

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. A. C. Feller

**Untersuchungen zu Mechanismen
induzierter Veränderungen der Rad51-Expression
bei Exposition mit DNA-schädigenden und
Apoptose-auslösenden Agenzien**

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Tiantom Jarutat
aus Bangkok

Lübeck 2004

1. Berichterstatter:

Herr Prof. Dr. hum. biol. Horst-Werner Stürzbecher

2. Berichterstatter:

Herr Priv.-Doz. Dr. univ. (Univ. Budapest) Tamás Laskay

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2005

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 07.02.2005

gez. Prof. Dr. med. Peter Dominiak

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen.....	5
2	Einleitung	6
2.1	Allgemeines	6
2.2	Molekulare Onkologie.....	7
2.3	Onkogene.....	8
2.4	Tumorsuppressoren	8
2.5	DNA-Reparaturmechanismen	9
2.6	Rad51 und seine Rolle in der Tumorprogression	10
2.7	Chemotherapeutika und ihr Einfluss auf das Wachstum transformierter Zellen.....	11
2.8	Fragestellung	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Chemikalien und Reagenzien für die Zellkultur	15
3.2	Zytostatika	15
3.3	Proteasominhibitoren.....	16
3.4	Schema bei Versuchen mit Zellgiften	16
3.5	Antikörper.....	17
3.6	Chemikalien und Biochemikalien	17
3.7	Lösungen und Puffer	18
3.8	Geräte und Gebrauchsgegenstände.....	19
3.9	Primer	20
3.10	Verwendete Zelllinie, Expressionssystem und Vektorkonstrukte.....	20
3.11	Zellkulturtechniken – Kultivierung von UiRad51 und UiLacZ	21
3.12	Zellextraktion mit dem Lämmli-System	22
3.13	Zellextraktion mit Igepal-Lysispuffer	22
3.14	Quantitative Proteinbestimmung	22
3.15	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	22
3.16	Westernblot und Immundetektion	23
3.17	Amidoschwarzfärbung der Membranen	23
3.18	Extraktion zytoplasmatischer mRNA.....	23
3.19	RT-PCR (Reverse Transkriptase – Polymerase Kettenreaktion)	23
3.20	Agarose Gelelektrophorese	24
3.21	MTT-Assay.....	25

4	Ergebnisse	26
4.1	Charakterisierung Rad51-überexprimierender Osteosarkomzelllinie UiRad51 ..	27
4.2	Modulation des Rad51-Gehalts in UiRad51-Zellen durch Zellgifte	29
4.3	Dynamik der Rad51- und p21-Abnahme in UiRad51	31
4.4	Analyse der Rad51-mRNA-Expression in UiRad51-Zellen	33
4.5	Untersuchung eines möglichen Caspase-3-abhängigen Rad51-Abbaus	35
4.6	Proteasom-abhängige Rad51-Degradation	36
4.7	Nachweis der reversiblen Inhibition des proteasomalen Rad51-Abbaus	39
4.8	Nachweis einer Apoptoseresistenz nach erfolgter Rad51-Überexpression	40
5	Diskussion.....	43
5.1	Die Rolle von DNA-Reparatursystemen und Rad51 in der Tumorgenese und Resistenz.....	43
5.2	Modulation des Rad51-Gehalts durch DNA-schädigende Zytostatika	47
5.3	Modulation des Rad51-Gehalts durch Apoptose-induzierende Substanzen.....	48
5.4	Mechanismen der Modulation des Rad51-Gehalts.....	52
5.5	Hinweise für die Induktion einer proteasomalen p21-Degradation durch Apoptosegifte	55
5.6	Mechanismen der Rad51-induzierten Apoptoseresistenz.....	56
5.7	Rad51 in der spezifischen Tumorthherapie - Ausblick	57
6	Zusammenfassung	59
7	Literaturverzeichnis	60
8	Danksagung.....	71
9	Lebenslauf	72

1 Abkürzungen

5-FU	– 5-Fluorouracil
APC	– adenomatöse Polyposis coli
BCA	– Bicinchonsäure
CDK	– cyclinabhängige Kinase
CLB	– Chlorambucil
CLL	– chronische lymphozytäre Leukämie
CML	– chronische myeloische Leukämie
DMEM	– Dulbecco´s modifiziertes Eagle-Medium
DSB	– DNA-Doppelstrangbruch
FACS	– fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FCS	– fetales Kälberserum
GIST	– gastrointestinaler Stromatumor
HNPCC	– hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
HR	– homologe Rekombination
LOH	– Verlust der Heterozygotie
MDR(P)	– Multiresistenz-Protein
MEN	– multiple endokrine Neoplasien
MTT	– 3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyl-tetrazoliumbromid
MTX	– Methotrexat
NHEJ	– nicht-homologe Verknüpfung von DNA-Enden
NMR	– nuklear-magnetische Resonanz
PARP	– Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	– Phosphat-gepufferte Salzlösung
(RT)-PCR	– (Reverse Transkriptase) Polymerase Kettenreaktion
PVDF	– Polyvinylidenfluorid
SDS-PAGE	– Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ssDNA	– einzelsträngige DNA
TAE	– Tris-Acetat-EDTA
UPM	– Umdrehungen pro Minute

