP-Monolayer Kulturen. (A) Immunfluoreszenz, apoptotische Zellen bei Wachstumsarrest durch Serumentzug (0.1 % FCS). (B) Apoptosefreie Kontrollkultur unter regulären Wachstumsbedingungen in 10 % Nativ-FCS teilweise jedoch mit abgelösten Zellen (Pfeile). (C) Negativ-Kontrolle (ohne Enzym) mit abgestorbenen Zellen (Pfeil), die in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem FCS kultiviert waren. (D) Apoptose-Zellen nach Inkubation der Kultur in 1 % Aktivkohle behandeltem FCS sowie (E) bei zusätzlicher Anwesenheit von 10^{-7} M CAS. Nach der Anwachsphase von 2 Tagen wurde das Wachstumsmedium gegen das entsprechende Medium ausgetauscht. Die Inkubationsdauer betrug 10 Tage unter den jeweiligen Bedingungen. Abgebildet sind Immunfluoreszenz mit Propidiumjodid als Gegenfärbung (oben) und Phasenkontrast desselben Bildausschnitts (unten). 600x.

Zellen sind als grünfluoreszierende Flecken sichtbar (oben), während im Phasenkontrast (unten) desselben Bildausschnitts die apoptotischen Zellen an der teilweise abgelösten Struktur zu erkennen sind. In der Kontrollkultur, die in 10 % Nativ-FCS kultiviert war, fanden sich keine apoptotischen Zellen, obwohl sich auch abgelöste Zellen in der Kultur befanden, deren Zellkörper allerdings intakt erschien, und die möglicherweise in Teilung begriffen waren (**Abb. 33 B**). Der Anteil apoptotischer Zellen war in 0.1 % FCS um das Vierfache höher als in 10 % FCS (**vergl. Tab. 8, S. 88**). Zur Kontrolle des TUNEL-Assays wurde eine Objektträger-Kultur in Medium mit 1 % FCS verwendet, zu der alle Bestandteile des Reaktionsgemisches hinzugefügt wurden, jedoch nicht das DNA-Ketten verlängernde Enzym (Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase) (**Abb. 33 C**). Der Vergleich der Immunfluoreszenz (oben) mit demselben Bild-Ausschnitt im Phasenkontrast (unten) zeigt nur eine sehr geringfügige Anfärbung von apoptotischen Zellen. Entsprechend der äußerst geringen Anzahl apoptotischer Zellen in Medium mit 10 % FCS hatte sich die LNCaP Zellzahl unter den regulären Wachstumsbedingungen vermehrt, während in gehemmten Kulturen kein Zellzuwachs zu verzeichnen war. Es muß daher in 0.1 % FCS nahezu ein Gleichgewicht zwischen Apoptose und Zellteilung bei diesen LNCaP Kulturen geben, da die Zellzahl während des Versuchs nicht unter die Ausgangszellzahl abgefallen war (**vergl. Abb. 14, S. 51**). Der Anteil apoptotischer Zellen in LNCaP Kulturen in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem Serum (**Abb. 33 D**) war mit 7 % annähernd gleich dem Anteil von 6 % in Medium mit 0.1 % FCS (**Tab. 8, S. 88**). Das Wachstum von LNCaP Zellen war in 1 % Serum auf etwa 14 % reduziert, im Vergleich zu unbehandelten Zellen in 10 % Nativ-FCS. (**vergl. Abb. 11 A und B, S. 44**). Demgegenüber kam es zum völligen Stillstand der Proliferation in 0.1 % FCS (**vergl. Abb. 14 B, S. 52**). Offenbar ist der Anteil von apoptotischen LNCaP Zellen im kompletten Zellarrest nicht weiter gesteigert als bei Hemmung des Zellwachstums in 1 % Serum (**vergl. Abb. 11 A u. B, S. 44**).

Durch den Zusatz von 10^{-7} M des nicht-steroidalen Antiandrogens CAS in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem FCS ließ sich die LNCaP-Zellproliferation auf 64 % reduzieren, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (**Tab. 8, S. 88**). Entsprechend konnte in Objektträger-Kulturen, die mit CAS kultiviert waren, eine deutliche Zunahme von apoptotischen Zellen gezeigt werden (**Abb. 33 E; Tab. 8, S. 88**). Der Anteil apoptotischer Zellen verdoppelte sich nahezu von 7 % bei der Kontrolle in 1 % Serum auf 12 % in CAS-behandelten Kulturen, während das Wachstum jedoch nur auf 2/3 der entsprechenden Kontrolle reduziert war (**vergl. Abb. 11, S. 44**). Dieses Ergebnis läßt den

Schluß zu, daß das nicht-steroidale Antiandrogen CAS an der Auslösung der Apoptose in LNCaP Zellen im stärkerem Maße beteiligt ist, als an der Hemmung des Zellwachstums. Die Behandlung mit DHT oder dem steroidalen Antiandrogen CPA führte in LNCaP Zellkulturen zu einer deutlichen Wachstumssteigerung, daher konnte in diesen Kulturen nur ein sehr geringer Anteil apoptotischer Zellen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, daß der Anteil apoptotischer Zellen bei LNCaP Kulturen infolge der Hemmung des Wachstums durch Serumreduktion oder nach Behandlung mit CAS ansteigt, während nach einer Stimulation der Proliferation durch die Wirksubstanzen DHT oder CPA, ebenso wie bei den Kontrollkulturen in 10 % FCS, kaum apoptotische Zellen nachzuweisen sind (**Tab. 8, S. 88**). Entsprechend verhielt sich der p53 Gehalt in LNCaP Zellen. Die Hemmung der Proliferation korrelierte mit der Akkumulation von p53, und eine gesteigerte Proliferation war mit der Abnahme des p53 Gehalts in diesen Zellen assoziiert (**Abb. 16, S. 54 u. Abb. 17, S. 56**).

Das Wachstum von MFM-223 Zellen ließ sich ebenfalls durch Serumreduktion und Hormonbehandlung deutlich beeinflussen. Nach Hemmung der Proliferation von multiplen MFM-223 Kulturen durch 10^{-8} M DHT oder 10^{-7} M CAS in 10 % FCS konnten mit dem TUNEL Assay ebenfalls apoptotische Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 34 B und C**). MFM-223 Zellen, deren Wachstum durch die Behandlung mit DHT oder dem Antiandrogen CAS partiell gehemmt war, zeigten eine deutliche Zunahme an apoptotischen Zellen, gegenüber der Kontrollkultur in 10 % FCS (**Abb. 34 A**). So betrug der Anteil apoptotischer Zellen in DHT-behandelten Kulturen 7 % und in CAS-behandelten Kulturen 8 %, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (**Tab. 8, S. 88**). Allerdings war der Anstieg von apoptotischen Zellen nach Zusatz von DHT relativ gering, im Vergleich zur Wachstumshemmung auf 42 % der entsprechenden Kontrollkultur durch das Androgen (**vergl. Abb. 19, S. 61**). Der Zusatz von 10^{-7} M CAS in 10 % FCS hatte mit 77 % einen geringeren Hemmeffekt auf das Zellwachstum im Vergleich zur Behandlung mit 10^{-8} M DHT, der Anteil apoptotischer Zellen war jedoch vergleichbar (**Tab. 8, S. 88**). Die Wachstumsreduktion durch die Behandlung mit DHT oder CAS war demnach in MFM-223 Zellen nicht streng an die Induktion von Apoptose gekoppelt. Es müssen also zusätzlich andere Mechanismen als die Apoptose-"Pathways" zur Verminderung der Proliferation der MFM-223 Zellen beitragen.

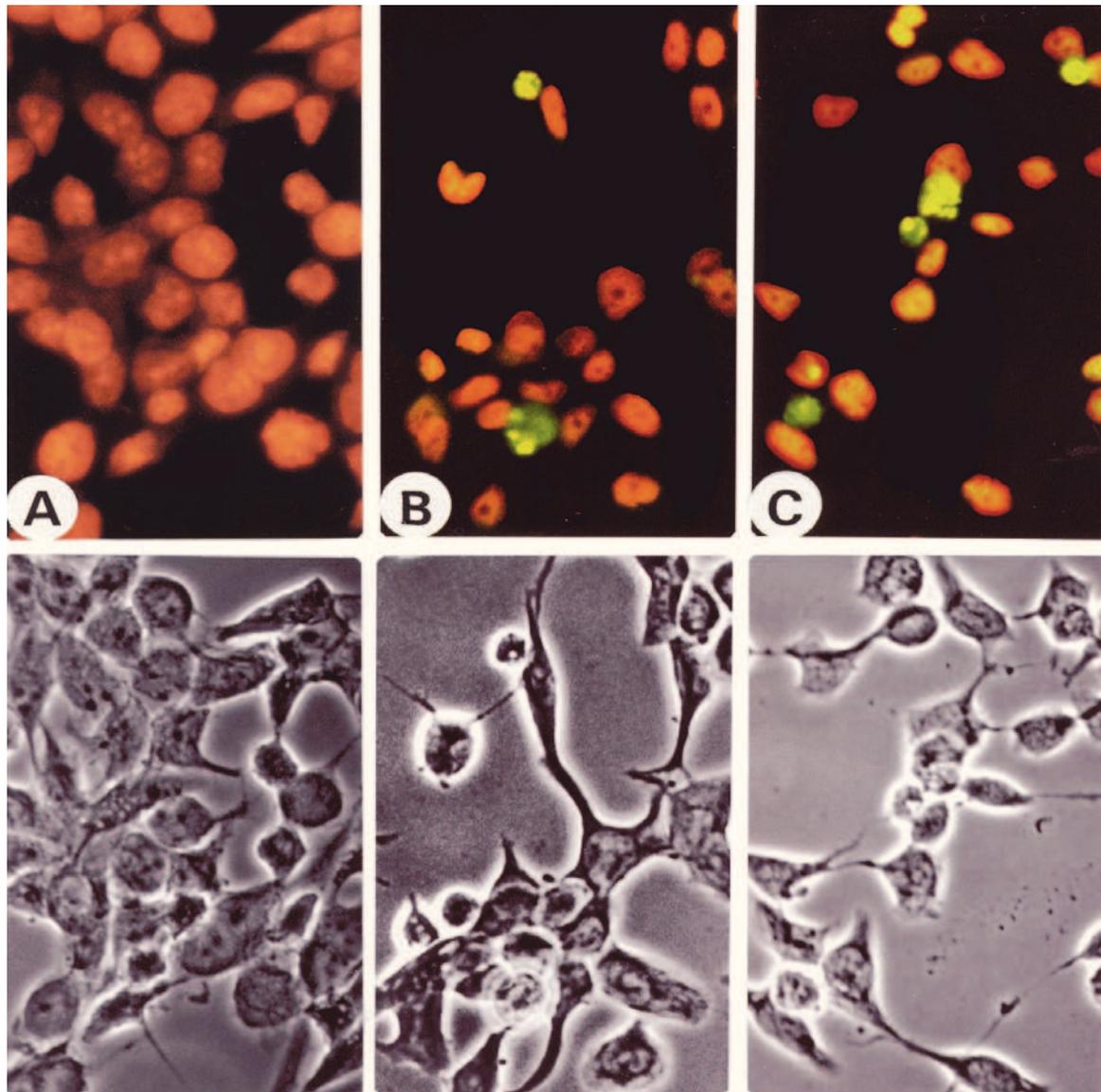


Abb. 34. Apoptose bei MFM-223 Mammakarzinomzellen. **(A)** Fehlen von apoptotischen Zellen unter regulären Wachstumsbedingungen in 10 % Nativ-FCS. **(B)** Zellen in Apoptose bei partieller Hemmung des Wachstums in 10^{-8} M DHT oder CAS in 10 % Nativ-FCS **(C)**. Die Zellen wurden nach der Anwachsphase von 2 Tagen für 7 Tage unter den jeweiligen Bedingungen kultiviert, fixiert und im TUNEL-Assay analysiert. Abgebildet sind Immunfluoreszenz und Kernfärbung mit Propidiumjodid (oben) sowie Phasenkontrast desselben Bildausschnitts (unten). 600x.

Tab. 8 Anteil von apoptotischen Monolayer-Zellen der Linien LNCaP und MFM-223 immunzytochemisch dargestellt mit Hilfe des TUNEL-Assays (ApopTag) in Abhängigkeit vom Wachstumszustand (jeweils 200 Zellen ausgezählt)

LNCaP		
Variation der Serumkonzentrationen	% apoptotische Zellen	% Wachstum ⊗
10 %	1.5	100
0.1 %	6	0
10%*	0.5	118
10 ⁻⁷ M Hormonzusatz in 1 % FCS ^Δ	% apoptotische Zellen	% Wachstum ⊗⊗
ohne Hormon	7	100
10 ⁻⁷ M DHT	1.5	475
10 ⁻⁷ M CPA	1	262
10 ⁻⁷ M CAS	12	64
MFM-223		
Hormonzusatz	% apoptotische Zellen	% Wachstum ⊗⊗⊗
10 % FCS Nativ ohne Hormon	1	100
10 ⁻⁸ M DHT in 10 % FCS	7	42
10 ⁻⁷ M CAS in 10 % FCS	8	77
1 % FCS ^Δ ohne Hormon	4	100
10 ⁻⁷ M CPA in 1 % FCS ^Δ	2	300

10 %* = restimuliert nach 4 Tagen (0.1% ⇒ 10% Serum)

FCS^Δ = Aktivkohle behandeltes FCS

⊗ = Proliferation zwischen Tag 5-12 der Inkubation

⊗⊗ = Proliferation nach Anwachsphase von 2 Tagen und 10-tägiger Inkubation mit der jeweiligen Wirksubstanz (**vergl. Abb. 10, S. 41; Abb. 11, S. 44**)

⊗⊗⊗ = Proliferation nach Anwachsphase von 2 Tagen und 7-tägiger Inkubation mit der jeweiligen Wirksubstanz (**vergl. Abb. 19, S. 61**)

3.7.2 Apoptose assoziierte Proteine

3.7.2.1 BAX

In den vorangestellten Experimente konnte mit Hilfe des TUNEL-Assays gezeigt werden, daß in LNCaP sowie in MFM-223 Zellen nach Hemmung des Wachstums durch Serumreduktion oder durch die bereits vorgestellten hormonellen Faktoren Apoptose ausgelöst wurde. An der Induktion der Apoptose ist eine Reihe von Proteinen in den entsprechenden "Pathways" beteiligt, die für die geprüften Zelllinien bei den hier untersuchten Konstellationen der Wachstumshemmung bisher nicht analysiert sind. Daher wurde in den folgenden Experimenten an Extrakten aus LNCaP und MFM-223 Zellen die Anwesenheit der Apoptose assoziierten Proteine BAX, BCL-2 und Caspase 8 mit Hilfe von Western-Blot Analysen untersucht. Die Proteinextrakte wurden aus Zellen hergestellt, deren Wachstum durch Serumentzug, Hormone, Antihormone oder durch CAS verändert war. Es sollten damit also Wachstumszustand, Gehalt an p53 und an p53-assoziierten Proteinen, Apoptose und Vorhandensein von Apoptose induzierten Proteinen miteinander korreliert werden.

Erhöhung von BAX Protein, als ein proapoptotisches Mitglied der BCL-2 Familie, kann eine Induktion der Apoptose bewirken. Dabei sollte die angestiegene BAX Expression weitgehend der p53 Erhöhung bei Hemmung des Wachstums der Zellen entsprechen. Zur Klärung dieser Frage wurden die Zellen einer Serumreduktion unterworfen oder mit den jeweiligen Wirksubstanzen unter denselben Kultivationsbedingungen wie in den vorangestellten Experimenten behandelt. Die Untersuchung ergab bei LNCaP Zellen, nach Hemmung des Wachstums durch Serum-Reduktion von 10 % auf 0.1 %, einen Anstieg des BAX Proteins etwa auf das Doppelte im Vergleich zur Kontrolle mit Zellen in 10 % FCS (**Abb. 35 A**). In ähnlicher Weise enthielten LNCaP Zellen vermehrt p53 (**vergl. Abb. 16, S. 54 u. Abb. 18, S. 58**). Entsprechend war in LNCaP Zellen, die mit 0.1 % FCS behandelt waren, eine erhöhte Apoptoserate nachzuweisen (**vergl. Tab. 8, S. 88**). Der BAX Gehalt war in LNCaP Zellen, die zunächst durch 0.1 % FCS im Wachstum arretiert waren und durch erneute Zugabe von 10 % FCS restimuliert wurden, gegenüber der Kontrolle mit kontinuierlicher Anwesenheit von 10 % FCS leicht erhöht. Im TUNEL-Assay konnten in vergleichbar behandelten LNCaP Zellen demzufolge nur wenig apoptotische Zellen nachgewiesen werden (**vergl. Tab. 8, S. 88**). Vergleicht man in LNCaP Zellen die p53 Expression mit der Proliferation nach Reduktion der Serumkonzentration, so war bei der Wachstumshemmung der BAX Gehalt zusammen

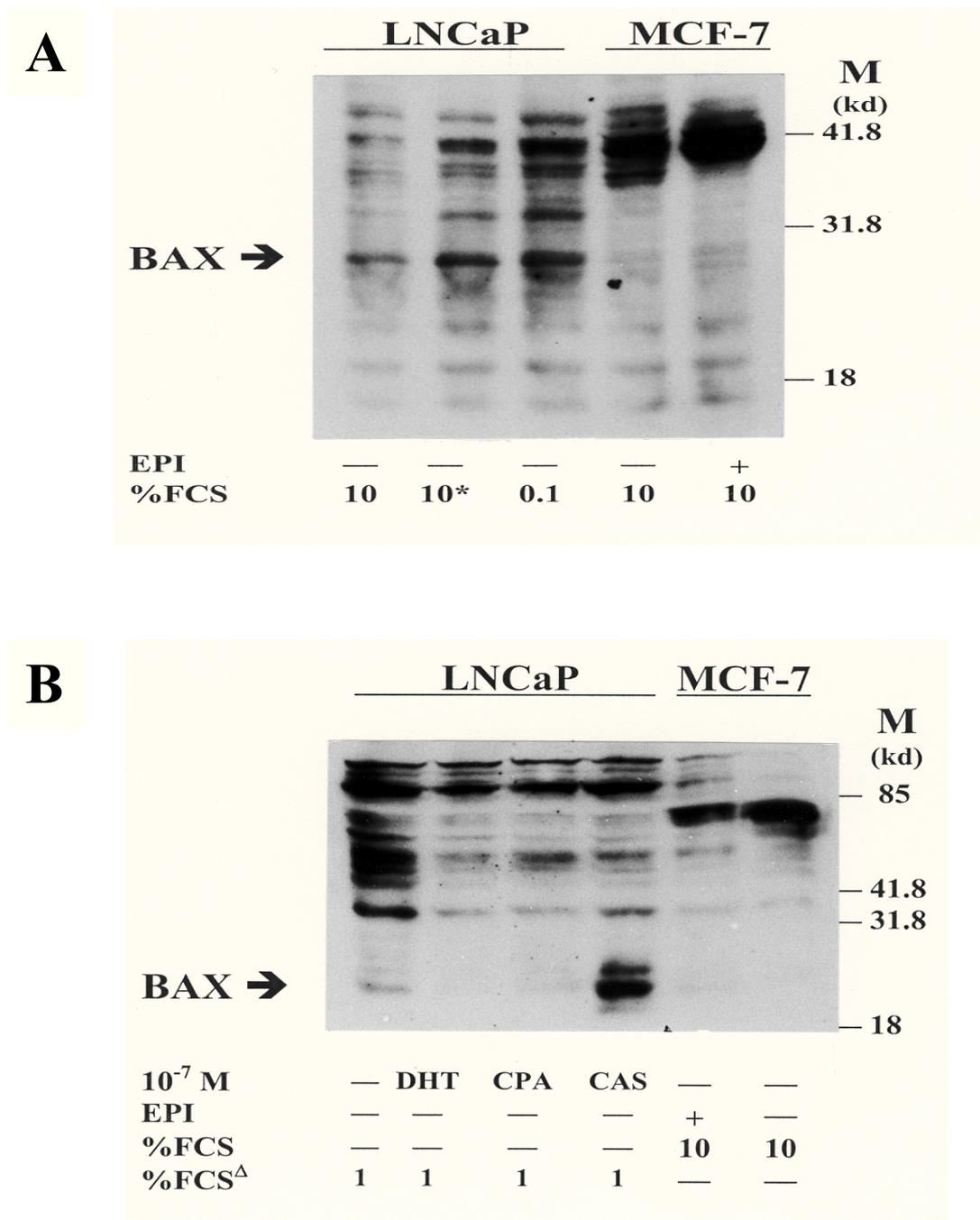


Abb. 35. Expression von BAX bei Modulation des Wachstums von LNCaP oder MCF-7 Zellen. **(A)** Anstieg von BAX Protein bei Arretierung des Wachstums in 0.1 % FCS oder nach Restimulation mit 10 % FCS (10*) für 4 Tage nach der vorhergehenden 4-tägigen Inkubation in 0.1 % FCS. Behandlung der Zellen für insgesamt 10 Tage (vergl. Abb. 14 A-C, S. 51). **(B)** Vermehrte Expression von BAX in LNCaP Zellen nach Wachstumshemmung bei 10-tägiger Einwirkung von 10^{-7} M CAS. Reduzierte Menge an BAX Protein unter der proliferativen Wirkung von DHT oder CPA im Vergleich zur Inkubation in 1 % FCS. Keine Reaktion bei MCF-7 Zellen nach 5-tägiger Behandlung mit 4 ng/ml Epirubicin (EPI). Es wurden jeweils 80 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Apparentes Molekulargewicht von BAX bei 21 kD (Pfeil).

mit p53 im Vergleich zur Kontrolle in 10 % FCS (**vergl. Abb. 16, S. 54 u. Abb. 35 A, 35 B**) angestiegen. Dies steht im Einklang mit der vermuteten Hochregulation von BAX durch p53 in LNCaP Zellen. In Zellen der zum Vergleich herangezogenen Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 war nach wachstumshemmender Behandlung mit dem Zytostatikum Epirubicin kein Anstieg des BAX Proteins gegenüber der unbehandelten Kontrolle festzustellen. Möglicherweise haben MCF-7 Zellen einen Defekt in der Regulation der BAX Expression.