2 Einleitung

2.1 Allgemeines

In heutiger Zeit spielen molekulargenetische und zellbiologische Aspekte bei der Erforschung von Tumorgenese und Tumorprogression eine zunehmend wichtigere Rolle. Zwar wurde schon 1914 von Boveri erstmals ein Zusammenhang zwischen Chromosomenschäden und Krebs vermutet und später von Bauer eine somatische Mutationshypothese der Kanzerogenese postuliert (Boveri 1914; Bauer 1928). Die Erforschung von Tumoren war zu jener Zeit jedoch nur in beschreibender Weise möglich. Man war beschränkt auf die Beobachtung der Krankheitsverläufe bei Patienten und die makroskopische und mikroskopische Begutachtung des Tumormaterials durch die klassische Pathologie. Bei der histologischen Aufbereitung des Materials für die Mikroskopie standen damals nur unspezifische Färbemethoden wie die klassische Hämatoxylin-Eosin Färbung zur Verfügung. Diese Färbungen beinhalten meist eine Kombination saurer und basischer Farbstoffe und unterscheiden damit azidophile (basische) und basophile (saure) Strukturen im Gewebe. Dieses reichte zwar aus, um in deskriptiver Weise morphologische Klassifikationen und Einordnungen von Tumorerkrankungen vorzunehmen, die zum großen Teil bis in heutige Zeit Bestand haben. Das zelluläre Geschehen, welches Tumoren entstehen lässt, konnte damit aber nicht bis ins Einzelne ergründet werden.

Erst in den letzten 30 Jahren wurden Methoden entwickelt, die die medizinische und biologische Forschung insofern revolutionierten, als sie Einblick in zelluläre und subzelluläre Strukturen und Vorgänge erlaubten. Die Zytogenetik entwickelte Färbemethoden (z. B. Quinacrine-Mustard und Giemsa), mit denen einzelne Chromosomen nach Form und spezifischer Bandenmusterung eindeutig identifiziert werden konnten. Damit war es möglich, Umordnungen im Genom wie z. B. Translokationen, Amplifikationen oder Inversionen nachzuweisen. So wurden auch gehäuft genetische Aberrationen in Tumoren gefunden, und es konnte z. B. das für die chronische myeloische Leukämie typische Philadelphia-Chromosom als eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 dargestellt werden (Rowley 1973).

Weiterhin wurden Techniken entwickelt, die direkt Einblick in molekulare zelluläre Vorgänge erlaubten und neue Fachdisziplinen begründeten. So bedient sich die Molekularbiologie der Polymerase Kettenreaktion (PCR), Klonierung und Sequenzierung, um das Genom zu entschlüsseln. Die moderne Zellbiologie nutzt die Möglichkeit, zelluläre Vorgänge zu untersuchen, indem sie Zellen außerhalb des Organismus in Kultur züchtet und durch

gentechnische Methoden manipuliert. Die Proteinbiochemie verwendet Verfahren wie Gelelektrophorese und Immunoblot, Röntgeninterferenz- und NMR-Spektroskopie, um die Struktur und Funktion von Proteinen zu untersuchen. Nicht zuletzt sei auf die immense Bedeutung von Antikörpern hingewiesen, durch deren Einsatz in der Forschung es in verschiedener Form ermöglicht wird, spezifisch Proteine nachzuweisen, zu quantifizieren und zu lokalisieren (z. B. „fluoreszenzaktivierte Zellsortierung“ – FACS, immunhistochemische und Immunfluoreszenzfärbungen, Immunoblots). Mit Hilfe dieser Techniken ist es möglich geworden, die Krebserkrankung als molekulargenetische Erkrankung zu charakterisieren und die Krebsentstehung auf molekularer Ebene näher zu untersuchen.