Im Bereich von ca. 35-50 kD wurde eine Reihe anderer Proteine durch das Detektionssystem erkannt, deren Gehalt sich in LNCaP Extrakten in Abhängigkeit vom Wachstumszustand der Zellen veränderte (**Abb. 35 A**). In MCF-7 Zellextrakten waren im Bereich von 35-50 kD sehr starke Signale nachzuweisen, deren Intensität kaum in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Zellen variierte. In der Produktinformation über den verwendeten polyklonalen BAX Antikörper [bax (Ab-1), Fa. Oncogene, 1998] sind unspezifische Reaktionen mit Proteinen in diesen Molekulargewichtsbereichen beschrieben. Die in diesen Versuchen zusätzlich detektierten Banden waren somit als unspezifisch anzusehen.

Bei Hemmung des LNCaP Zellwachstums mit dem Antiandrogen CAS in 10^{-7} molarer Konzentration erfolgte ein deutlicher Anstieg des BAX Proteins (**35 B**). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis war in LNCaP Kulturen nach Stimulation der Proliferation mit DHT oder CPA kaum BAX Protein nachzuweisen. Ebenso war die p53 Expression in diesen DHT- oder CPA-behandelten LNCaP Zellen sehr gering im Vergleich zu CAS-behandelten Zellen oder in der Kontrolle mit 1 % Aktivkohle behandeltem Serum (**vergl. Abb. 17, S. 56**). Entsprechend enthielten LNCaP Zellkulturen nach Kultivierung mit DHT oder CPA kaum apoptotische Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in 1 % FCS (**vergl. Tab. 8, S. 88**). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit dem vermehrten Auftreten von apoptotischen Zellen nach Kultivierung in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem Serum ohne den Zusatz von 10^{-7} M DHT oder CPA. Gegenüber der unbehandelten Kontrolle in 1 % Aktivkohle behandeltem FCS mit 7 % apoptotischen Zellen war ein Anstieg von Zellen in Apoptose auf 12 % nach Zusatz von CAS zu verzeichnen (**vergl. Tab. 8, S. 88**). Dementsprechend war auch die p53 Expression in den CAS-behandelten LNCaP Kulturen stärker vermehrt als in den Kontrollzellen mit 1 % Aktivkohle behandeltem FCS (**vergl. Abb. 17, S. 56**). Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß in LNCaP Zellen die erhöhte Anwesenheit von p53 und von BAX Protein in gleichsinniger Weise mit dem Auftreten der Apoptose und mit der Hemmung der

Proliferation korreliert. Dies gilt nicht für MCF-7 Zellen, deren Wachstum durch Epirubicin reduziert wird. In MCF-7 Zellen war in diesen Untersuchungen jedoch keine Vermehrung von BAX Protein mit ca. 21 kD nachzuweisen, wohl aber BAX-ähnliches, unbekanntes Protein mit höheren Molekulargewichten. Offenbar ist der mitochondriale Weg zur Apoptose-Induktion über das BAX Protein in MCF-7 Zellen tiefgreifend gestört.

In MFM-223 Zellen ließ sich bei Hemmung des Wachstums ebenfalls vermehrt Apoptose auslösen. Die Western-Blot Untersuchungen zeigten eine vermehrte Expression von BAX in MFM-223 Kulturen, deren Wachstum durch den Zusatz von 10^{-8} M DHT oder von 10^{-7} M CAS in Medium mit 10 % Nativ-FCS reduziert war (**Abb. 36**). Nach Zusatz von CAS war der BAX Gehalt höher als in DHT-behandelten Kulturen, obwohl das Wachstum durch 10^{-8} M DHT stärker reduziert war, als nach Behandlung mit 10^{-7} M CAS (**vergl. Abb. 19, S. 61**). Beide Substanzen konnten in MFM-223 Zellen Apoptose auslösen (**Tab. 8, S. 88**). Nach Behandlung mit 10^{-7} M CAS waren trotz 10-fach höherer Dosierung nur 1 % mehr apoptotische Zellen als nach Zugabe von 10^{-8} M DHT nachzuweisen. Möglicherweise werden durch die DHT Behandlung in MFM-223 Zellen alternative Wege zur stärkeren Reduktion des Wachstums als durch CAS angeschaltet, da sich die Apoptose-Raten im TUNEL-Assay und die BAX Vermehrung nach Behandlung mit DHT oder CAS im Vergleich zur Wachstumshemmung nicht entsprechen.

Ähnliches gilt auch für den p53 Gehalt. Nach Behandlung mit 10^{-7} M des Antiandrogens CAS war p53 deutlich erhöht gegenüber den durch 10^{-8} M DHT-gehemmten MFM-223 Kulturen (**vergl. Abb. 20, S. 64**). In MFM-223 Zellen, die mit 1 % Aktivkohle behandeltem Serum kultiviert wurden, war die Anzahl der apoptotischen Zellen, verglichen zur Kontrolle mit 10 % Nativ-FCS, um 3 % erhöht (**vergl. Tab. 8, S. 88**). Entsprechend konnte eine Vermehrung des BAX Proteins in Zellen, die mit 1 % Aktivkohle behandeltem FCS kultiviert wurden, festgestellt werden. Wie die vorherigen Untersuchungen gezeigt haben, war in 1 % FCS der p53 Gehalt in MFM-223 Zellen im Vergleich zur Kontrolle in 10 % Nativ-FCS erhöht (**vergl. Abb. 20, S. 64**). Der Zusatz von 10^{-7} M CPA in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem FCS führt bei MFM-223 Zellen zu einer Wachstumssteigerung und einer Verringerung der Anzahl apoptotischer Zellen im TUNEL Assay (**vergl. Tab. 8, S. 88**). Dementsprechend zeigte die Western-Blot Analyse eine höhere BAX Expression in CPA-behandelten Zellen im Vergleich zu MFM-223 Kulturen, die in 1 % Aktivkohle behandeltem FCS ohne Wirkstoffzusatz kultiviert wurden (**Abb. 36**). Abschließend läßt sich feststellen, daß die vermehrte Anzahl apoptotischer Zellen im TUNEL-Assay und die gesteigerte Anwesenheit von p53 mit der

Hochregulierung des BAX Gehalts bei MFM-223 Zellen korrelierten. Eine Ausnahme stellen die DHT-behandelten MFM-223 Kulturen dar, deren extreme Wachstumshemmung (**Abb. 19, S. 61**) offenbar möglicherweise auch durch andere zellzyklusregulierende Faktoren beeinflusst wird. In den Western-Blot Analysen zur BAX Expression an MFM-223 Zellextrakten wurden wie in den vorherigen Analysen an LNCaP Zellextrakten eine Reihe weiterer Proteine im Bereich von 35-50 kD detektiert. Die Verteilung dieser Proteine war vergleichbar mit der in LNCaP Zellextrakten. Diese wurden bei MFM-223 Zellen, wie bei LNCaP Zellen nicht reguliert und sind daher als unspezifisch anzusehen (**vergl. Abb. 35 A u. Abb. 36**).

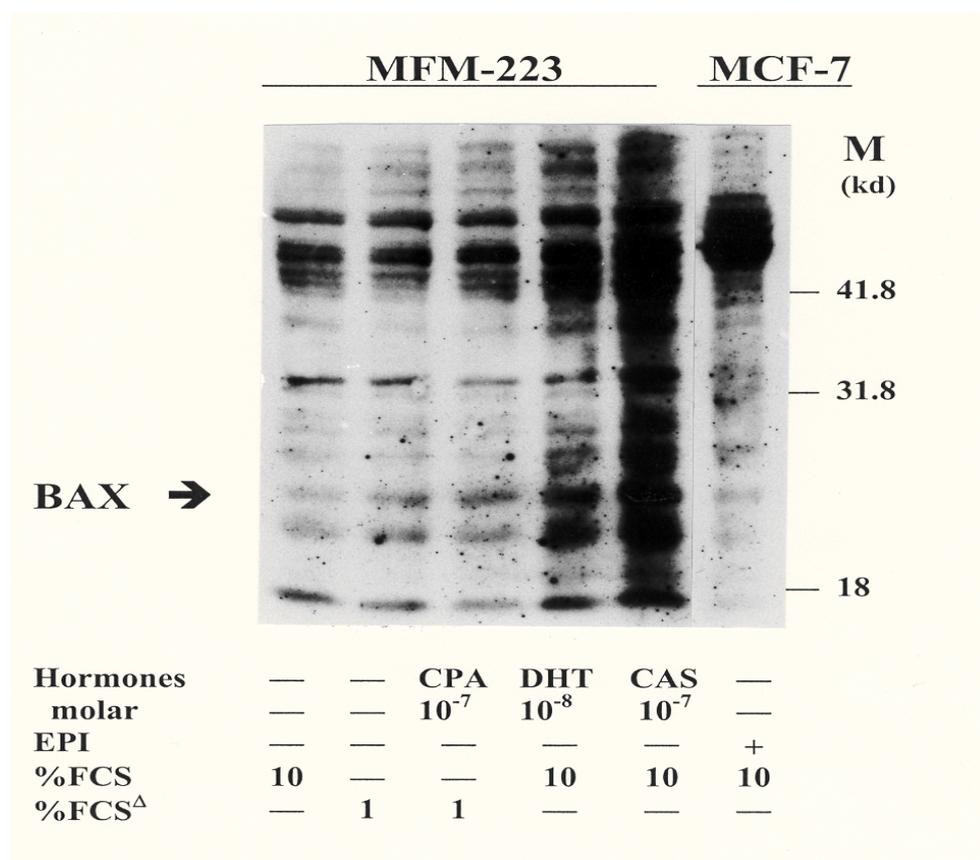


Abb. 36. Erhöhte Menge an BAX Protein in MFM-223 Zellen bei reduziertem Wachstum nach 7-tägiger Inkubation in 1 % FCS oder in Medium mit 10 % Nativ-FCS und 10^{-8} M DHT bzw. 10^{-7} M CAS. Geringer Gehalt von BAX Protein bei wachsenden MFM-223 Zellen in 10 % Nativ-FCS. Aufgetragen wurden jeweils 80 μ g Gesamtprotein. Die Position von BAX ist durch den Pfeil markiert. Der Antikörper gegen BAX Protein (Ab-1; Oncogene) detektiert eine größere Anzahl unspezifischer Proteine besonders bei Inkubation mit DHT oder CAS in 10 % Nativ-FCS.

3.7.2.2 BCL-2

Anders als BAX Protein, das die Einleitung der Apoptose unterstützt, führt eine vermehrte Anwesenheit von BCL-2 zur Inhibition des programmierten Zelltods. BCL-2 und BAX dimerisieren (Yang and Korsmeyer, 1996). Durch diese Bindung verlieren die Proteine ihre Funktion. Das Mengenverhältnis der freien Proteine zueinander ist daher maßgeblich für die Inhibition oder Induktion der Apoptose. Überwiegt die Menge an freiem BCL-2 Protein, so wird der programmierte Zelltod nicht ausgelöst. Ist jedoch die BAX Menge größer als der BCL-2 Gehalt, so wird Apoptose eingeleitet. In den folgenden Western-Blot Analysen wurde dieser Zusammenhang durch die Bestimmung der BCL-2 Menge nach Manipulation des Zellwachstums überprüft. Zudem wird die Expression von BCL-2, wie schon in der Einleitung beschrieben, durch Erhöhung von p53 reprimiert. Eine Abnahme des BCL-2 Gehalts sollte daher bei Wachstumshemmung der Zellen in ähnlicher Weise wie die Erhöhung von p53 zu beobachten sein.

Die Western-Blot Analysen zur Bestimmung des BCL-2 Gehalts ergaben nach Manipulation des LNCaP Zellwachstums durch Variation der Serumkonzentration überraschenderweise keine wesentliche Änderung der BCL-2 Expression (**Abb. 37**). Die Proliferation von LNCaP Zellen wurde jedoch durch den Entzug von Wachstumsfaktoren des Serums nachweislich gehemmt (**vergl. Abb. 14 B, S. 51**). Eine Hochregulierung von p53 war nach Arretierung der Proliferation durch Serum-Entzug in LNCaP Zellen ebenfalls zu beobachten (**vergl. Abb. 16, S. 54 u. Abb. 18, S. 58**). Dagegen wurde die BCL-2 Expression in LNCaP Zellen weder durch die Wachstumshemmung bei Serum-Entzug noch durch den gesteigerten p53 Gehalt beeinflusst. Demnach ist eine Regulation von BCL-2 durch p53 in LNCaP Zellen unter diesen Bedingungen nicht gegeben.

In Zellen der Linie DU-145 wurde kein BCL-2 Protein nachgewiesen (**Abb. 37**), und mit Hilfe des TUNEL-Assays wurde in Serum-reduzierten DU-145 Zellkulturen keine Apoptose nachgewiesen. Daher kann eine mögliche Überexpression von BCL-2 nicht der Grund für das Ausbleiben der Apoptose in diesen Zellen sein. Das Wachstum von DU-145 Zellen wurde durch Reduktion der Serumkonzentration von 10 % auf 0.1 % FCS gehemmt. Allerdings konnte durch Serum-Entzug die Proliferation bei DU-145 Zellen nicht wie bei LNCaP Zellen vollständig arretiert werden (**vergl. Abb. 14, S. 51 A u. B**). Gleichzeitig war jedoch ein sehr starker Anstieg des p53 Gehalts in wachstumsretardierten DU-145 Zellen zu verzeichnen (**vergl. Abb. 16, S. 54**). Wie von anderer Seite gezeigt wurde (Carroll et al., 1993) ist das p53 Gen in DU-145 Zellen mutiert (**vergl. Tab. 2, S. 14**), und eine Regulation von p53 abhängigen und den Zellzyklus steuernden Proteinen wie

MDM2 und WAF-1 erfolgte nicht (vergl. Abb. 23, S. 69, Abb. 24, S. 72, Abb. 28, S. 77). Es ist daher denkbar, daß DU-145 Zellen durch den Entzug von Wachstumsfaktoren eine anderweitige, von p53 unabhängige Verlangsamung des Wachstums erfahren, und daß der programmierte Zelltod ausbleibt. Als Positivkontrolle wurden MCF-7 Zellen mitgeführt, die auch unter regulären Wachstumsbedingungen in 10 % FCS ohne Wirkstoffzusatz eine extrem hohe Expression von BCL-2 aufweisen.

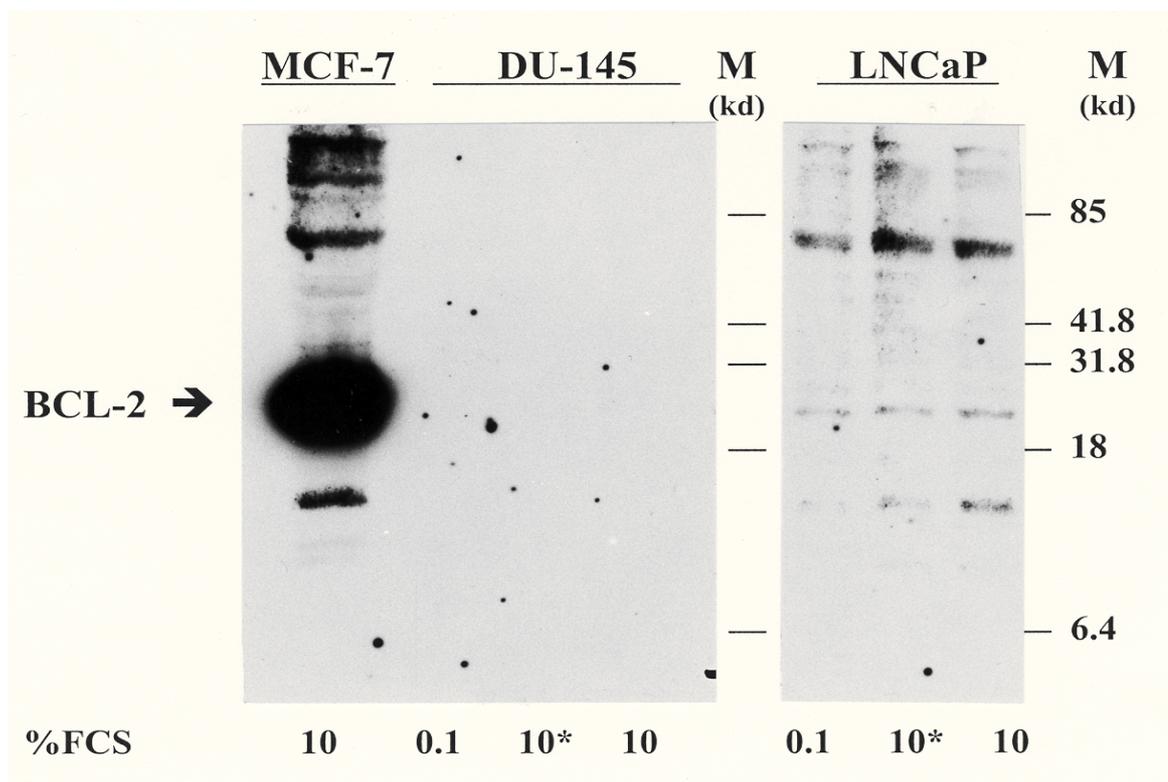


Abb. 37. Nicht detektierbares BCL-2 Protein bei DU-145 Zellen und relativ geringfügige, unveränderte Expression in LNCaP Zellen bei verschiedenen Serumkonzentrationen. Überexpression von BCL-2 in unbehandelten MCF-7 Zellen. Die Inkubationszeit betrug 10 Tage. Es wurden jeweils 80 µg Gesamtprotein aufgetragen. Das apparente Molekulargewicht von BCL-2 Protein liegt bei 24-26 kD (Pfeil).

Wie **Abb. 38 A** erkennen läßt, war in LNCaP Zellen nach Kultivation in Medium mit DHT oder den Antiandrogenen CPA oder CAS ebenfalls keine Änderung der BCL-2 Expression festzustellen. Ebenso war der BCL-2 Gehalt von LNCaP Zellen im Vergleich zur BCL-2 Menge in MCF-7 Zellen relativ gering. Es ist daher festzustellen, daß BCL-2 in LNCaP Zellen zwar exprimiert, jedoch nicht wie das proapoptotische BAX in

Abhängigkeit vom Wachstumszustand der Zellen reguliert wird. Die Western-Blot Analysen zur BCL-2 Expression in MFM-223 Zellen führten zu einem ähnlichen Ergebnis (**Abb. 38 B**). Auch in MFM-223 Zellen blieb eine Regulation der BCL-2 Menge nach Behandlung der Zellen mit DHT oder den Antiandrogenen CPA oder CAS aus. Allerdings war der BCL-2 Gehalt in MFM-223 Zellen etwa doppelt so hoch wie in LNCaP Zellen unabhängig von der Behandlung der Zellen. In MFM-223 Zellen war die BCL-2 Menge jedoch weitaus geringer als die Expression von BCL-2 in MCF-7 Zellen. Nach Kultivierung von MCF-7 Zellen in Medium mit dem Zytostatikum Epirubicin war eine zusätzliche Vermehrung des BCL-2 Gehalts zu beobachten. Im Gegensatz dazu wurde in den eigenen Versuchen der BAX Gehalt durch die Behandlung mit Epirubicin nicht beeinflusst (**vergl. Abb. 35 A u. B., S. 90**). Aus der Literatur ist jedoch bekannt, daß MCF-7 Zellen Apoptose zeigen, obwohl nicht nachgewiesen wurde, daß gleichzeitig eine BAX-Erhöhung vorliegt (Gompel et al., 2000).

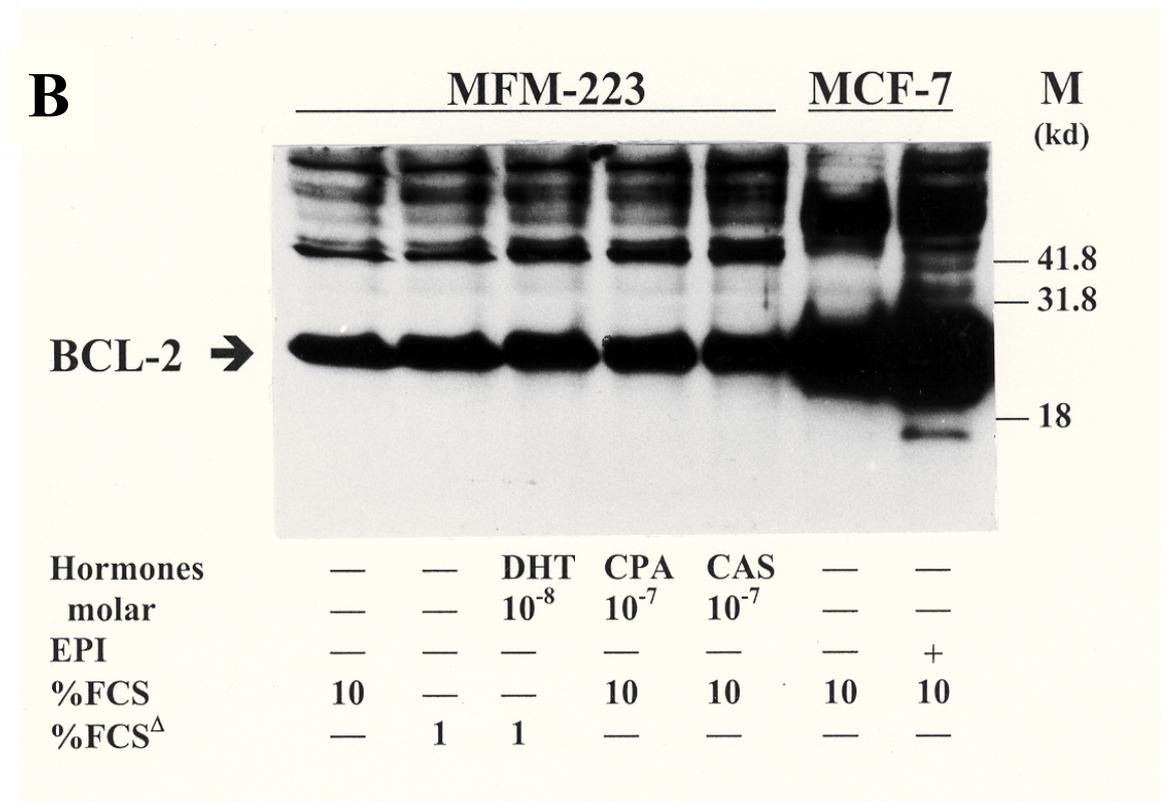
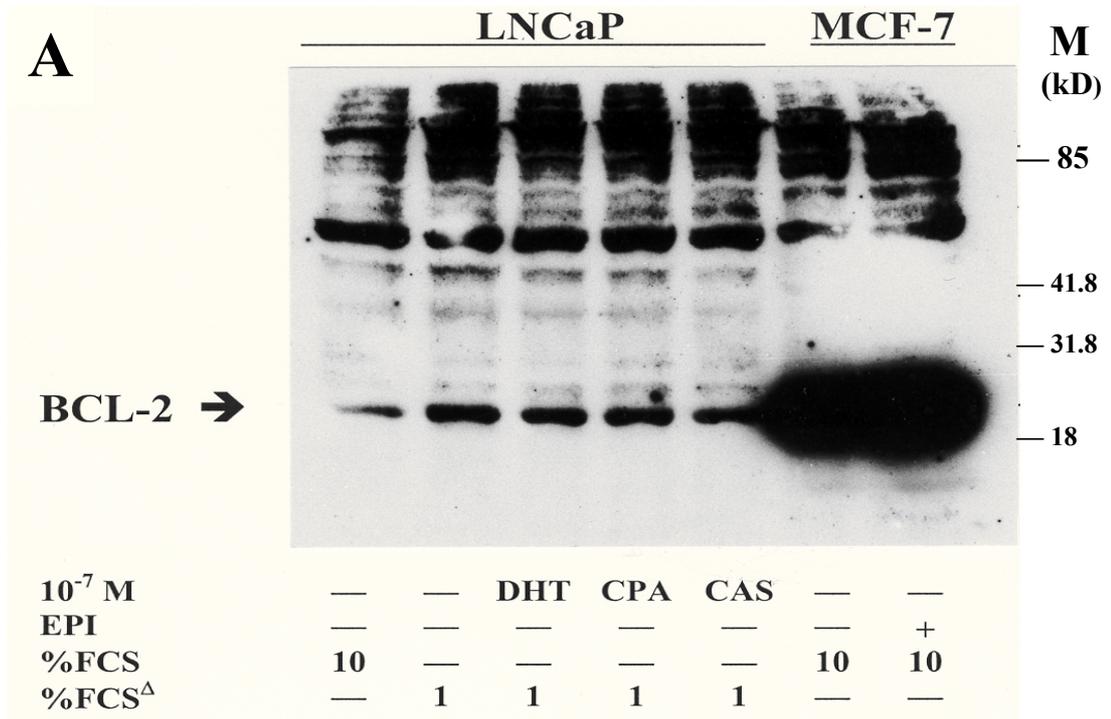


Abb. 38. Unveränderte Menge an BCL-2 Protein in Zellen der Linien LNCaP (A) und MFM-223 (B) nach Inkubation mit den wachstumsregulierenden Faktoren DHT, CPA oder CAS in 1 % Aktivkohle behandeltem FCS bzw. in 10 % Nativ-FCS. Überexpression in MCF-7 Zellen bei An- oder Abwesenheit von Epirubicin (4 ng/ml).

3.7.2.3 Caspase 8

Essentiell für den Vorgang der Apoptose sind die sogenannten Caspasen. Sie bilden die "ICE-like" Proteinase-Familie und gehören zu den Cystein-Proteinasen. Die Caspasen liegen als inaktive Proenzyme in der Zelle vor. Als Reaktion auf ein extra- oder intrazelluläres Signal werden sie durch enzymatische Spaltung aktiviert. Als funktionsfähiges Enzym aktivieren sie dann durch ihre Bindung in kaskadenartiger Weise weitere Mitglieder ihrer Familie. Die aktivierten Caspasen spalten wichtige Zellbestandteile wie z.B. Lamin, Aktin und die poly(ADP)-ribosylierte RNA Polymerase, deren Degradation dann zum Untergang der Zelle beiträgt. Caspase 8 steht am Anfang dieser Enzym-Kaskade.

Im Gegensatz zum pro-apoptotischen BAX und anti-apoptotischen BCL-2 war eine deutliche Regulation der Apoptose induzierenden Caspase 8 in LNCaP Zellen zu beobachten (**Abb. 39 A**). In normal proliferierenden LNCaP Zellen war in Wachstumsmedium (10 % Nativ-FCS) eine sehr geringe Menge an Caspase 8 zu sehen. Die Anzahl apoptotischer Zellen im TUNEL-Assay war unter diesen Wachstumsbedingungen ebenfalls sehr gering (**Tab. 8, S. 88**). Dagegen nahm der Gehalt der Apoptose induzierenden Caspase 8 in LNCaP Zellen zu, die durch den Entzug von Wachstumsfaktoren (1 % Aktivkohle-behandeltes Serum) in der Proliferation gehemmt waren (**vergl. Abb. 11, S. 44**). Entsprechend waren in LNCaP Zellkulturen nach Serumentzug vermehrt apoptotische Zellen nachzuweisen (**Tab. 8, S. 88**). Nach Behandlung mit dem hemmenden Antiandrogen CAS in Medium mit 1 % Aktivkohle-behandeltem FCS (**vergl. Abb. 11, S. 44**) war ein Anstieg des Caspase 8 Gehalts im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (1 % Aktivkohle behandeltes FCS ohne Wirkstoffzusatz) zu beobachten. Die Anzahl apoptotischer Zellen war in Korrelation dazu entsprechend höher als in der unbehandelten Kontrollkultur (**vergl. Tab. 8, S. 88**). Der Zusatz wachstumsfördernder Substanzen wie DHT oder CPA in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem FCS (**Abb. 10, S. 41**) führte dagegen in LNCaP Zellen zu einer geringeren Expression von Caspase 8 im Vergleich zur Kontrolle (1 % Aktivkohle behandeltes FCS ohne Wirkstoffzusatz). Dementsprechend waren in DHT- oder CPA-behandelten Kulturen weitaus weniger apoptotische Zellen mit Hilfe des TUNEL-Assays zu beobachten (**vergl. Tab. 8, S. 88**). Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß das Auftreten von Apoptose in LNCaP Zellen mit dem Caspase 8 Gehalt und dem Wachstumszustand der Zellen korreliert. In proliferierenden Zellen wurde ein geringerer

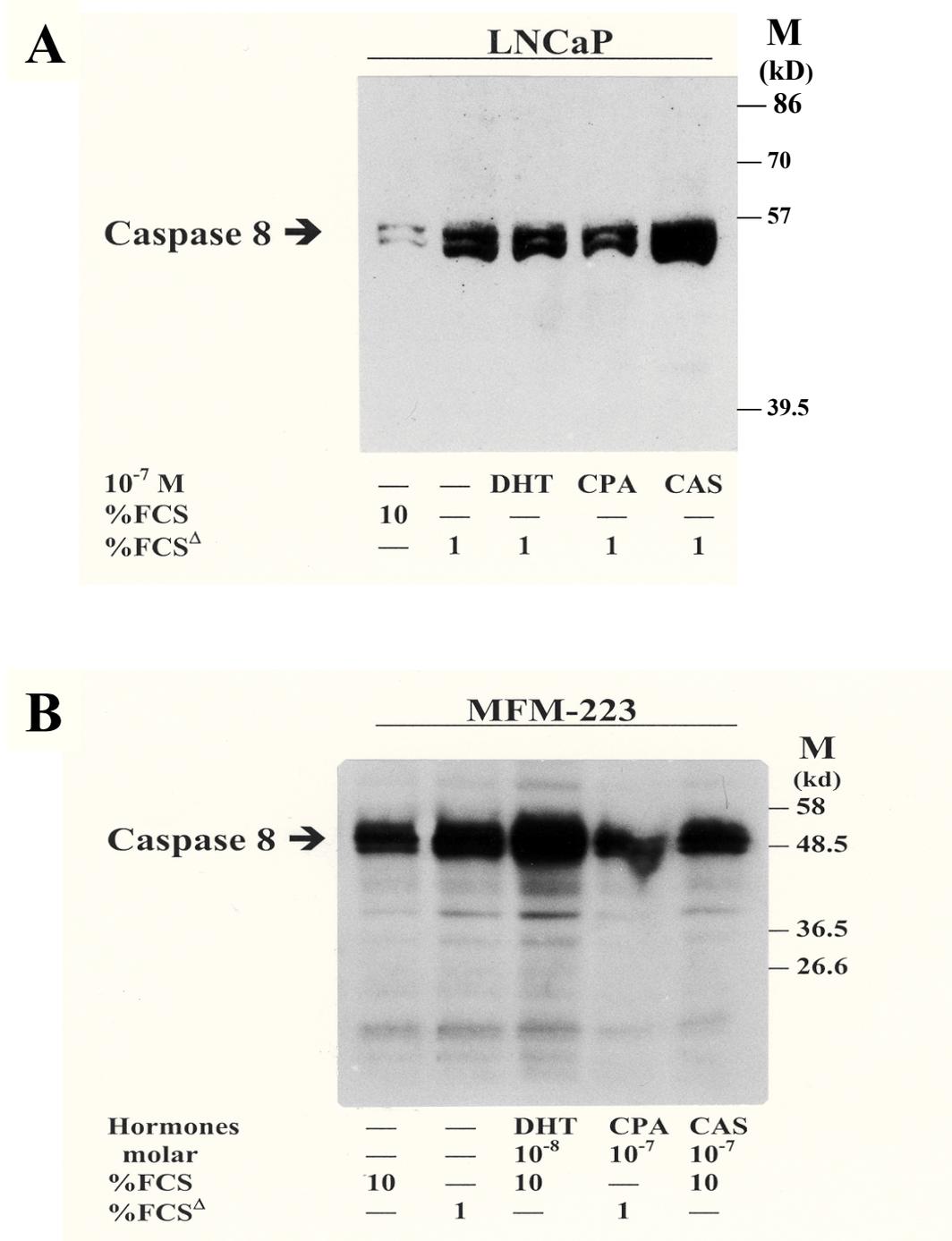


Abb. 39. Expression von Caspase 8 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen in LNCaP und MFM-223 Zellen. **(A)** Down-Regulation bei wachsenden LNCaP Zellen in 10 % FCS. Hoch-Regulation nach Inkubation in 1 % FCS, vermindert in Anwesenheit von wachstumsstimulierenden 10^{-7} M DHT oder CPA, dagegen verstärkte Expression bei Wachstumshemmung durch 10^{-7} M CAS. **(B)** Fehlende Korrelation der Expression von Caspase 8 zur Veränderung des Wachstums von MFM-223 Zellen durch Serum-Entzug oder durch Applikation von endokrinen Faktoren. Es wurden jeweils 80 μ g Gesamtprotein eingesetzt. Das apparente Molekulargewicht von Caspase 8 liegt bei 55 kD (Pfeil).

Gehalt an Caspase 8 und apoptotischen Zellen beobachtet. In wachstumsreduzierten Kulturen wurde dagegen eine vermehrte Expression von Caspase 8 und eine größere Anzahl apoptotischer Zellen nachgewiesen.

Der Gehalt der Apoptose induzierenden Caspase 8 wurde in MFM-223 Zellen ebenfalls in Abhängigkeit vom Wachstumszustand der Zellen reguliert (**Abb. 39 B**). Nach Entzug von Wachstumsfaktoren in 1% Aktivkohle behandeltem FCS wurde das Wachstum von MFM-223 Zellen gehemmt (**Abb. 19, S. 61**). In der Western-Blot Analyse war ein Anstieg des Caspase 8 Proteins, nach Entzug der Wachstumsfaktoren in MFM-223 Zellen, im Vergleich zur Kontrolle mit 10 % Nativ-FCS zu beobachten. Entsprechend war ebenso die Anzahl apoptotischer Zellen im TUNEL-Assay erhöht (**Tab. 8, S. 88**). Nach Zugabe von 10^{-7} M CPA in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem FCS war dagegen eine Wachstumssteigerung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur (1 % Aktivkohle behandeltes FCS) festzustellen (**Abb. 19, S. 61**). In Übereinstimmung damit war der Gehalt des Caspase 8 Proteins in derartig behandelten Kulturen niedriger als in der Kontrolle ohne Zusatz von CPA. Ebenso war die Anzahl apoptotischer Zellen um die Hälfte geringer als in der Kontrolle. Die Zugabe von 10^{-8} M DHT und des Antiandrogens 10^{-7} M CAS in Wachstumsmedium (10 % Nativ-FCS) führte dagegen zu einer Reduktion der Zellproliferation bei MFM-223 Zellen (**Abb. 19, S. 61**). Im Western-Blot war dementsprechend eine Erhöhung des Caspase 8 Proteins nach Kultivierung der Zellen in Medium mit 10^{-8} M DHT oder 10^{-7} M CAS in 10 % Nativ-FCS im Vergleich zur Kontrolle ohne Wirkstoffzusatz zu sehen. Sowohl DHT als auch CAS konnten in MFM-223 Zellen Apoptose induzieren (**Tab. 8, S. 88**). Der Anstieg des Caspase 8 Gehalts war nach Zugabe von DHT allerdings höher als in CAS-behandelten Kulturen, obwohl die Anzahl apoptotischer Zellen im TUNEL-Assay annähernd gleich war (**Tab. 8, S. 88**). Dies steht im Gegensatz zur BAX Expression in MFM-223 Zellen. Der BAX Gehalt war nach Kultivierung der Zellen in DHT geringer als nach Zusatz von CAS (**vergl. Abb. 36, S. 93**). Dieses Ergebnis deutet daraufhin, daß die Induktion der Apoptose in MFM-223 Zellen nach Behandlung mit CAS vermehrt über den mitochondrialen Weg und das BAX Protein eingeleitet wird. Abschließend ist festzuhalten, daß der Gehalt an Caspase 8 Protein auch in MFM-223 Zellen nach Wachstumshemmung erhöht ist, während in proliferierenden MFM-223 Zellen geringere Mengen des Proteins nachzuweisen waren. Somit ist der Caspase 8 Gehalt in MFM-223 mit dem Wachstumszustand der Zellen korreliert.

Tab. 9 p53-Status und die Regulation nachgeordneter Proteine bzw. der Apoptose und des Wachstums bezogen auf die jeweilige Kontrolle

Zelllinien	P53	MDM-2	P21	BAX	BCL-2	CAP-8	FAS	Apoptose	Wachstum
DU-145									
0.1 % FCS	↑↑↑	∅	⊗	⊗	⊗	nd	nd	⊗	↓
LNCaP									
0.1 % FCS	↑	↑	↑	↑	∅	nd	nd	↑	↓
10 % FCS	↓	↓	↓	↓		↓	∅	↓	↑
1 % FCS [∇]	↑	∅	∅	↑	∅	↑	∅	↑	↓
DHT	↓	∅	∅	∅	∅	↓	∅	∅	↑
CPA	↓	∅	∅	∅	∅	↓	∅	∅	↑
CAS	↑↑↑	↑↑↑	↑	↑↑↑	∅	↑↑↑	∅	↑↑↑	↓
MFM-223									
1 % FCS [∇]	↑	↑	∅	↗	∅	↗	∅	↑	↓
CPA 1 % FCS [∇]	↓	↓	∅	↗	∅	↓	∅	∅	↑
DHT 10 % FCS	↑	↑	↑	↑	∅	↑↑↑	↑	↑↑↑	↓
CAS 10 % FCS	↑↑↑	↑	↑	↑↑↑	∅	↑	∅	↑↑↑	↓
MCF-7									
EPI 10 % FCS	nd	nd	↑	∅	↑↑↑↑	nd	nd	nd	nd

nd = nicht durchgeführt
 ⊗ = nicht nachweisbar
 ∅ = unverändert (kein Effekt)
 ↓ = reduziert
 ↗ = gering erhöht
 ↑ = erhöht
 ↑↑ = stark erhöht
 ↑↑↑ = sehr stark erhöht

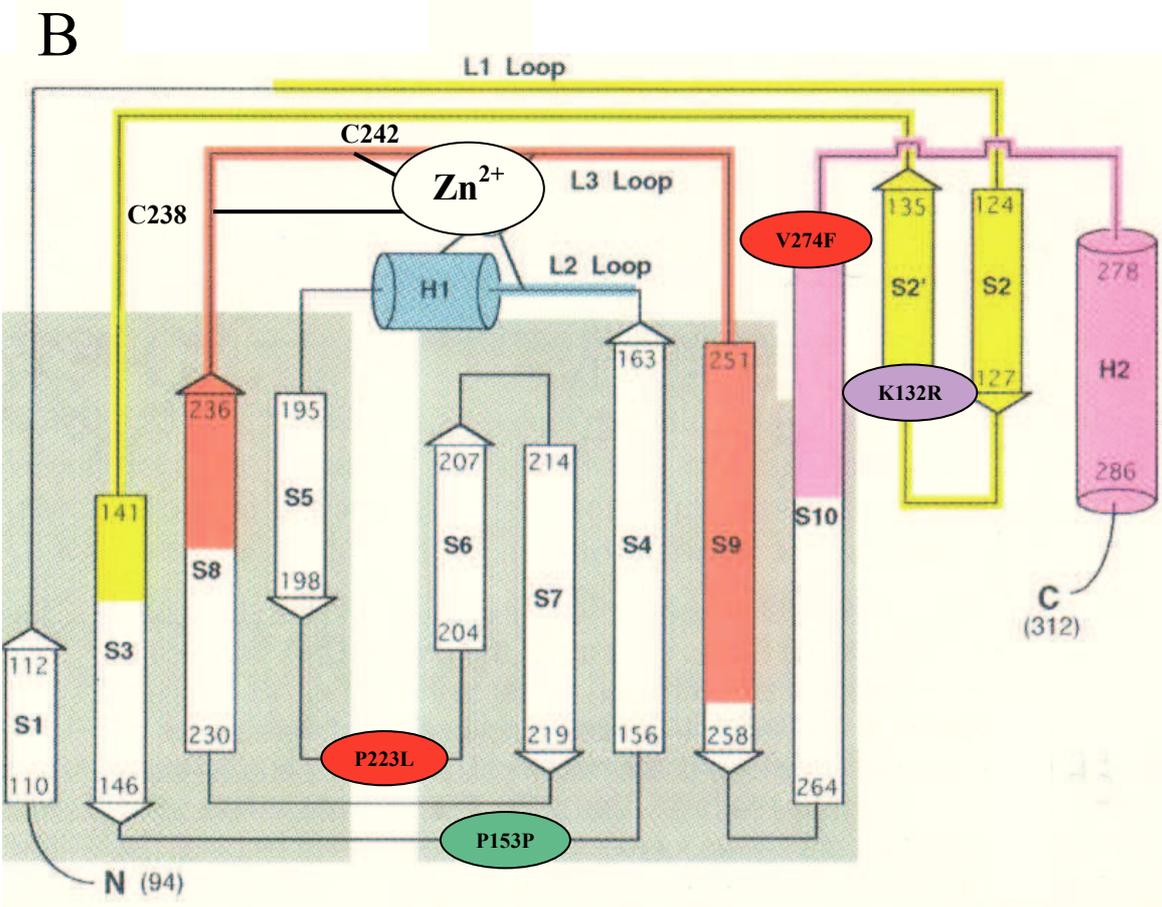
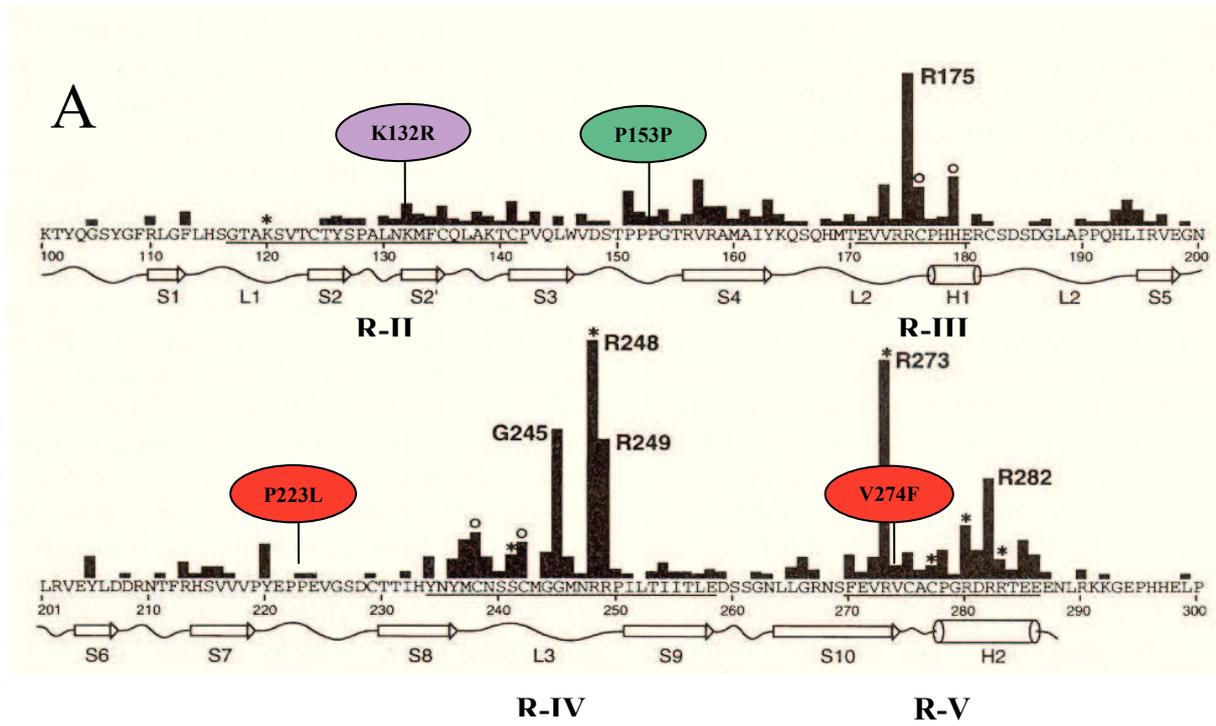
4 Diskussion

4.1 p53 Status und Regulation der nachgeschalteten Proteine p21 und MDM2

In dieser Arbeit wurden Karzinom-Zelllinien von Prostata und Mamma untersucht. Die vier Zelllinien DU-145, LNCaP, PC-3 und MFM-223 unterscheiden sich hinsichtlich des p53 Status. Jede Linie ist daher bezüglich der Anwesenheit und der Auswirkungen von p53 und der nachgeschalteten Faktoren verschieden (**Tab. 2, S. 14**). Das Ziel der Untersuchungen war, verschiedene Bedingungen des Zellwachstums anhand der unterschiedlichen Zustände von p53 und der davon abhängigen Proteine abzuklären.

Die Prostatakarzinomzellen DU-145 tragen in jedem Allel des p53 Gens eine Mutation. Die eine Mutation liegt in Exon 6 (Codon 223, P223L; **Abb. 40, S. 103-104**), und die andere in Exon 8 (Codon 274, V274F; **Abb. 40, S. 103-104**). Dies führt dazu, daß p53 in diesen Zellen auch unter regulären Wachstumsbedingungen konstitutiv erhöht ist. In der Immunzytologie zeigten, bei eigenen Untersuchungen mit dem Antikörper Ab-2 gegen die Aminosäuren 46-55 des p53 Proteins, 100 % der DU-145 Zellen eine starke Kernfärbung. Im Gegensatz dazu, waren mit einem polyklonalen Antikörper gegen p53 nur 6 % der wt-p53 MCF-7 Zellen positiv für eine p53 Kernfärbung (Carroll et al., 1993). Der Grund für die massive Anhäufung von p53 in DU-145 Zellen beruht vermutlich auf einer Störung des autoregulativen Feedback-Mechanismus zwischen p53 und MDM2. Die Transkription von MDM2 wird durch p53 in der Ratten-Embryofibroblasten Zelllinie (Klon 6) induziert. Dabei konnte ebenfalls gezeigt werden, daß durch den erhöhten p53 Gehalt in Klon 6 Zellen ebenfalls die nachweisbare Menge des MDM2 Proteins gesteigert ist (Barak et al., 1993). Eine Eigenschaft von MDM2 ist die Fähigkeit, wt-p53 zu binden (Hinds et al., 1990; Olson et al., 1993). Mit dieser Bindung wird eine Degradation von p53 durch Proteinasen des Ubiquitin-Systems eingeleitet; dies hat unter optimalen Wachstumsbedingungen in Mäuse-Leukämie-Zellen (DA-1) und in myeloiden Leukämie-Zellen (ML-1) eine niedrige zelluläre p53 Konzentration zur Folge. Nach radioaktiver Bestrahlung mit 200 rad steigt der p53 Gehalt jedoch in diesen beiden Zelllinien an (Haupt et al., 1997). Durch strahleninduzierte Mutationen des p53 Gens kann das Protein in seiner Konfiguration derart verändert sein, daß weder die Transkription, noch die Ankopplung des MDM2 Proteins erfolgen kann; somit kann p53 nicht mehr durch das MDM2 Protein gebunden und dem Abbau zugeführt werden.

Bei DU-145 Zellen wurden in der Nähe von p53 zwei Proteine mit apparenten Molekulargewichten im Bereich von 45 und 50 kD durch den verwendeten Antikörper



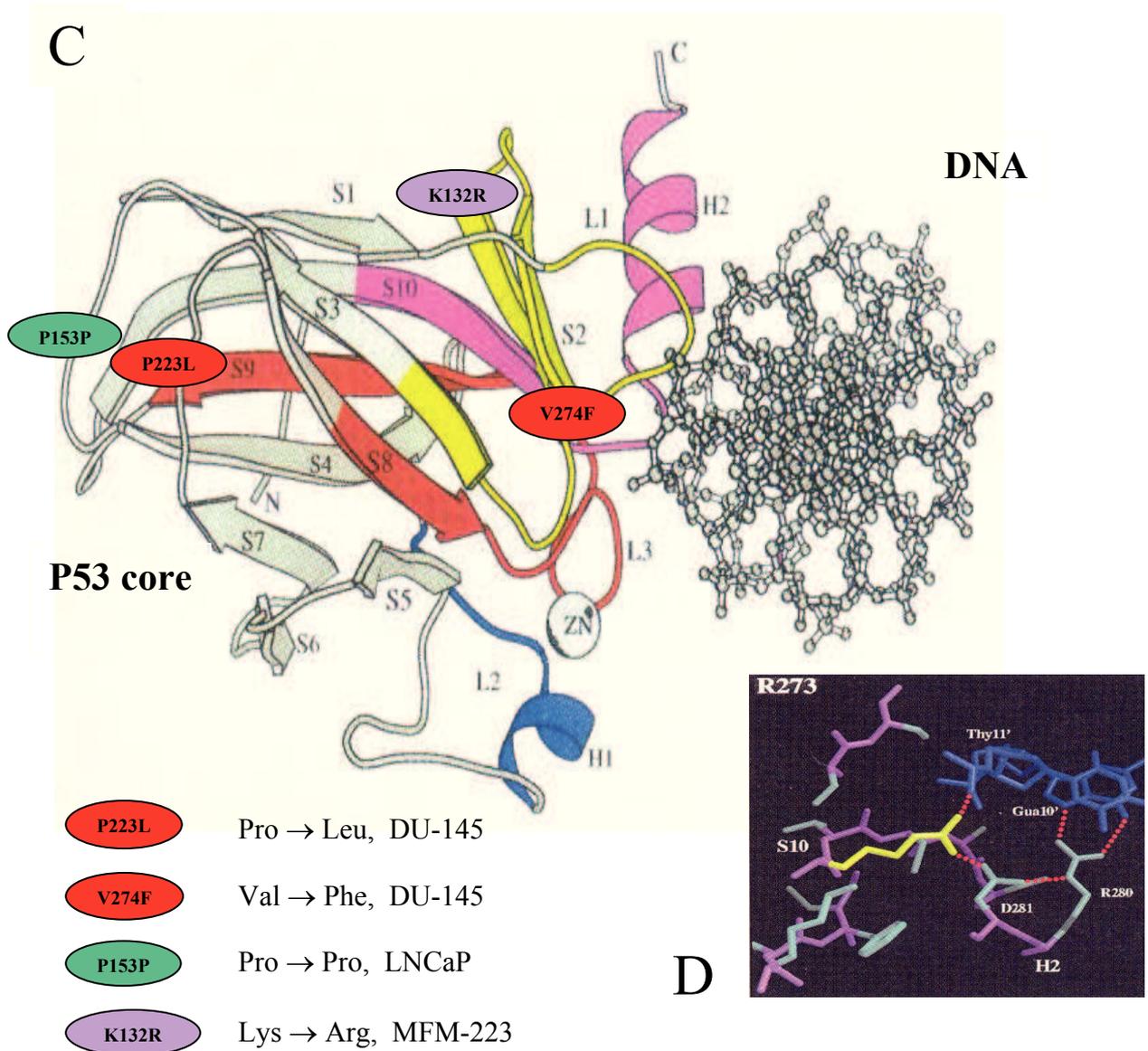


Abb. 40: Aminosäure-Sequenz der p53 Core Domäne nach Cho et al., 1994.

(A) Die Zahl von Veränderungen durch Mutationen in Tumorgewebe ist durch die Höhe der Balken gekennzeichnet. Aminosäuren für die DNA-Bindung sind durch Sternchen, Aminosäuren für die Bindung des Zinkatoms sind durch Kreise hervorgehoben. Die konservierten Regionen dieses Bereichs sind unterstrichen. Die Sekundärstrukturen sind β -Faltblätter (S), α -Helixen (H), drei Loops (L) und die Zinkatom-Bindungsstelle (Zn^{2+}).

(B) Ausschnitt der p53 Core Domäne und Lokalisation der Mutationen in den Zelllinien DU-145, LNCaP und MFM-223 gekennzeichnet durch farbige Ellipsen. Die konservierten Regionen des p53 sind durch gelb für Region II, blau für Region III, orange für Region IV, rötlich für Region V hervorgehoben. Die Zahlen innerhalb der Falblätter und Helices geben die Aminosäureabfolge an. In Abweichung zu der von Cho et al., 1994 angegebenen Zeichnung (vergl. Abb. 6 A) ist die Position der Aminosäuren C238 und C242 für die Zink-Bindung entsprechend der Aminosäureabfolge korrigiert (vergl. Teil A von Abb. 40).

(C) Ausschnitt des Core Domäne-DNA Komplexes. Die farbigen Ellipsen repräsentieren Mutationen der jeweiligen Zelllinie.

(D) Beispiel für Interaktion von R273 (gelb) mit der DNA.

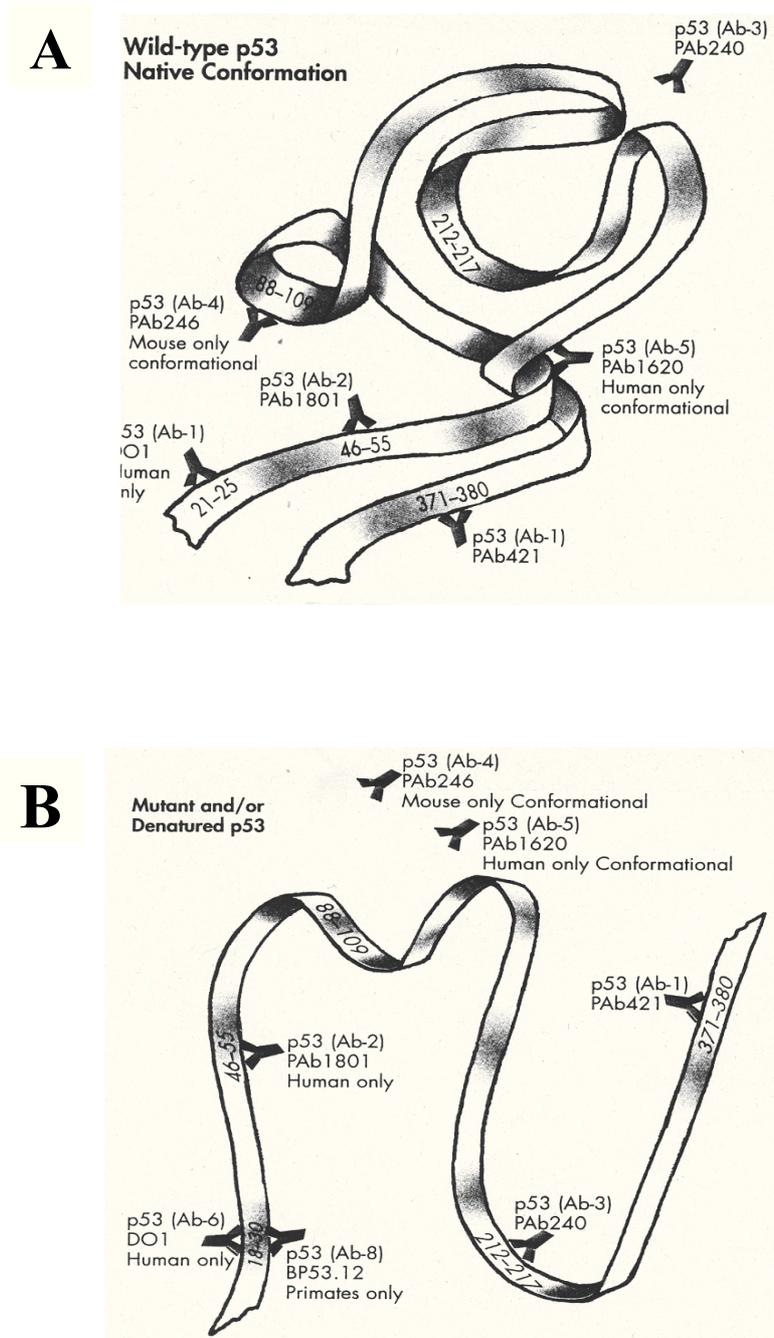


Abb. 41. Angriffspunkte, der zur Zeit der Studie verfügbaren p53 Antikörper.
(A) Reaktion mit Epitopen von wt-p53.
(B) Epitope erkennbar am denaturierten, mutiertem p53.
 Antikörper Ab-2 (Pab 1801) wurde in dieser Studie verwendet.

Ab-2 erkannt (**Abb. 16, S. 54**). Dabei war das 45 kD Protein stärker vertreten als das höher molekulare Protein von 50 kD. Möglicherweise ist das p53 Gen von DU-145 Zellen in jeweils einem Allel zusätzlich durch Deletion kodierender DNA-Bereiche C-wärts der vom Antikörper Ab-2 detektierten Proteinregion der Aminosäuren 46-55 trunkiert. Dies würde zur Verkürzung der beiden Proteine führen. Eine Antwort auf diese Frage könnte die zusätzliche Verwendung von Antikörpern liefern, die C-terminal an p53 binden, z.B. Ab-1 (Pab 421), der die Aminosäuren 371-380 detektiert (**Abb. 41, S. 105**). Andererseits könnte die Lage der Promotoren durch Mutationen verändert worden sein und auf diese Weise p53 Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten entstanden sein. Dazu sind keine anderen Untersuchungen erfolgt. In der Literatur sind bisher nur Sequenzanalysen der Exons 5-8 des p53 Gens in DU-145 Zellen beschrieben (Carroll et al., 1993). Die übrigen Genbereiche sind noch nicht untersucht. Eine andere Ursache für die Konfigurationsänderung könnte die fehlende posttranslatorische N- bzw. C-terminale Modifikation durch Phosphorylierung oder Acetylierung von p53 aufgrund der Mutationen im p53 Gen von DU-145 Zellen sein. Die Proteinbereiche, in denen p53 phosphoryliert- oder azetyliert wird, liegen allerdings weiter N-terminal oder C-terminal, und nicht im Bereich der in DU-145 Zellen nachgewiesenen Mutationen (Prives and Manley, 2001). Für die Aufklärung wäre es erforderlich gewesen, spezielle Antikörper anzuwenden, die gegen die verschieden azetylierten bzw. phosphorylierten p53 Proteine gerichtet sind (Kishi et al., 2001).

Nach Wachstumshemmung der DU-145 Zellen durch Serumentzug nahm der gemessene Gehalt des 45 kD Proteins um das Vierfache und der 50 kD-Komponente um das Dreifache zu. Infolge der extremen Erhöhung von p53-ähnlichen Peptiden waren die zwei Protein-Banden in der Elektrophorese durch Verschmelzen nicht genau zu unterscheiden. Demnach sind in DU-145 Zellen zwei Varianten von p53 mit apparenten Molekulargewichten von 45 bzw. 50 kD in überhöhtem Maße vorhanden. Eine massive Erhöhung der p53 Reaktivität konnte unter regulären Wachstumsbedingungen bei DU-145 Zellen in dieser Arbeit in Übereinstimmung mit früheren Daten (Carroll et al., 1993) bestätigt werden. Nach Wachstumshemmung durch Serumreduktion auf 0.1 % FCS war eine weitere Vermehrung der bereits unter regulären Wachstumsbedingungen verschieden stark erhöhten 45 und 50 kD Proteine in DU-145 Zellen zu sehen. Damit ließ sich ausschließen, daß die Proteine von 45 bzw. 50 kD Abbauprodukte von p53 sind, da sie infolge der Wachstumshemmung unabhängig voneinander reguliert wurden.

Der extrem hohe Gehalt von p53-Peptiden in DU-145 Zellen wird, im Vergleich zu LNCaP Zellen mit stiller Mutation im p53 Gen und Wildtyp-Status des Proteins, durch die

Ergebnisse in der Immunfluoreszenz bestätigt (**Abb. 15, S. 52**). Nach Wachstumshemmung durch Serumreduktion auf 0.1 % FCS war ein extremer Anstieg von p53 im Zellkern zu beobachten. Der Vergleich mit der Phasenkontrast-Abbildung bestätigt die Lokalisation von p53 im Zellkern. Zusätzlich war p53 nach Wachstumshemmung durch Serumentzug im Zytoplasma der DU-145 Zellen nachzuweisen. Möglicherweise ist, bedingt durch die Mutationen, der Transportmechanismus der p53-Peptide gestört, oder es erfolgt eine Übersättigung des Zellkerns in Folge der massiven Akkumulation von p53-ähnlichen Proteinen. Die immunzytologischen Bilder lassen allerdings nicht darauf schließen, welches der beiden Proteine von 45 oder 50 kD im Zellkern angereichert ist. Die Ergebnisse lassen jedenfalls das Resultat zu, daß p53 in DU-145 Zellen konfigurativ verändert ist. Es ist aus der Literatur bekannt, daß im Gegensatz zum wt-p53, welches in normalen Zellen mit einer Halbwertszeit von 20 Minuten relativ schnell abgebaut wird, durch Mutationen entstandene Varianten des Proteins stabiler sind und im Kern von normalen Zellen akkumulieren (Levine, 1997). Das mutierte Protein ist damit, im Unterschied zum relativ kurzlebigen wt-p53, immunzytologisch leicht nachweisbar und dient dem Pathologen als Nachweis für einen Defekt im p53 Gen. Diese Beobachtung konnte in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden, da in LNCaP Zellen mit wt-p53 Status in der Immunfluoreszenz unter regulären Wachstumsbedingungen keine p53-positiven Zellen detektiert wurden. Der für p53 verwendete, pantrope Antikörper (Ab-2) erkennt das Antigen im N-terminalen Bereich (Aminosäuren 46-55) und kann wt-p53 und mutiertes p53 nicht unterscheiden (Merck 2003/2004, **Abb. 41, S. 105**).

P53 kann als Transkriptionsfaktor die Expression des Zellzyklus-steuernden p21 auslösen, das einen G1-Arrest in der Zelle induzieren kann (**vergl. Abb. 3, S. 6**). Infolge des Wachstumsfaktorenentzugs bei Serum-Deprivation wäre ein Anstieg von p21 in DU-145 Zellen zu erwarten, da zu den Auslösern der p53 Aktivierung, neben Streßfaktoren wie UV-Strahlung, Hypoxie, Zellgiften, auch der Entzug von extrazellulären Wachstumsfaktoren zählt (Lowe and Lin, 2000). Nach Hemmung der Proliferation durch Serumentzug war jedoch kein p21 Protein in DU-145 Zellen nachzuweisen (**Abb. 28, S. 77**). Offenbar sind die p53-ähnlichen Proteine so stark in der Konfiguration verändert, daß keine Induktion von p21 erfolgen konnte. Im Gegensatz zu den vorliegenden Untersuchungen ist anderenorts in der Literatur beschrieben, daß DU-145 Zellen p21 exprimierten und der Gehalt des Proteins nach Behandlung mit Interferon-gamma dosisabhängig anstieg, während die Zellproliferation dosisabhängig inhibiert wurde (Kominsky et al., 2000). Allerdings wird durch die Behandlung mit Interferon-gamma die JAK/STAT

Signalkaskade aktiviert. Nach Entzug von Wachstumsfaktoren wird dagegen p53 stabilisiert und aktiviert. Es ist zudem aus der Literatur bekannt, daß p21 nicht ausschließlich durch p53 reguliert wird (Sheikh et al., 1994). Möglicherweise ist aber auch die von Kominsky et al., 2000 untersuchte DU-145 Zelllinie nicht zum Vergleich geeignet, da sie in Passagenzahl und Herkunft von der für diese Arbeit benutzten DU-145 Linie abweicht.

Die Punktmutationen des p53 Gens in DU-145 Zellen liegen in den Codons 223 und 274; sie gehören zu den konservierten Regionen des p53 Gens, die häufig von Mutationen betroffen sind (**Abb. 2, S. 4, Abb. 40 A, S. 103**). Eine Besonderheit bei DU-145 Zellen ist, daß die Mutation in Codon 274 (V274F) in beiden Allelen auftritt. Die Vermutung hierzu ist, daß sich eine Zelle mit dem Allel und der Mutation in Codon 274 dupliziert hat, und die zweite Mutation in Codon 223 (P223L) im anderen Allel zusätzlich hinzugekommen ist (Carroll et al., 1993). Aus diesem Grund ergibt sich eine Mischkultur von DU-145 Zellen, in der ein Teil der Zellen beide Mutationen in den Codons 223 und 274 trägt und der andere nur die Codon 274 Mutation. Codon 223 kodiert für die Aminosäure Prolin (Cho et al., 1994). Durch diese Mutation wird die Aminosäure Leucin statt Prolin exprimiert (Carroll et al., 1993). Die Aminosäure liegt in einer Haarnadelschleife des Proteins zwischen den β -Faltblättern S7 und S8. Diese bilden zusammen mit anderen β -Faltblättern eine "Faß-Struktur", welche eine hydrophile DNA-Bindungsstelle bildet (**Abb. 40 B u. C, S. 103-104**). Sie stabilisiert die DNA-Bindung von p53 (Cho et al., 1994). Der Austausch von 223-Prolin gegen Leucin bedingt keine Änderung der Polarität, da beide Aminosäuren unpolar sind. Allerdings ist Prolin eine zyklische α -Iminosäure und daher einzigartig unter den 20 Aminosäuren. Durch die zyklische Form des Pyrrolidinrestes besitzt Prolin eine starre Konformation. Leucin trägt dagegen zwei Methylgruppen. Aus P223L können sich sterische Veränderungen der Faltblattstrukturen von S7 und S8 ergeben, die zu einer Veränderung der Tertiärstruktur von p53 führen und somit die DNA-Bindung stören.

Die zweite Punktmutation in DU-145 Zellen betrifft Codon 274 (V274F; Carroll et al., 1993) am Ende des β -Faltblattes S10, das zu der hochkonservierten Region V des p53 Gens gehört und direkt mit der DNA interagiert (**Abb. 2, S. 4, Abb. 40 B, C u. D, S. 103-104**). Dabei ist festzuhalten, daß die Mutation V274F nicht direkt die DNA-Bindungsstelle betrifft. Die Bindung mit der DNA erfolgt über die benachbarte Aminosäure Arginin, kodiert durch Codon 273. Sie zählt zu den "Hot Spots" unter den Mutationen im p53 Gen (Cho et al., 1994). Die Mutation in Codon 274 führt zum Austausch von Valin gegen Phenylalanin (Carroll et al., 1993). Auch in diesem Fall sind beide Aminosäuren unpolar.

Valin trägt 2 Methylgruppen, Phenylalanin dagegen einen aromatischen Rest, der in seiner Masse um ein Drittel größer ist als Valin. Dieser Unterschied kann wiederum dazu führen, daß die direkte Bindung zwischen Arginin 273 und Thymin 11 der DNA-Bindungsstelle sterisch nicht erfolgen kann (**Abb. 40 C u. D., S. 103-104**). Nach Betrachtung der Mutationen im p53 Gen in DU-145 Zellen ist es durchaus möglich, daß durch Mutation veränderte, p53-ähnliche Proteine nicht mehr in der Lage sind, mit der DNA in korrekter Weise zu interagieren. Somit könnte die Transkription anderer Zellzyklus-steuernder Gene nicht mehr induziert werden. Eine Bestätigung hierfür sind die Ergebnisse der Western-Blot Analysen von p21 und MDM2, die eindeutig keine Regulation dieser Proteine in DU-145 Zellen nach Serumentzug zeigten (**Abb. 23, S. 69 u. Abb. 28, S. 77**).

Die Proliferation von DU-145 Zellen kann durch den Entzug von Wachstumsfaktoren gehemmt werden (**Abb. 14, S. 51**). Im Vergleich zu LNCaP Zellen mit wt-p53 fällt dennoch auf, daß das Wachstum von DU-145 Zellen nicht vollständig gehemmt wurde (**Abb. 14, S. 51**). Nach Serumentzug wuchsen DU-145 Kulturen verlangsamt weiter, während das Wachstum von wt-p53 LNCaP Zellen vollständig arretiert wurde. Dies kann als Hinweis dafür gelten, daß intaktes p53 und die Regulation der nachgeschalteten Proteine, wie p21 und MDM2, erforderlich wären, um das Wachstum von DU-145 Zellen nach Entzug von Wachstumsfaktoren vollständig zu inhibieren. MDM2, ein Zellzyklus-steuerndes Protein, dessen Transkription durch p53 reguliert wird, konnte in der Western-Blot Analyse bei DU-145 Zellen nachgewiesen werden. Allerdings folgte die MDM2 Menge nicht dem Anstieg von p53 nach Wachstumshemmung der Zellen durch den Entzug von Wachstumsfaktoren. Demnach hat p53 in DU-145 Zellen die Fähigkeit verloren, den Spiegel von MDM2 Protein adäquat zu regulieren.

Die Prostatakarzinom-Zelllinie LNCaP trägt eine stille Mutation im p53 Gen. Die Mutation betrifft das Codon 153, das für Prolin kodiert (**Abb. 40, S. 103-104**). Durch die Mutation wird kein Aminosäureaustausch bewirkt. Das neu entstandene Codon wird ebenfalls zu Prolin umgesetzt (Carroll et al., 1993). Es ergeben sich daher keine Unterschiede zur Wildtyp-Konfiguration des Proteins. Dies wird durch das Verhalten des Proteins in LNCaP Zellen unterstützt. In der Immunfluoreszenz ist, wie erwartet, kein p53 nachzuweisen. Wie schon erwähnt, ist der Turnover des normalen wt-p53 sehr schnell. Somit ist p53 in LNCaP Zellen mit Hilfe dieser Methode nicht nachzuweisen. In der Western-Blot Analyse mit LNCaP Zellextrakten nach Variation der Wachstumsbedingungen konnte ein reguläres Verhalten von p53 gezeigt werden (**Abb. 16, S. 54**). Unter normalen Wachstumsbedingungen mit 10 % FCS war der p53 Gehalt entsprechend

gering, während nach Hemmung der Proliferation durch Serumentzug ein Anstieg von p53 zu beobachten war. Es wird demnach regelhaft bei Auftreten einer Streß-Situation, in diesem Fall der Entzug von Wachstumsfaktoren, hochreguliert. Die Analysen der nachgeschalteten Proteine p21 und MDM2 zeigten nach Variation der Wachstumsbedingungen zudem, daß auch die Regulation der p53-abhängigen Proteine intakt war. In LNCaP Zellen wurde p21 nach Hemmung der Proliferation entsprechend hochreguliert und folgte demnach der Erhöhung des p53 Gehaltes (**Abb. 28, S. 77**). Dies gilt auch für MDM2, dessen Expression ebenfalls nach Arretierung der Proliferation durch Serumentzug zunahm (**Abb. 23, S. 69**). Diese Ergebnisse stützen die Aussage, daß die stille Mutation in Codon 153 keinerlei Auswirkungen auf die Funktion von p53 in LNCaP Zellen hat und belegen ein reguläres Verhalten des Proteins in diesen Zellen.

Die Zelllinie PC-3, etabliert aus einem Karzinom der Prostata, exprimiert kein p53. PC-3 Zellen sind hemizygot für ein mutiertes p53 Gen. Im verbleibenden Allel findet sich eine Deletion der Aminosäure Arginin (Codon 138). Dies führt zu einer "frame-shift"-Mutation, durch welche ein neues Stop-Codon in Codon 169 gebildet wird, so daß kein intaktes p53 exprimiert wird (Carroll et al., 1993). Übereinstimmend mit dieser Beobachtung ließ sich in PC-3 Zellen weder in der Immunfluoreszenz noch in der Western-Blot Analyse ein p53 Signal detektieren (nicht gezeigt). Dementsprechend wurden in Western-Blot Analysen keine Signale für p21 und MDM2 gefunden (**Abb. 24, S. 72, Abb. 28, S. 77**). Allerdings konnte in einer Arbeit von Chinni et al. (2001) die Hochregulation von p21 nach Behandlung mit der Phytochemikalie Indol-3-Carbinol gezeigt werden. Durch die Phytochemikalie wurden in PC-3 Zellen ein G1-Arrest im Zellzyklus und Apoptose ausgelöst. In den eigenen Untersuchungen war dagegen zu beobachten, daß das Wachstum von PC-3 Zellen nach Wachstumsfaktoren-Entzug für 11 Tage lediglich auf ca. $\frac{1}{4}$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle reduziert war. Demnach war in PC-3 Kulturen dieser Arbeit weiterhin ein Zellzuwachs zu verzeichnen (**vergl. Abb. 14, S. 51**). Möglicherweise wurde in den Untersuchungen von Chinni et al. (2001) durch Indol-3-Carbinol eine p53-unabhängige Signalkaskade aktiviert, die p21 hochregulierte und auf diese Weise einen G1-Arrest in den Zellen auslöste bzw. die Apoptose induzierte.

In einer anderen Arbeit von Jacobberger et al. (1999) wurde die Expression von MDM2 in PC-3 Zellen nachgewiesen. In den Untersuchungen von Jacobberger et al. (1999) wurden verschiedene Isoformen von MDM2 (188, 153, 78, 64, 54, 44, 39, 34 kd) mit schwachen Signalen detektiert. Die stärkste Expression wurde bei 78 kD nachgewiesen, während das relative Molekulargewicht von MDM2 in DU-145, LNCaP und MFM-223

Zellen der vorliegenden Arbeit bei ca. 90 kD lag. Wie gezeigt werden konnte, wurde die 90 kD Bande durch die Hemmung des Wachstums in LNCaP und MFM-223 Zellen hochreguliert und ist daher als spezifisch anzusehen (**Abb. 23, S. 69, Abb. 24, S. 72, Abb. 26, S. 74**). Zudem ist bekannt, daß MDM2 im SDS-PAA-Gel ein verändertes Laufverhalten zeigt. Obwohl aus der Aminosäureabfolge von MDM2 ein relatives Molekulargewicht von 54 kD resultiert, erscheint die Bande im SDS-PAA-Gel bei ca. 90 kD (Momand et al. 1992; Oliner et al. 1992; Barak, et al., 1993; Leach et al. 1993; Olson et al., 1993). Möglicherweise wurde in der Arbeit von Jacobberger et al., (1999) eine PC-3 Zelllinie untersucht, die nicht zum Vergleich geeignet ist, da sie in ihrer Passagenzahl und Herkunft von der in dieser Arbeit benutzten PC-3 Zelllinie abweicht.

Bei eigenen Sequenzanalysen wurde festgestellt, daß die Mammakarzinom-Zelllinie MFM-223 eine Punktmutation des p53 Gens in Codon 132 (K132R) trägt (**Abb. 22, S. 68, Abb. 40, S. 103-104**). Die Aminosäure 132 Lysin wird infolge der Mutation durch die Aminosäure Arginin ersetzt. Beide Aminosäuren besitzen polare basische Seitenketten. Sie ähneln sich daher in ihren physikalischen Eigenschaften. Die Mutation liegt innerhalb des Exons 5 in der hochkonservierten Region II des p53 Gens und am Beginn des S2'-Faltblattes. Diese Region zählt zum "Loop-Faltblatt-Helix"-Teil des p53 und stabilisiert die Tertiärstruktur des Proteins (**Abb. 40 B u. C, S. 103-104**). Damit wird die DNA Bindung von p53 unterstützt (Cho et al., 1994). In den eigenen Western-Blot Analysen an MFM-223 Zellen verhielt sich p53 regelhaft. Das Molekulargewicht stimmte mit dem Wildtyp-Molekulargewicht von p53 überein (**Abb. 20, S. 64**). Zudem nahm der p53 Gehalt nach Hemmung der Proliferation durch den Entzug von Wachstumsfaktoren, bzw. in Anwesenheit der proliferationshemmenden Faktoren DHT oder CAS, im Vergleich zur Kontrolle regelhaft zu. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der Anstieg von p53, nach Hemmung der Proliferation durch Wachstumsfaktoren-Entzug oder durch DHT bzw. CAS, in 10 % FCS von einer Erhöhung des MDM2 Gehaltes begleitet wurde (**Abb. 26, S. 74**). Dies war jedoch nicht der Fall in Gegenwart des, bei MFM-223 Zellen proliferationsfördernden, steroidalen Antiandrogens CPA in 1 % FCS. Ein ähnliches Verhalten, wie das MDM2 Protein, zeigte auch die Western-Blot Analyse zur p21 Expression in MFM-223 Zellen (**Abb. 31, S. 81**). Möglicherweise hat die p53-Mutation von MFM-223 Zellen keinen Einfluß auf die Funktionsfähigkeit von p53. Andererseits könnte die Mutation nur ein Allel betreffen, und das Protein des verbleibenden Allels im Tetramer-Komplex des funktionsfähigen p53 entspräche dem Wildtyp-Status. In diesem

Fall würde das, dem Wildtyp-Status entsprechende, wt-p53 die regulativen Funktionen des Proteins weiterhin aufrecht erhalten.

4.2 Beeinflussung des Zellwachstums durch DHT oder Antiandrogene sowie Regulation von p53, p21 und MDM2 Protein

Die Prostatakarzinom-Zelllinie DU-145 exprimiert keine Androgen-Rezeptoren. Das entsprechende Gen ist deletiert (Chlenski et al., 2001). In eigenen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß nach Behandlung mit DHT oder den Antiandrogenern CPA und CAS keine Änderung des Zellwachstums erfolgte (nicht gezeigt). Trotzdem wurde zur Kontrolle in Western-Blot Analysen der Gehalt von p53 nach Behandlung mit den jeweiligen Substanzen geprüft (**Abb. 17, S. 56**). Übereinstimmend mit der fehlenden Androgen-Sensitivität von DU-145 Zellen war keine Änderung der p53 Menge in Abhängigkeit von der Behandlung mit DHT, CPA oder CAS festzustellen. Daher wurde auf die Analyse von p21 und MDM2, die durch p53 reguliert werden, verzichtet.

Die Zelllinie PC-3, isoliert aus einem Karzinom der Prostata, exprimiert ebenfalls keine Androgen-Rezeptoren (Chlenski et al., 2001). Entsprechend hatte die Behandlung mit DHT oder den Antiandrogenern CPA oder CAS keine Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen (nicht gezeigt). Die Prüfung des Gehalts von p53 wurde nicht durchgeführt, da es von PC-3 Zellen nicht exprimiert wird. Die durchgeführten Untersuchungen hatten ergeben, daß die p53-regulierten Proteine MDM2 und p21 in PC-3 Zellen nicht nachzuweisen waren (**Abb. 24, S. 72, Abb. 28, S. 77**).

Die Prostatakarzinomzellen LNCaP sind androgensensitiv (Horosewicz et al., 1983). Dies wurde auch durch eigene Untersuchungen belegt (**Abb. 10, S. 41, Abb. 12 S. 46 A u. B**). Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß in 10 % steroidfreiem FCS nicht nur durch DHT, sondern auch durch das steroidale Antiandrogen CPA eine Wachstumssteigerung bei LNCaP Zellen erzielt wurde. Zur Erklärung für den proliferativen Effekt von CPA kann eine Mutation im Androgen-Rezeptorgen herangezogen werden (Veldscholte et al., 1990). Die Mutation liegt in der für die steroidbindende Domäne kodierenden, Region des Androgen-Rezeptorgens in Codon 868 und führt zu einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Alanin (T868A). Infolge der Mutation verändert sich die Bindungsaffinität des Androgen-Rezeptors in der, steroidbindenden Domäne, so daß auch steroidale Hormone, wie Östrogene, Progestagene und auch Antiandrogene, z.B. das steroidale Antiandrogen CPA, an den Androgen-Rezeptor binden und ihn aktivieren (Veldscholte et al., 1992). Die

Aktivierung des Androgen-Rezeptors erfordert die Dissoziation des Androgen-Rezeptorkomplexes. Im inaktiven Zustand sind zytosolische "heat-shock"-Proteine (hsp 56-90 kD) an den Rezeptor gebunden, die nach Wirkstoffbindung abdissoziieren und die DNA-bindende Domäne des Rezeptors freigeben. Der Rezeptor dimerisiert daraufhin, bindet an das "responsive element" in der DNA und kann die Transkription wachstumsregulierender Gene induzieren, bzw. reprimieren (Carson-Jurica et al., 1990). Zudem haben Untersuchungen, u.a. auch an LNCaP und MFM-223 Zellen, ergeben, daß die Aktivität des Rezeptors durch eine Reihe von sogenannten Koaktivatoren (ARA70, FHL2) oder Korepressoren (SMRT, N-CoR) positiv, bzw. negativ, beeinflusst wird. Diese interagieren mit dem Androgen-Rezeptor der basalen Transkriptionsmaschinerie und direkt mit dem Chromatin, und beeinflussen so die transkriptionelle Regulation (Huang et al., 2002, Dotzlaw et al., 2002). Aufgrund der Affinitäts- und Konformationsänderung der steroidbindenden Domäne des Androgen-Rezeptors infolge der Mutation, kann steroidales CPA an den Androgen-Rezeptor binden und ihn aktivieren. Die Aktivierung des Rezeptors durch CPA induziert offenbar die Expression wachstumsstimulierender Gene, in dem die Proliferation von LNCaP Zellen durch das Antiandrogen, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, angeregt wird (**Abb. 10, S. 41**).

Im Vergleich zur Erhöhung der Proliferation durch CPA, wird bei LNCaP Zellen durch das nicht-steroidale Antiandrogen CAS eine Reduktion des Wachstums erzielt (**Abb. 11 A u. B, S. 44, Abb. 12 C u. G, S. 46**). Wie frühere Untersuchungen an dieser Zelllinie (Veldscholte et al., 1992) gezeigt haben, bindet CAS an den Androgen-Rezeptor-Komplex. Dabei wurden sowohl der wt-, als auch der mutierte Rezeptor in COS Zellen, transient exprimiert und die Bindungsaffinitäten in Kompetitionsexperimenten verglichen. Allerdings führt die Bindung nicht zur Dissoziation der "heat-shock"-Proteine vom Androgen-Rezeptor, so daß dieser nicht mit der DNA interagieren kann (Veldscholte, et al., 1992). In COS-1 Zellen konnten zudem Huang et al. (2002) zeigen, daß CAS die Interaktion des Rezeptors mit dem Corepressor (SMRT) induziert. Zudem wird die Bindung des Coaktivators (N-CoR), gemäß diesen Untersuchungen, durch CAS gehemmt. Aus diesem Grund bleibt die Transkription proliferativ wirkender Gene durch den mit CAS verbundenen Androgen-Rezeptor aus. Eine Kompetition von wachstumsstimulierenden Androgenen durch CAS ist auszuschließen, da das Serum durch die Aktivkohle-Behandlung von Hormonen befreit war (**Abb. 11 B, S. 44, Abb. 12, S. 46, Abb. 17, S. 56**). CAS könnte auch mit anderen wachstumsregulierenden Proteinen interagieren, deren Einfluß zur Reduktion der Proliferation führt. Dafür spricht zum einen, daß das Wachstum

von LNCaP Zellen nach Zugabe von CAS in Aktivkohle behandeltem Serum unter den Kontrollwert (ohne Wirkstoffzusatz) zu reduzieren war (**Abb. 11 B, S. 44**). Zum anderen übertraf der Gehalt von p53 nach Behandlung mit CAS die Menge von p53 in der Kontrollzellgruppe in 1 % Aktivkohle behandeltem Serum ohne Wirkstoffzusatz (**Abb. 17, S. 56**). Entsprechend der positiven oder negativen Auswirkungen auf das Wachstum von LNCaP Zellen wurde der Gehalt von p53 in Abhängigkeit vom Wirkstoffzusatz (DHT, CPA oder CAS) herunter oder hoch reguliert. Nach Behandlung mit den proliferationsfördernden Substanzen DHT oder CPA war der Spiegel von p53 niedrig, während nach Einsatz des antiproliferativen CAS eine Vermehrung von p53 festzustellen war (**Abb. 17, S. 56**). Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Wirkstoffe CPA und CAS zeigten, daß der Gehalt von p53 direkt mit dem Wachstumszustand der Zellen korrelierte. Nach Zugabe von 10^{-9} - 10^{-6} M CPA war der p53 Gehalt in Zellen, die mit 10^{-7} M DHT behandelt wurden, am geringsten (**Abb. 18, S. 58**). Entsprechend war nach Behandlung mit dieser Wirkstoffkonzentration die Proliferation am größten (**Abb. 10, S. 41**). Nach Behandlung mit 10^{-9} - 10^{-6} M CAS war eine konzentrationsabhängige Verminderung des Wachstums von LNCaP Zellen zu beobachten (**Abb. 11, S. 44**). Entsprechend nahm der p53 Gehalt konzentrationsabhängig zu (**Abb. 18, S. 58**) und folgerichtig waren in den mit CAS behandelten LNCaP Kulturen erhöhte MDM2 und p21 Mengen nachzuweisen (**Abb. 25, S. 73, Abb. 29, S. 79**). Nach Behandlung mit 10^{-9} - 10^{-6} M CAS stieg mit zunehmender Konzentration und Wachstumshemmung der Gehalt der nachgeschalteten Proteine MDM2 und p21 (**Abb. 11, S. 44, Abb. 25, S. 73, Abb. 30, S. 80**). Demnach erfolgte in LNCaP Zellen die Erhöhung der Expression von MDM2 und p21 entsprechend dem angestiegenem p53 Gehalt und der Wachstumshemmung (**Tab. 9, S. 101**).

Das Wachstum der Mammakarzinom-Zelllinie MFM-223 war ebenfalls eindeutig durch Androgene und Antiandrogene zu beeinflussen (**Abb. 19, S. 61**). MFM-223 Zellen weisen im Vergleich zu anderen Mammakarzinom-Zelllinien (MCF-7, ZR-75-1, EFM-19) einen hohen Gehalt an Androgen-Rezeptoren auf (Hackenberg et al., 1991; Magklara et al., 2002). In Wachstumsmedium (10 % FCS) führte die Zugabe von DHT zu einer konzentrationsabhängigen Wachstumsverminderung. Die Proliferation anderer Mammakarzinomzellen wie MCF-7 oder EFM-19 wird dagegen durch die Kultivierung in DHT-haltigem Medium angeregt (Lippmann et al., 1976; Simon et al., 1984). Hierin zeigt sich in charakteristischer Weise das unterschiedliche Verhalten hormonsensitiver individueller Karzinomzelllinien. Interessanterweise wird das Wachstum von MFM-223 Zellen durch die

Kultivation in Medium mit 1 % Aktivkohle behandeltem Serum und dem Antiandrogen CPA stimuliert (**Abb. 19 C, S. 61**). Dies deutet daraufhin, daß die hormonbindende Domäne des Androgen-Rezeptors in MFM-223 Zellen durch Mutation verändert ist, und auf Grund dessen die antagonistische Wirkung von CPA in eine agonistische Wirkung verkehrt wird. Untersuchungen zu Mutationen innerhalb des Androgen-Rezeptorgens in MFM-223 Zellen ergaben allerdings keine Auffälligkeiten im Vergleich mit anderen Mammakarzinomlinien. Möglicherweise ist die Interaktion des CPA-Rezeptorkomplexes mit Coaktivatoren oder Corepressoren des Androgen Rezeptors gestört (Magklara et al., 2002). Das nicht-steroidale Antiandrogen CAS hemmt dagegen wie bei LNCaP Zellen das Wachstum von MFM-223 Zellen in Wachstumsmedium mit 10 % FCS konzentrationsabhängig (**Abb. 19 D, S. 61**). Die Untersuchung der Zellzyklus-Regulatoren p53, MDM2 und p21 ergab vergleichbar mit Ergebnissen an LNCaP Zellen eine umgekehrte Korrelation zwischen Wachstumszustand der Zellen und dem Gehalt der genannten Proteine. Entsprechend der Wachstumshemmung durch den Zusatz von DHT oder CAS war in MFM-223 Zellen eine Erhöhung der p53 Expression festzustellen. Allerdings war der p53 Gehalt nach Zusatz von CAS höher als nach Zusatz von DHT, obwohl die Reduktion des Wachstums von MFM-223 Zellen durch DHT größer war (**vergl. Abb. 19 A u. D, S. 61, Abb. 20, S. 64**). Möglicherweise wird die Stabilisierung von p53 durch CAS induziert oder CAS löst die Aktivierung anderer Signalkaskaden aus, die p53 induzieren.

4.3 Apoptose und Expression der Apoptose relevanten Proteine BAX, BCL-2 und Caspase 8

In DU-145 und PC-3 Zellen wurde mit Hilfe der Immunzytochemie keine Apoptose nach Wachstumsfaktoren-Entzug nachgewiesen (nicht gezeigt). Zu den Initiatoren der Apoptose zählt p53, das posttranslational in der Reaktion auf Streß-Situationen, z.B. Wachstumsfaktoren-Entzug modifiziert wird (Kishi et al., 2001, Prives and Manley, 2001, Dorman and Hupp, 2001). Die Prostatakarzinom-Zelllinie DU-145 hat Mutationen in beiden Allelen des p53 Gens und zeigt p53-ähnliche Proteine mit Molekulargewichten von 45 bzw. 50 kD. Eine Regulation der nachgeschalteten Proteine MDM2 und p21 war nicht sichtbar (**Abb. 23, S. 69, Abb. 28, S. 77**). Wie bereits die Ergebnisse von Honda et al. (2002) zeigten, konnte in Western-Blot Analysen der vorliegenden Arbeit die Expression des proapoptotischen und durch p53 regulierten BAX nicht nachgewiesen werden. Die

Zelllinie PC-3 exprimiert kein p53. Es ist daher denkbar, daß in DU-145 und PC-3 Zellen durch Wachstumsfaktoren-Entzug über den p53 Weg keine Apoptose ausgelöst wurde, da p53 als essentieller Sensor für Streß-Situationen und als Regulator der Apoptose nicht intakt ist oder fehlt. Daher ließ sich in den eigenen Untersuchungen die Aktivierung der p53-induzierten Apoptose durch die Streß-Situation des Wachstumsfaktoren-Entzugs offenbar nicht herstellen. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, daß DU-145 und PC-3 Zellen in die Apoptose gehen können. So zeigten Experimente von Cattaneo-Pangrazzi et al. (2000), daß die Behandlung mit der zytotoxischen Substanz 5-dU-NOAC, einem Heterodinucleosid-Dimer, in beiden Zelllinien Apoptose auslöste. Neben p53 können allerdings eine Reihe weiterer Signalproteine Apoptose in der Zelle auslösen, darunter die Membranproteine FAS/APO-1, Trail-R1 oder R2, TNF-R1 (Nagata et al., 1997), so daß die zytotoxische Substanz 5-dU-NOAC einen p53-unabhängigen Weg aktiviert haben könnte. Dafür spricht, daß zytotoxische Substanzen die Expression von Fas-L induzieren können (Jones et al., 2001), der wiederum den membranständigen Rezeptor FAS/APO-1 aktiviert und auf diesem Weg Apoptose induziert (Nagata et al., 1997).

In LNCaP und MFM-223 Zellen waren nach Entzug von Wachstumsfaktoren und nach Behandlung mit den antiproliferativen Substanzen vermehrt apoptotische Zellen im TUNEL-Assay zu sehen (**Abb. 33, S. 84 und 34, S. 87**). LNCaP Zellen wiesen 7 % apoptotische Zellen nach Wachstumsfaktoren Entzug und 12 % apoptotische Zellen nach Zusatz des nicht steroidalen Antiandrogens CAS auf. Entsprechend dazu exprimierten LNCaP Zellen die Wildtyp-Variante von p53. Unter positiven Wachstumsbedingungen, wie 10 % FCS, waren entsprechend nur 1.5 % apoptotische Zellen enthalten, und nach Zusatz der proliferationsfördernden Substanzen DHT oder CPA betrug der Anteil apoptotischer Zellen 1.5 % bzw. 1 %. Der Entzug von Wachstumsfaktoren oder der Zusatz des Antiandrogens CAS in serumhaltiges Medium löste auch bei 4 % bzw. 8 % der MFM-223 Zellen Apoptose aus. Bei MFM-223 Zellen wurden ebenfalls nach Behandlung mit DHT, das bei diesen Zellen proliferationshemmend wirkte, 7 % apoptotische Zellen nachgewiesen. MFM-223 Zellen tragen zwar eine Punktmutation in Codon 132 (K132R) im p53 Gen, die aber auf die Regulation von MDM2 oder p21 durch p53 keinen Einfluß zu haben scheint (**Abb. 26, S. 74, Abb. 31, S. 81**). Somit ist die Funktion zur Regulation der nachgeschalteten Proteine (MDM2, p21) und der Apoptose gegeben. Wie bei LNCaP Zellen waren entsprechend weniger apoptotische MFM-223 Zellen unter positiven Wachstumsbedingungen nachzuweisen; z.B. in 10 % FCS mit 1 % apoptotischen Zellen oder nach Zusatz von CPA mit 2 % Apoptose.

Die Initiator-Caspase 8 ist ein Enzym mit Todes-Effektor Domäne (**vergl. Abb. 4, S. 10**). Mit dieser Domäne ist das Protein an die membranständigen Rezeptoren FAS/APO-1, Trail-R1 oder R2, TNF-R1 gebunden. Die Aktivierung der Caspase 8 erfolgt durch die Aktivierung des membrangebundenen Rezeptors oder auf anderen Wegen, die bisher nicht bekannt sind (Jones et al., 2001). Die Ergebnisse der eigenen Arbeit haben gezeigt, daß in serumreduzierten Medium, sowohl in LNCaP Prostatakarzinomzellen, als auch in MFM-223 Mammakarzinomzellen, die Expression von Caspase 8 durch den Entzug von Wachstumsfaktoren oder durch die Behandlung mit dem Antiandrogen CAS hochreguliert wurde (**Abb. 39, S. 99**). Zudem war in MFM-223 Zellen bei Anwesenheit von 10 % FCS und dem proliferationshemmenden DHT die Caspase 8 Menge erhöht. Der Anstieg des Caspase 8 Gehaltes war demnach mit der Wachstumshemmung der Zellen positiv korreliert. Unter regulären Wachstumsbedingungen (10 % FCS) mit niedriger Apoptoserate (1.5 %) war dagegen der Caspase 8 Gehalt in LNCaP und MFM-223 Zellen geringer als in Kulturen, deren Proliferation durch Wachstumsfaktoren-Entzug gehemmt waren (**Tab. 8, S. 88, Abb. 39, S. 99 A**). Auffällig war die vermehrte Expression von Caspase 8 in LNCaP Kulturen, die mit den proliferationsfördernden Substanzen DHT oder CPA behandelt wurden, gegenüber LNCaP Zellen, die in Wachstumsmedium mit 10 % FCS kultiviert wurden. Im Gegensatz dazu, war die Apoptoserate mit 1.5 % bei 10 % FCS und 1.5 % und 1 % nach Behandlung mit DHT oder CPA nahezu gleich. Hierbei muß darauf verwiesen werden, daß die Wirksubstanzen DHT und CPA einem Medium zugesetzt wurden, dem durch Aktivkohle-Filterung enthaltene Wachstumsfaktoren entzogen wurden. Daher könnte das Fehlen anderer essentieller Wachstumsfaktoren die Erhöhung von Caspase 8 erklären. Zudem erreichten LNCaP Zellen nach Behandlung mit DHT oder CPA in 1 % Aktivkohle behandeltem Medium nicht die Gesamtzellzahl wie LNCaP Zellen, die in Wachstumsmedium (10 % FCS) kultiviert wurden (**Abb. 10, S. 41**).

Es sei darauf hingewiesen, daß die Morphologie von LNCaP und MFM-223 Zellen, die aus menschlichen Karzinomen stammten, fibroblastoid war, obwohl keine Begründung dafür anzugeben ist; die Morphologie hat sich im Verlauf der Untersuchungen unter verschiedenartigen Wachstumsbedingungen nicht verändert. Dies ist gut erkennbar am fibroblastoiden Typ der LNCaP Zellen (**vergl. Abb. 6, S. 16; Abb. 12, S. 46; Abb. 33, S. 84**). Die Morphologie beider fibroblastoiden Zelllinien wurde besonders deutlich unter suboptimalen Wachstumsbedingungen, fotografiert im Phasenkontrast (**vergl. Abb. 33, S. 84; Abb. 34, S. 87**). Dagegen zeigten DU-145 und PC-3 Zellen eine beständige epitheloide Morphologie in der Kultur (**Abb. 6, S. 16**). LNCaP und MFM-223 Zellen erfuhren

Apoptose unter diesen Kultivationsbedingungen (**vergl. Tab. 8, S. 88, Abb. 14, S. 51, Abb. 19, S. 61**), ohne daß ein massives Absterben der Kulturen zu beobachten war. Offenbar konnten die untersuchten Zelllinien mehrere Tage ohne ausreichende Zufuhr von Nährstoffen unter vergleichbaren Bedingungen bei völligem Erhalt der Proliferationsfähigkeit überleben. Dies zeigt deutlich die Restimulierbarkeit des Wachstums von LNCaP Zellen nach Wachstumsarrest (**Abb. 14, S. 51**). Die in vitro Überlebensfähigkeit erscheint ein besonderer Vorteil bei der Arbeit mit Zellkulturen aus Tumoren zu sein.

In MFM-223 Zellen war die Anwesenheit von Caspase 8 konstitutiv höher als in LNCaP Zellen. In MFM-223 Zellen war auch unter regulären Wachstumsbedingungen in 10 % FCS eine höhere Expression des mit der Apoptose assoziierten Proteins nachzuweisen; bei Serum-Reduktion auf 1 % FCS wurde die Menge an Caspase 8 Protein etwa verdoppelt. Entsprechend war die Apoptose-Inzidenz in Wachstumsmedium (10 % FCS) mit 1 % geringer als nach Kultivierung in 1 % Aktivkohle behandeltem Medium mit 4 % apoptotischen Zellen. Dementsprechend war der Caspase 8 Gehalt nach Zusatz des wachstumsfördernden CPA in einer Konzentration von 10^{-7} M geringer als in Kulturen, die in 1 % Aktivkohle behandeltem Medium ohne Wirkstoffzusatz wuchsen. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis waren in CPA-behandelten Kulturen nur 2 % apoptotische Zellen nachzuweisen, während die unbehandelte Kontrolle 4 % Apoptose aufwies. Nach Behandlung mit dem proliferationsfördernden CPA in 1 % Aktivkohle behandeltem FCS war wie in LNCaP Zellen eine Erhöhung des Caspase 8 Gehaltes gegenüber der Kultur in Wachstumsmedium (10 % FCS) zu sehen, obwohl die Apoptoseinzidenz mit 2 % und 1 % nahezu gleich groß war (**Tab. 8, S. 88**). Das Wachstum von MFM-223 Zellen erreichte allerdings nach Zusatz von 10^{-7} M CPA in 1 % Aktivkohle behandeltem Medium nicht die Zellzahl, wie Kulturen, die in Wachstumsmedium (10 % FCS) gehalten wurden (**vergl. Abb. 19 C mit Abb. 19 D, S. 61**). Demnach könnte, wie bei LNCaP Zellen, das Fehlen anderer essentieller Wachstumsfaktoren die Erhöhung von Caspase 8 in diesen MFM-223 Kulturen erklären. Die stärkste Expression von Caspase 8 war in MFM-223 Zellen nach Behandlung mit 10^{-8} M DHT zu sehen. Interessanterweise übertraf dies den Gehalt von Caspase 8 nach Behandlung von MFM-223 Zellen mit 10^{-7} M CAS, obwohl die Inzidenz der Apoptose unter diesen Bedingungen mit 7 % bzw. 8 % vergleichbar war (**Tab. 8, S. 88, Abb. 39, S. 99**). Eine Erklärung hierfür wäre, daß je nach Substanz DHT oder CAS unterschiedliche Signalkaskaden wirksam werden und die Apoptose nach Behandlung mit CAS vermehrt über den mitochondrialen Weg eingeleitet

wird. In LNCaP und MFM-223 Zellen war der Apoptose induzierende Effekt des Antiandrogens CAS sehr groß. Bei MFM-223 Zellen konnte gezeigt werden, daß in 10 % FCS der Zusatz von 10^{-7} M CAS das Wachstum auf 77 % reduzierte. Im Vergleich dazu wurde die Proliferation dieser Zellen nach Zusatz von 10^{-8} M DHT auf 42 % verringert, der Anteil apoptotischer Zellen war jedoch vergleichbar (**Tab. 8, S. 88**). Diese Ergebnisse könnten dafür sprechen, daß durch die Behandlung mit dem Antiandrogen CAS in MFM-223 Zellen in erster Linie Apoptose ausgelöst wird, während die höhere Wachstumshemmung nach Zugabe der geringeren Menge von DHT bei vergleichbarer Apoptoseinzidenz daraufhin deutet, daß neben der Apoptose ein G1-Arrest induziert wurde.

Die Analyse des proapoptotischen BAX in den Zelllinien LNCaP und MFM-223 ergab regelhaft eine deutliche Korrelation zur Inzidenz der apoptotischen Zellen. Mit zunehmender Anzahl apoptotischer Zellen war auch der Gehalt von BAX Protein in beiden Zelllinien erhöht (**Abb. 35, S. 90, Abb. 36, S. 93**).

Die Menge an antiapoptotischem BCL-2 war bei LNCaP Zellen unter optimalen Wachstumsbedingungen ungefähr um die Hälfte geringer als in Kulturen, die in Aktivkohle behandeltem Serum und nach Zusatz von DHT, CPA oder CAS kultiviert wurden. Der Gehalt von BCL-2 war nach Entzug von Wachstumsfaktoren oder nach Zusatz von DHT, CPA oder CAS nahezu gleich (**Abb. 37, S. 95, Abb. 38 A, S. 97**). Wie schon erwähnt wurde, sind die Wirksubstanzen DHT und CPA einem Medium zugesetzt worden, dem durch Aktivkohle-Filterung enthaltene Wachstumsfaktoren entzogen wurden. Daher könnte das Fehlen anderer essentieller Wachstumsfaktoren die Erhöhung von BCL-2 erklären. Zudem erreichten LNCaP Zellen nach Behandlung mit DHT oder CPA in 1 % Aktivkohle behandeltem Medium nicht die Gesamtzellzahl wie LNCaP Zellen, die in Wachstumsmedium (10 % FCS) kultiviert wurden (**Abb. 10, S. 41**). Aus der Literatur ist bekannt, daß LNCaP Zellen nach Hormon-Ablation vermehrt BCL-2 exprimieren (Catz et al., 2001). Eine verstärkte Expression des antiapoptotischen BCL-2 wurde auch nach radioaktiver Bestrahlung oder Chemotherapie beobachtet (Chaudhary et al., 1999, Huang et al., 1998; Catz). Es wird vermutet, daß diese Hochregulation von BCL-2 nach wachstumshemmender oder zytotoxischer Behandlung eine Adaption der Zellen ist, um den programmierten Zelltod zu entgehen. Der BCL-2 Gehalt erfuhr bei MFM-223 Zellen ebenfalls keine Änderungen in Abhängigkeit von der Behandlung (**Abb. 38 B, S. 97**). Der Gehalt des Proteins war in diesen Zellen konstitutiv höher als in LNCaP Zellen. In der Literatur sind bisher keine Untersuchungen über die Expression von BCL-2 in MFM-223 Zellen beschrieben.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Zelllinien aus humanen Karzinomen von Prostata (DU-145, PC-3, LNCaP) und Mamma (MFM-223) untersucht. Die Zelllinien unterscheiden sich hinsichtlich der Mutationen des Proteins p53 und der Androgen-Sensitivität. In den Experimenten sollte verglichen werden, welche Auswirkungen die Mutationen des Zellzyklus und Apoptose regulierenden p53 auf die Regulation der abhängigen Proteine MDM2 ("murine double-minute chromosome-2") bzw. p21/WAF1 (p21/"wt-p53-activated fragment 1") und auf das Wachstumsverhalten haben. Zudem sollte die Apoptose nach Wachstumsfaktoren-Entzug und nach der Behandlung mit Androgenen oder Antiandrogenen überprüft werden.

In den Untersuchungen wurden dem Kultivations-Serum der Zelllinien Wachstumsfaktoren entzogen oder die Hormone DHT (5α -Dihydrotesteron), E_2 (17β Östradiol) bzw. das steroidale Antiandrogen CPA (Cyproteronazetat) oder das nicht-steroidale CAS (Casodex; chem. Bezeichnung Bicalutamid) zugesetzt. Die Prostatakarzinom-Zelllinien DU-145 und PC-3 exprimierten keine Androgen-Rezeptoren und sind daher nicht androgensensitiv. Die androgensensitive Zelllinie LNCaP hingegen reagierte nach Behandlung mit DHT oder dem steroidalen Antiandrogen CPA mit einer Wachstumssteigerung. Das nicht-steroidale Antiandrogen CAS hat dagegen das Wachstum dieser Zelllinie gehemmt. Während der Behandlung mit CAS ergab sich, daß der Gehalt an p53 bei Hemmung der Proliferation von LNCaP Zellen mit stiller Mutation des Gens und wt-Status des Proteins regelhaft anstieg (**vergl. Abb. Z₁, S. 122**). Entsprechend zeigten die Western-Blot Analysen eine erhöhte Menge an MDM2 und p21. Im immunzytochemischen Nachweis von DNA-Fragmenten im TUNEL-Assay wurden vermehrt apoptotische LNCaP Zellen nach Wachstumsfaktoren-Entzug oder nach Behandlung mit CAS nachgewiesen. Western-Blot Analysen zeigten einen Anstieg des proapoptischen Proteins BAX und der Caspase 8 bei unverändertem Gehalt des anti-apoptischen Proteins BCL-2 (**Abb. Z₁, S. 122**). Nach Kultivation der LNCaP Zellen in Wachstumsmedium oder mit den proliferationsfördernden Substanzen DHT bzw. dem steroidalen Antiandrogen CPA war der p53 Gehalt gering, ebenso wie die Menge von MDM2 und p21 (**Abb. Z₁, S. 122**). Im TUNEL-Assay wurden unter diesen positiven Wachstumsbedingungen nur 1-1.5 % apoptotische Zellen nachgewiesen, und die Menge der Apoptose assoziierten Proteine BAX und Caspase 8 war entsprechend gering.

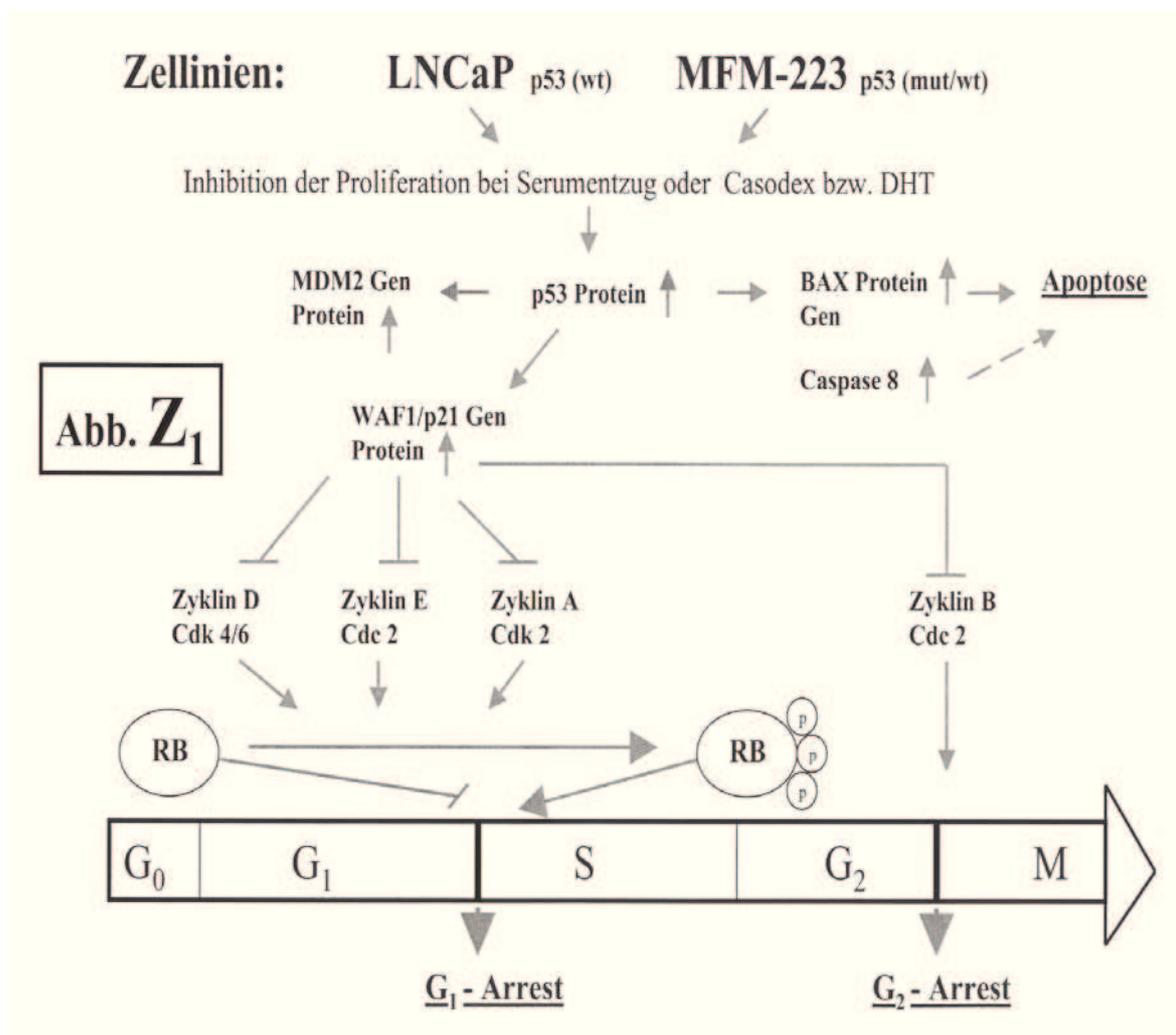
Zellen der androgensensitiven Mammakarzinom-Zelllinie MFM-223 reagierten nach Zusatz von DHT mit Wachstumshemmung. Die Behandlung mit dem steroidalen

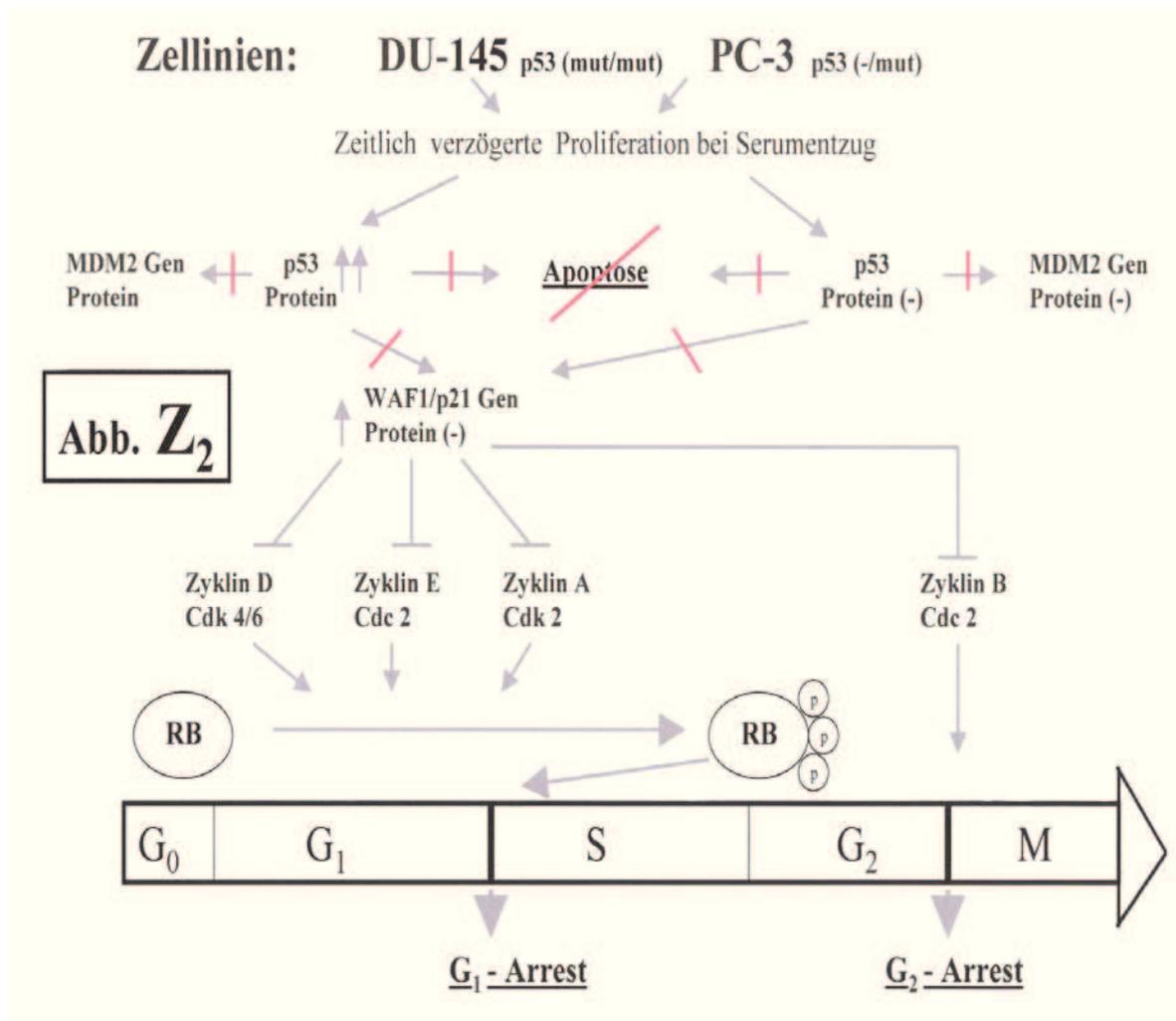
Antiandrogen CPA führte dagegen zur Wachstumssteigerung der Zellen. Im Gegensatz dazu bewirkte der Zusatz des nicht-steroidalen Antiandrogens CAS eine Verminderung der Proliferation. Nach Hemmung des Wachstums durch Wachstums-faktoren-Entzug und nach Behandlung mit DHT oder CAS wurden p53 und die p53-induzierbaren Proteine MDM2 und p21 regelhaft hochreguliert, obwohl aus eigenen Sequenzanalysen erstmals hervor ging, daß das Protein im Core-Anteil durch eine p53-Punktmutation in Codon 132 (K132R) verändert ist (**vergl. Abb. Z₁, S. 122**). Demnach hat die p53-Mutation von MFM-223 Zellen anscheinend keinen Einfluß auf die Funktionsfähigkeit von p53. Die Mutation könnte allerdings nur ein Allel betreffen, und das p53 des verbleibenden Allels entspräche dem Wildtyp-Status. In diesem Fall würde die wt-p53 Komponente die regulativen Funktionen von p53 weiterhin aufrecht erhalten. Entsprechend war unter negativen Wachstumsbedingungen durch Wachstumsfaktoren-Entzug und Zusatz von DHT oder CAS die Anzahl der apoptotischen MFM-223 Zellen im TUNEL-Assay erhöht, und der Gehalt von BAX und Caspase 8 nahm zu (**Abb. Z₁, S. 122**). Die Menge des antiapoptotischen BCL-2 erfuhr dagegen unter diesen Kultivationsbedingungen keine Änderung. Unter optimalen Wachstumsbedingungen in 10 % FCS oder nach Stimulation des Wachstums durch das Antiandrogen CPA waren p53 sowie MDM2 und p21 in Western-Blot Analysen gering exprimiert. Zudem wurden unter diesen positiven Wachstumsbedingungen nur 1-2 % apoptotische Zellen nachgewiesen, vergleichbar mit der Apoptose-Inzidenz von 1-1.5 % unter optimalen Proliferationsbedingungen bei LNCaP Zellen. Entsprechend war in MFM-223 Zellen der Gehalt der Apoptose relevanten Proteine BAX und Caspase 8 bei stimuliertem Wachstum geringer als bei den entsprechenden Kontrollansätzen mit LNCaP Zellen. Dennoch wird in diesen beiden Zelllinien der Zelltod offenbar durch p53 und die davon regulierten Proteine gesteuert.

Im Gegensatz dazu, stehen die Ergebnisse der Untersuchungen an den Androgen-resistenten Zelllinien DU-145 und PC-3. Die Zelllinie DU-145 trägt Mutationen in den Codons 223 und 274 des p53 Gens. Es wurden zwei p53-ähnliche Proteine der Größen von ca. 45 bzw. 50 kD in diesen Zellen detektiert, die offenbar auf Grund einer veränderten Halbwertszeit in DU-145 Zellen akkumulierten. Die Zelllinie PC-3 exprimiert kein p53. Die Proliferation beider Zelllinien wird durch den Entzug von Wachstumsfaktoren im Vergleich zu LNCaP oder MFM-223 Zellen in geringerem Ausmaß gehemmt. Zudem haben Western-Blot Analysen der durch p53-regulierten Proteine MDM2 oder p21 gezeigt, daß diese in DU-145 oder PC-3 Zellen entweder nicht exprimiert oder durch die Variation der Wachstumsbedingungen bei DU-145 und PC-3 Zellen nicht reguliert wurden (**vergl. Abb.**

Z₂, S. 123). Weiterhin ergaben die Untersuchungen im TUNEL-Assay, daß der Entzug von Wachstumsfaktoren keine Apoptose in DU-145 oder PC-3 Zellen auslöste, und demnach ein Zelluntergang offenbar nicht durch p53 und durch die nachregulierten Proteine vermittelt wird.

Das nicht-steroidale Antiandrogen CAS bewirkte eine doppelt so hohe Akkumulation von p53 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in den Androgen sensitiven LNCaP und MFM-223 Zellen, von denen letztere durch steroidale Androgene antiproliferativ beeinflußt werden, während LNCaP Zellen durch steroidale Substanzen wie DHT oder CPA eine Steigerung des Wachstums erfuhren. Die Inzidenz von apoptotischen LNCaP Zellen nach Behandlung mit CAS war mit 12 % im Vergleich zur Apoptose-Inzidenz nach Entzug von Wachstumsfaktoren mit 7 % nahezu doppelt so hoch. Dies impliziert eine spezielle Wirkungsweise von CAS auf p53 und den programmierten Zelltod in LNCaP und MFM-223 Zellen, zu deren Klärung weitere Untersuchungen erforderlich sind.





Zusätzliche Abbildungen der Zusammenfassung

Z₁: Übersicht der Ergebnisse zur Regulation von p53 und Apoptose nach Inhibition der Proliferation von LNCaP Prostatakarzinomzellen und MFM-223 Mamma-karzinomzellen durch Serumentzug oder Casodex bzw. Dihydrotestosteron (DHT).

Z₂: Verzögerte Proliferation und Ausbleiben der Apoptose bei Prostatakarzinomzellen DU-145 und PC-3 bei Serumentzug.

Funktionen: \rightarrow fördernd, \perp hemmend, \leftrightarrow aufgehoben, $- - \rightarrow$ indirekter Effekt, (-) Protein nicht nachweisbar. Rot: kein Effekt für die entsprechende Reaktion.

6 Literaturverzeichnis

Adams, J.M., Cory, S. 1998.

The BCL-2 family: arbiters of cell survival.

Science 281, 1322-1326.

Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J. 1996.

Human ICE/CED-3 protease nomenclature.

Cell 87, 171.

Averesch, S., Schlechte, H., Loening, Th., Loening, St., Hoelzel, F. 1997a.

Growth-regulated expression of p53 in prostate carcinoma cell lines.

J. Mol. Med. 75, 5 (Abstract B101).

Averesch, S., Loening, Th., Schlechte, H., Loening, St., Hölzel, F. 1997b.

Expression of p53 in prostate carcinoma cell lines regulated by growth and androgens/antiandrogens. Abstract, Poster-Beitrag, Kongress der Europ. Tissue Culture Society (ETCS); Mainz.

Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., Oren, M. 1993.

mdm2 expression is induced by wildtype p53 activity

EMBO Journal 12, 461-468.

Beato, M. 1989.

Gene regulation by steroid hormones.

Cell 56, 335-344.

Berchuck, A., Bast, R.L. 1993.

Growth factors, oncogenes and tumorsuppressor genes. In: Cancer of the Ovary, M. Markman, W.J. Hoskins (eds.). Raven Press, New York, pp. 72-74.

Bishop, J.M., 1987.

The molecular genetics of cancer.

Science 235, 305-311.

Bookstein, R., MacGorgan, D., Hilsenbeck, S.G., Sharlhey, F., Allred, D.C. 1993.

p53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancer.

Cancer Res. 53, 3369-3373.

Boveri, T. 1914.

Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren, Gustav Fischer, Jena.

Carroll, A.G., Voeller, H.J., Sugar, L., Gelmann, E.P. 1993.

p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines.

The Prostate 23, 123-134.

Carson-Jurica, M.A., Schrader, W.T., O'Malley, B.W. 1990.

Steroid receptor family: structure and functions.

Endocr. Rev. 11, 201-220.

- Cattaneo-Pangrazzi, R.M., Scott, H., Schwendener, R.A. 2000.
The novel heterodinucleoside dimer 5-FdU-NOAC is a potent cytotoxic drug and a p53-independent inducer of apoptosis in the androgen-independent human prostate cancer cell lines PC-3 and DU-145.
Prostate 45, 8-18.
- Catz, S.D., Johnson, J.L. 2001.
Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor KB and its significance in prostate cancer.
Oncogene 20, 7342-7351.
- Chaudhary, K.S., Abel, P.D., Lalani, E.N. 1999.
Role of the BCL-2 gene family in prostate cancer progression and its implications for therapeutic intervention.
Environ. Health Perspect., 107, 49-57.
- Chlenski, A., Nakashiro, K., Ketels, K.V. Korovaitseva, G.I., Oyasu, R. 2001
Androgen receptor expression in androgen-independent prostate cancer cell lines.
Prostate 47, 66-75.
- Chi, S.G., de Vere White, R.W., Meyers, F.J., Siders, D.B., Lee, F., Gummerlock, P.H. 1994.
p53 in prostate cancer: Frequent expressed transition mutations.
J. Natl. Cancer Inst. 86, 926-933.
- Chinni, S.R., Li, Y., Upadhyay, S., Koppolu, P.K., Sarkar, F.H. 2001
Indole-3-carbinol (I3C) induced cell growth inhibition, G1 cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells.
Oncogene 20, 2927-36.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P., Parletich, N.P. 1994.
Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations.
Science 265, 346-355.
- Cunha, G.R., Donjacour, A.A., Cooke P.S. 1987.
The endocrinology and developmental biology of the prostate.
Endocrinol. Rev. 8, 338-362.
- Cordon-Cardo, C. 1995.
Mutation of cell cycle regulators.
Am. J. Pathol. 147, 545-560.
- Dabre, P., Yates, J., Curtis, S., King, R.J.B. 1983.
Effect of estradiol on human breast cancer cells in vitro.
Cancer Res. 43, 345-354.

- Deppert, W. 1994.
The yin and yang of p53 in cellular proliferation.
Sem. Cancer Biol. 5, 187-202.
- Dorman, D., Hupp, T.R. 2001.
Inhibition of p53-dependent transcription by BOX-I phospho-peptide mimetics that bind p300.
EMBO. Rep. 2, 139-44.
- Dotzlaw, H., Moehren, U., Mink, S., Cato, A.C.B., Iniguez LLuhi, J.A., Baniahmad, A. 2002
The amino terminus of the human AR is target for corepressor action and antihormone agonism.
Mol. Endocrinol. 16, 661-673.
- Duesberg, P.H., Vogt, P.K. 1970.
Differences between the ribonucleic acids of transforming and nontransforming avian tumor viruses.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 67, 1673-1680.
- Duke, R.C., Ojcius, D.M., Young, J.D.E. 1997.
Die Apoptose-Regeln und Fehler beim Zellselbstmord.
Spektrum der Wissenschaft, Verlagsgesellschaft, Heidelberg, Febr., pp. 26-35.
- Effert, P.J., Neubauer, A., Walther, P.J., Liu, E.T. 1992.
Alterations of the p53 gene are associated with the progression of human prostate carcinoma.
J. Urol. 147, 789-793.
- El-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. 1992.
Definition of a consensus binding site for p53.
Nature Genet. 1, 44-49.
- Esteller, M., Tortola, M., Capella, G., Peinado, M.A., Baylin, S.B., Herman, J.G. 2000.
Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status.
Cancer-Res. 60, 129-133.
- Evan, G., Littlewood, T. 1998.
A matter of life and cell death.
Science 281, 1317-1321.
- Evans, R.M. 1988.
The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.
Science 240, 889-895.
- Finaly, C.A. 1993.
The mdm-2 oncogene can overcome wildtype p53 suppression of transformed cell growth.
Mol. Cell. Biol. 13, 301-306.
- Gericke, D. 1978.
Krebs, was wissen wir, was können wir tun?
Naturwiss. 65, 370-375.

- Grana, X., Reddy, E.P. 1995.
Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin-dependent kinases (Cdks), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (Ckis).
Oncogene 11, 211-219.
- Green, D.R. 1998.
Apoptotic pathways: the roads to ruin.
Cell 94, 695-698.
- Green, D.R. 2000.
Apoptotic pathways: Paper wraps stone blunts scissors.
Cell 102, 1-4.
- Hackenberg, R., Lüttchens, S., Hofmann, J., Kunzmann, Hözel, F., Schulz, K.D. 1991.
Androgen sensitivity of the new human breast cancer cell line MFM-223.
Cancer Res. 51, 5722-5727.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wie, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J. 1993.
The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases.
Cell 75, 805-816.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., Oren, M. 1997.
Mdm2 promotes the rapid degradation of p53.
Nature 387, 296-298.
- Harris, S.E., Rong, Z., Harris M.A., Lubahn, D.D. 1990.
Androgen receptor gene mutations in human prostate adenomacarcinoma LNCaP ADEP cells contains a mutation which alters the specificity of the steroid-dependent transcriptional activation region.
Endocrinology 126, 93-96. (suppl.)
- Harris, C.L. 1993.
p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment.
Science 262, 1980-1981.
- Hinds, P.W., Finaly, C.A., Quorten, R.S., Barker, S.J., Fearon, E.R., Levine, A.J. 1990.
Mutant p53 cDNAs from human colorectal carcinomas can cooperate with ras in transformation of rat cells: Comparison of the "hot-spot" mutant phenotypes.
Cell. Growth Differentiation 1, 571-580.
- Hinds, P.W., Weinberg R.A. 1994.
Tumor suppressor genes.
Curr. Op. Gen. Dev. 4, 135-141.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C.C. 1991.
p53 mutations in human cancers.
Science 253, 49-53.
- Hölzel, F., Scherdin, U., Sakuma, S. 1983.
Transition of nonmalignant rat mammary tumor cells to the malignant state.
Cell Biol. Int. Rep. 7, 555-556.

- Honda, T., Kagawa, S., Spurgers, K. B., Gjertsen, B.T., Roth, J.A., Fang, B., Lowe, St.L., Norris, J.S., Meyn, R.E., McDonnell, T.J., 2002
A recombinant adenovirus expressing wild-type Bax induces apoptosis in prostate cancer cells independently of their Bcl-2 status and androgen sensitivity.
Cancer Biol. Ther. 1, 163-167.
- Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Chu, T.M., Wajsman, Z.L., Friedman, M., Papsidero, L., Kein, U., Chai, L.S., Kakati, S., Arya, S.K., Sandberg, A.A. 1980.
The LNCaP cell line: a new model for studies on human prostatic carcinoma.
Prog. Clin. Biol. Res. 37, 115-132.
- Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Kawenski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Ming Chu, T., Mirand, E.A., Muphy, G.P. 1983
LNCaP model of human prostatic carcinoma.
Cancer Res. 43, 1809-1818.
- Huang, A., Gandor-Edwards, R., Rosenthal, S.A., Siders, D.B., Deitch A.D., White, R.W. 1998.
P53 and bcl-2 immunohistochemical alterations in prostate cancer treated with radiation therapy.
Urology 51, 346-351.
- Huang, Z.Q., Li, J., Wong, J. 2002.
AR Possesses an intrinsic Hormone-independent transcriptional activity.
Mol. Endokrinol. 16, 924-937.
- Huggins, C.B., Grand, L.C., Brillantes, F.P. 1961.
Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbones, and its suppression.
Nature 189, 204-207.
- Jacobberger, J.W., Scramkoski, R.M., Zhang, D., Zumstein, L.A., Doerksen, L.D., Merrit, J.A., Wright, S.A., Shults, K.E. 1999.
Bivariate analysis of the p53 pathway to evaluate Ad-p53 gene therapy efficacy.
Cytometry 38, 201-213.
- Jones, D.T., Ganeshaguru, K., Virchis, A.E., Folarin, N.I., Lowdell, M.W., Mehta, A.B., Prentice, H.G., Hoffbrand, A.V., Wickremasinghe, R.G. 2001
Caspase 8 activation independent of Fas (CD95/APO-1) signalling may mediate killing of B-chronic lymphocytic leukaemia cells by cytotoxic drugs or gamma radiation.
Blood 98, 2800-7.
- Kaighn, M.E., Narayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F., Jones, L.W. 1979.
Establishment and characterisation of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3).
Invest. Urol. 17, 16-23.
- Kappes, S., Milde-Langosch, K., Kressin, P., Passlack, B., Dockhorn-Dwormiczak, B., Rohlke, P., Löning, T. 1993.
P53 mutations in ovarian tumors, detected by temperature-gradient gel electrophoresis, direct sequencing and immunohistochemistry.
Int. J. Cancer 64, 52-59.

Kastan, M.B. 1997.

Molecular biology of cancer: The cell cycle. In: Cancer, Principles & Practice of Oncology. De Vita, V.T. Jr., Hellman, S., Rosenberg, St. A. (eds.). Vol. 1; Part 2,6; 5th Ed.; Lippincott-Raven, Philadelphia PA, pp. 121-134.

Kellner, U., Wagner, B., Otto, U., Voigt, K.-D., Dietel, M., Knabbe, C. 1993.

Androgene Regulation sezernierter Wachstumsfaktoren in Prostatakarzinom-Zelllinien und Tumorlinien.

Verh. Dtsch. Ges. Path. 77, 124-128.

Kishi, H., Nakagawa, K., Matsumoto, M., Suga, M., Ando, M., Taya, Y., Yamaizumi, M. 2001

Osmotic shock induces G1 arrest through p53 phosphorylation at Ser 33 by activated p38MAPK without phosphorylation at Ser 15 and Ser 20.

J. Biol. Chem. 276 (42), 39115-22.

Knudson, A. G., 1971.

Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 820-823.

Kokontis, J.M., Hay, N., Liao, S. 1998.

Progression of LNCaP prostate tumor cells during androgen deprivation : hormone-independent growth, repression of proliferation by androgen, and role for p27 Kip 1 in androgen-induced cell cycle arrest.

Mol. Endocrinol. 12, 941-953.

Kominsky, S:L., Hobeika, A.C., Lake, F.A., Torres, B.A., Johnson, H.M. 2000.

Down-regulation of neu/Her-2 by Interferon-gamma in prostate cancer cells.

Cancer Res. 60, 3904-8.

Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W., Reed, J.C. 1993.

Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein : residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes.

Cancer Res. 53, 4701-4714.

Kubbutat, M.H.G., Jones, ST.N., Vousden, K.H. 1997.

Regulation of p53 stability by mdm2.

Nature 387, 299-303

Landanyi, M., Cha, C., Lewis, R., Jhanwar, S.C., Huvos, A.G., Healy, J.H. 1993.

MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma.

Cancer Res. 53, 16-18.

Leach, F.S., Tokino, T., Meltzer, P., Burrell, M., Oliner, J.D., Smith, S., Hill, D.E., Sidransky, D., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. 1993.

P53 Mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas.

Cancer Res. 53, 2231-2234.

Levi, F., Cucchini, F., La Vecchia, C., Negri, E. 1999.

Trends in mortality from cancer in the European union, 1955-94.

The Lancet 354, 742-743.

Levine, A.J., Momand, J., Finlay, C.A. 1991.
The p53 tumor suppressor gene.
Nature 351, 453-456.

Levine, A.J. 1997.
p53, the cellular Gatekeeper for growth and division.
Cell 88, 323-331.

Li, F.P. 1991.
Molecular epidemiology of familial cancers.
In: Brugge, J., Curran, T., Harlow, E., McCormick, F.
Origins of Human Cancer.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp. 211-218.

Lippman, M.E., Bolan, G., Huff, K. 1976.
The effect of androgens and antiandrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture.
Cancer Res. 36, 4610-4618.

Löning, T., Schlechte, H., Friedrichs, K., Schnorr, D., Ditscherlein, G., Bommer, G., Löning, S. 1993.
P53 in urogenitalen Tumore: Eine Expressions- und Mutationsanalyse.
Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 77, 117-118.

Lowe, S.W., Lin, A.W. 2000.
Apoptosis in cancer.
Carcinogenesis 21, 485-495.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall R.J. 1951.
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Magklara, A., Brown, T.J., Diamandis, E.P.D. 2002.
Charakterisation of androgen receptor and nuclear receptor co-regulator expression in human breast cancer cell lines exhibiting differential regulation of kallikreins 2 and 3.
Int. J. Cancer 100, 507-514.

Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F.J., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, F.Z., Bischoff, Tainsky, M.A. 1990.
Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasm.
Science 250, 1233- 1238.

Merck 2003/2004 Katalog.
S. 107.

Metzger, A.K., Sheffield, V.C., Duyk, G., Daneshvar, L., Edwards, M.S., Cogen, P.H. 1991.
Identifaction of a germ-line mutation in the p53 gene in a patient with an intracranial ependymoma.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7825-7829.

- Mickey, D.D., Stone, K.R., Wunderli, H., Mickey, G.H., Vollmer, R.T., Paulson, D.F. 1977.
Heterotransplantation of a human prostatic adenocarcinoma cell line in nude mice.
Cancer Res. 37, 4049-4058.
- Miyashita, T., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., Reed, J.C. 1994.
Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax expression in vitro and vivo.
Oncogene 9, 1799-1805.
- Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D.L., Levine, A.J. 1992.
The mdm2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation.
Cell 69, 1237-1245.
- Nagata, S. 1997.
Apoptosis by death factor.
Cell 88, 355-365.
- Newmeyer, D.D., Farschon, D.M., Reed, J.C. 1994.
Cell-free apoptosis in xenopus egg extracts: Inhibition by BCL-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria.
Cell 79, 353-364.
- Oesterling, J., Fuks, Z., Lee, C.T., Scher, H.I. 1997.
Cancer of the prostate. In: *Cancer, Principles & Practice of Oncology*. De Vita, V.T. jr., Hellman, S., Rosenberg, St. A. (eds.). Vol. 1; Part 3,33; Sect. 4; 5th Ed.; Lippincot-Raven, Philadelphia PA, pp. 1322-1386.
- Oliner, J.D., Kinzler, K.W., Meltzer, P.S., George, D.L., Levine, A.J. 1992.
Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas.
Nature 358, 80-83.
- Oliner, J.D., Pietenpol, J.A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. 1993.
Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumor suppressor p53.
Nature 362, 857-860.
- Olson, D.C., Marechal, V., Momand, J., Chen, J., Romocki, C., Levine, A.J. 1993.
Identification and characterization of multiple mdm2 proteins and mdm2-p53 protein complexes.
Oncogene 8, 2353-2360.
- Oren, M. 1994.
Relationship of p53 to the control of apoptotic cell death.
Sem. Cancer Biol. 5, 221-227.
- Osborn, M., Weber, K. 1982.
Intermediate filaments: cell-type-specific markers in differentiation and pathology.
Cell 31, 303-306.

Owen-Schaub, L.B., Zhang, W., Cusack, J.C., Angelo, L.S., Santee, S.M., Fujiwara, T., Roth, J.A., Deisseroth, A.B., Zhang, W.W., Kruzel, E., Radinsky, R. 1995.
Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce FAS/APO-1 expression.
Mol. Cell. Biol. 15, 3032-3040.

Pavletich, N.P., Chambers, K.A., Pabo, C.O. 1993.
The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots.
Genes Dev. 7, 2556-2564.

Pomerantz, J., SchreiberAgus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Orlow, I., Lee, H.-W., Cordon-Cardo, C., De Pinho, R. A. 1998.
The ink4a Tumorsuppressorgene product p19^{Arf}, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53.
Cell 92, 713-723.

Prescott, D.M., Flexer, A.S. 1990.
Krebs: Fehlsteuerung von Zellen - Ursachen und Konsequenzen.
Spektrum der Wissenschaft. Verlagsgesellschaft, Heidelberg, pp. 105-113.

Preston-Martin, S., Pike, M.C., Ross, R.K., Jones, P.A., Henderson, B.E. 1990.
Increased cell division as cause of human cancer.
Cancer Res. 50, 7415-7421.

Prives, C. 1993.
Doing the right thing: Feedback control and p53.
Curr. Op. Cell. Biol. 5, 214-218.

Prives, C. 1998.
Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit.
Cell 95, 5-8.

Prives, C., Manley, J.L. 2001.
Why is p53 acetylated.
Cell 107, 815-18.

Reed, J.C. 1997.
Double identity for proteins of the Bcl-2 family.
Nature 387, 773-778

Rennie, P.S., Bruchovsky, N., Goldenberg, S.L., Lawson, D., Fletcher, T., Foekens, J.A. 1988.
Relative effectiveness of alternative androgen withdrawal therapies in initiating regression of rat prostate.
J. Urol. 139, 1337-1342.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989.
Molecular cloning.
2.ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 18.49-18.54.

- Schlechte, H., Lenk, S., Becker, J., Rudolph, B., Löning, S.A. 1997.
Analysis of tumor suppressor gene p53 mutations in preneoplasia by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) and sequence.
J. Mol. Med. 75, 5 (Abstract B120).
- Schwede, J., Herrmann, R., Bathke, W., Minssen, A., Machtens, S., Kuczyk, M., Serth, J., Jonas, U. 1997.
p53-expression status predicts long term and recurrence-free survival of prostate cancer patients.
J. Mol. Med. 75, 5 (Abstract B121).
- Selivanova, G., Wiman, G. 1995.
p53: A cell cycle regulator activated by DNA damage.
Adv. Cancer Res. 66, 143-180.
- Shaulian, E., Zaubermann, A., Milner, J., Davies, E.A., Oren, M. 1993.
Tight DNA binding and oligomerization are dispensable for the ability of p53 to transactivate target genes and suppress transformation.
EMBO J. 12, 2789-2797.
- Sheikh, M.S., Li, X.S., Chen, J.Ch., Shao, Z.M., Ordonez, J.V. 1994.
Mechanisms of regulation of WAF1/Cip1 gene expression in human breast carcinoma: role of p53-dependent and independent signal transduction pathways
Oncogene 9, 3407-3415.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., Prives, C. 1997.
DNA damaged-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2.
Cell 91, 325-334.
- Simon, W.E., Albrecht M, Trams G., Dietel M., Hölzel F. 1984.
In vitro growth promotion of human mammary carcinoma cells by steroid hormones, tamoxifen and prolactin.
J. Natl. Cancer Inst. 73, 313-321.
- Simon, W.E., Hänsel, M., Dietel, M., Matthiesen, L., Albrecht, M., Hölzel, F. 1984.
Alteration of steroid hormone sensitivity during the cultivation of human mammary carcinoma cells.
In vitro 20, 157-166.
- Stanbridge, E.J. 1990.
Human tumor suppressor genes.
Ann. Res. Genet. 24, 615-657.
- Steffen, M., Scherdin, U., Duvigneau, C., Hölzel, F. 1988.
Glucocorticoid-induced alterations of morphology and growth of fibrosarcoma cells derived from 7, 12-Dimethylbenzanthracene rat mammary tumor.
Cancer Res. 48, 7212-7218.
- Tang, D.G., Porter, A.T. 1997.
Target to apoptosis: a hopeful weapon for prostate cancer.
Prostate 32, 284-293.

- Tilley, W.D., Wilson, C.M., Marcelli, M., McPaul, M.J. 1990.
Androgen receptor gene expression in human prostate carcinoma cell lines.
Cancer Res. 50, 5382-5386.
- Veldscholte, J., Ris-Stalpeso, C., Kuiper, G.G.J.M., Jenster, G., Berrevoets, C., Claassen, E., Van Rooij, H.C.J., Trapman, J., Brinkmann, A.O., Mulder, E. 1990.
A mutation in the ligand-binding domain of the androgen-receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 173, 534-540.
- Veldscholte, J., Berrevoets, C.A., Brinkmann, A.O., Grootgoed, J.A., Mulder, E. 1992.
Anti-androgens and the mutated androgen-receptor of LNCAP cells: Differential effects on binding and transcription activation.
Biochemistry 31, 2393-2399.
- Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., Stillman, B. 1994.
Inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA.
Nature 369, 574-578.
- Weber, J.D., Kuo, M.L., Bothner, B., DiGiammarino, E.L., Kriwacki, R.W., Roussel, M.F., Sherr, C.J. 2000.
Cooperative signals governing ARF-mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex.
Mol. Cell Biol. 20, 2517-2528.
- Weiss, S.R., Varmus, H.E., Bishop, J.M. 1977.
The size and genetic composition of virus-specific RNAs in the cytoplasm of cells producing avian sarcoma-leukosis viruses.
Cell 12, 983-992.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D. 1993.
p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases.
Nature 366, 701-704.
- Yamato, K., Yamamoto, M., Yasumasa, H., Tsuchida, N. 1995.
A human temperature-sensitive mutant p53^{Val-138}. Modulation of the cell cycle, viability and expression of p53-responsive genes.
Oncogene 11, 1-6.
- Yang, E., Korsmeyer, S.J., 1996.
Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL-2 family and cell death.
Blood 88, 386-401.

7 Danksagung

Ich möchte diese Arbeit meiner Familie widmen. Sie begleitete mich in dieser ereignisreichen Zeit, unterstützte mich unermüdlich und hat wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Für die ausgezeichnete und intensive Betreuung der experimentellen Arbeit, sowie für die ausführliche Diskussion der Ergebnisse bin ich Herrn Prof. Dr. Fritz Hölzel (Abteilung Molekularbiologie des Physiologisch-Chemischen Instituts der Universität Hamburg und der Frauenklinik des UKE, Hamburg) zu besonderem Dank verpflichtet. Es hat mir sehr viel Freude bereitet, bei Ihm zu arbeiten.

Für die Überlassung des Themas und die finanzielle Unterstützung des Projektes sowie für die Bereitstellung der Materialien möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Löning (Frauenklinik, UKE, Hamburg) und Herrn Prof. Dr. Stefan Löning (Urologie, Charité, Berlin) besonders danken.

Insbesondere danke ich Herrn Dr. Horst Schlechte (Urologie, Charité, Berlin) für seine Hilfsbereitschaft und motivierenden Gespräche zur Durchführung der Experimente.

Herrn Prof. Dr. Udo Wienand (Institut für allgemeine Botanik, Universität Hamburg) danke ich für die Unterstützung meines Vorhabens, eine Promotion über ein molekularbiologisches Thema durchzuführen und für die Übernahme der Verpflichtung als Referent dieser Arbeit im Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.

Dr. med. Jian Zheng und Dr. med. Tim Hülkamp danke ich für die schöne gemeinsame Zeit im Labor. Es war eine gute Mischung aus Diskussion, Ansporn und Ablenkung.

Dr. Karin Milde-Langosch und Gabi Rieck (Institut für Pathologie, UKE, Hamburg) möchte ich danken für die Unterstützung bei der Sequenzanalyse und den Western-Blot Analysen. Ihre Hilfsbereitschaft, die motivierenden Gespräche und praktischen Ratschläge haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank den vielen Anderen, die ich nicht persönlich aufgeführt habe.

Dipl.-Biol. Simone Averages-Fellerhoff
Telemannstr. 12, 20255 Hamburg
Tel.: 040/38 83 54

Lebenslauf

Geburtsdatum: 08.11.1968
Geburtsort: Münster/Westfalen
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1975 – 1979	Gottfried-von-Cappenberg-Schule Grundschule in Münster
1979 – 1988	Friedensschule Gesamtschule mit Gymnasialer Oberstufe in Münster

Ausbildung:

Oktober 1988	Studienbeginn im Fachbereich Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität
September 1991	Diplom-Vorprüfung in Münster
April 1992	Wechsel zur Technischen Universität Braunschweig
Mai 1994	Mündliche Diplomprüfung Hauptfach: Biochemie 1. Nebenfach: Zoologie 2. Nebenfach: Mikrobiologie
Juni 1994 – Juni 1995	Diplom-Arbeit in der Abteilung für Elektronenmikroskopie und Histopathologie der Universitätsfrauenklinik des UKE in Hamburg "Zur Analyse von Mutationen im RB1-Gen von Ovarialtumoren"
Juni 1995 – Mai 1997	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen eines Forschungs- projekts der Humboldt Universität, Charité, Berlin und experimentelle Arbeiten zur Promotion "Tumorsuppressorprotein p53 und Expression von Regulatorproteinen des Zellzyklus in humanen Karzinomzellkulturen"
Juni 2000	Geburt unseres Sohnes Oskar Fellerhoff

Sprachkenntnisse: Englisch (Wort und Schrift)

PC-Kenntnisse: Windows 95/98, Origin 95 (Zeichenprogramm), PowerPoint

Hamburg, den 06.04.2004

Abstract

In dieser Arbeit wurde die Expression des Tumorsuppressorproteins p53 in verschiedenen Zelllinien von humanen Karzinomen der Prostata (DU-145, LNCaP, PC-3) oder Mamma (MFM-223) in Abhängigkeit vom Wachstumszustand untersucht. Die Zelllinien unterscheiden sich hinsichtlich des p53 Genstatus und der Androgen-Sensitivität. In den Untersuchungen wurde die Zellproliferation durch Entzug von Wachstumsfaktoren oder durch Behandlung mit Androgenen sowie den Antiandrogenen Cyproteroneacetat oder Bicalutamid ("Casodex", CAS) manipuliert. Anschließend wurde die Expression von p53 und der p53-regulierten Proteine MDM2 und p21 in Western-Blot Analysen geprüft. Immunzytochemische Untersuchungen zum programmierten Zelltod wurden mit Hilfe des TUNEL-Assays unternommen. Der Gehalt an Apoptose-assoziierten Proteinen BCL-2, BAX und Caspase 8 wurde in Western-Blot Analysen überprüft. Es konnte gezeigt werden, daß in LNCaP Zellen mit "stiller" Mutation im p53 Gen und in MFM-223 Zellen mit mutiertem p53 Gen nach Wachstumshemmung ein Anstieg von p53 und der p53-induzierten Proteine MDM2 und p21 erfolgte. LNCaP und MFM-223 Zellen wiesen vermehrt apoptotische Zellen nach Reduktion des Zellwachstums auf. Der Gehalt der Apoptose-assoziierten Proteine BAX und Caspase 8 nahm entsprechend zu.

In DU-145 Zellen mit p53-Mutation in beiden Allelen erfolgte keine Regulation von MDM2. p21 war in diesen Zellen nicht nachzuweisen. In PC-3 Zellen mit Verlust eines Allels und einer "frameshift" Mutation im verbleibenden p53-Allel war keine Expression von MDM2 und p21 nachzuweisen. Bei den Zellen dieser beiden Linien war nach Reduktion des Wachstums auf 50 % keine Apoptose zu finden. Die Ergebnisse zeigen das individual-spezifische Verhalten von Tumorzellen unter verschiedenen Streß-Situationen.