2.2 Molekulare Onkologie

Die Existenz familiär gehäufte Krebserkrankungen wie die MEN-Syndrome (multiple endokrine Neoplasien), das hereditäre Retinoblastom oder die adenomatöse Polyposis coli (APC) zeigen, dass zumindest ein Teil der Krebserkrankungen erblich und somit genetisch bedingt sind (Thakker 1998; Fearnhead et al. 2001). Zudem ist bekannt, dass erbgutschädigende chemische Substanzen und ionisierende Strahlung Krebs auslösen können. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Krebserkrankung an sich eine primär molekulargenetische Krankheit ist, die durch Mutation bestimmter Gene verursacht wird.

Moderne Theorien der Krebsentstehung stimmen dahingehend überein, dass allen Arten des Krebses die unkontrollierte Proliferation eines durch Mutationen erfolgreich etablierten Zellklons gemeinsam ist. Der Prozess der Tumorgenese ist komplex, und im Rahmen der sogenannten „multiple-hit“-Hypothese wird davon ausgegangen, dass mehrere Mutationen nötig sind, um eine Zelle zu transformieren (Vogelstein und Kinzler 1993). Zu den typischen tumorassoziierten Genveränderungen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Tumorgenese und Tumorprogression beitragen, gehören unter anderem Translokationen (z. B. t(9;22) bei chronischer myeloischer Leukämie (CML)), Amplifikationen (z. B. *ERBB*, EGF-Rezeptorgen in Mamma- und Ovarialkarzinomen (Gullick 1990; Fajac et al. 1995)), Deletionen (z. B. Retinoblastomlocus auf Chromosom 13) und Punktmutationen (z. B. Mutationen des *p53*-Gens in über 40% aller humanen Tumoren; Mutationen des *ras*-Gens in Pankreas-, Schilddrüsen- und kolorektalen Karzinomen (Bos 1989)).

Durch Kopplungsanalysen konnte die Lokalisation derjenigen Gene kartiert werden, die gehäuft bei Krebserkrankungen verändert sind (u. a. Rb, APC oder p53 (Fearon 1997)). Die gezielte Klonierung dieser Gene ermöglichte es, ihre Rolle innerhalb des Zellgeschehens näher zu analysieren. Dass diese genetischen Veränderungen nicht nur Epiphänomene

sind, sondern ursächlich zur Tumorentstehung beitragen, konnte unter anderem durch Versuche mit transgenen Tieren gezeigt werden. Die gentechnische Veränderung dieser Tiere durch jene mutierten Gene erzeugte spezifisch Tumoren, aus denen die verwendeten Gene ursprünglich isoliert wurden (Alexander et al. 1989; Heisterkamp et al. 1990; Santoro et al. 1996).

Tumorassoziierte Gene kodieren für Proteine, die Bestandteile von Signaltransduktionswegen sind oder Funktionen der Zellzyklusregulation wahrnehmen. Diese Gene wirken physiologisch entweder primär proliferationsfördernd (Onkogene) oder -hemmend (Tumorsuppressorgene). Genetische Veränderungen, die entweder zu einer Überaktivität von Onkogenen und/oder einem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen führen, bewirken dementsprechend eine unkontrolliert gesteigerte Proliferation von Zellen.

2.3 Onkogene

Untersuchungen an transformierenden Viren zeigten, dass in die Zelle eingeschleuste virale Gene zu tumorösem Wachstum führen können (Wyke 1997). Diese Gene wurden daher als virale Onkogene (v-onc) bezeichnet. Die Viren hatten die transformierenden Gene aus ihren Wirtszellen akquiriert, weswegen die zellulären Pendanten dieser Gene entsprechend als zelluläre Onkogene (c-onc) oder einfach als Onkogene bezeichnet werden. Das onkogene Potenzial liegt demnach in den Zellen selbst begründet. Zu den betroffenen Genen gehören Transkriptionsfaktoren wie Myc oder Signaltransduktionsproteine wie Ras, die normalerweise den Zellzyklus und die Zellteilung positiv regulieren. Ihre strukturelle Veränderung oder Dysregulation kann zu einem Impuls einer unkontrollierten Proliferation führen. Da die Mutation eines der beiden homologen Gene ausreicht, um einen tumorigenen Phänotyp zu erzeugen, wirken transformierende Mutationen in Onkogenen in der Regel dominant.

2.4 Tumorsuppressoren

Tumorsuppressoren haben in ihrer physiologischen Funktion einen hemmenden Einfluss auf die Zellproliferation. Zu ihren Hauptaufgaben zählt die Überwachung und Wiederherstellung der genomischen Integrität. Bekannte Tumorsuppressorproteine sind p53, pRb (Retinoblastomprotein) und BRCA 1 und 2. Mutationen in Tumorsuppressorgenen wirken meist rezessiv, d. h. erst nach Veränderung in beiden Allelen bzw. nach Verlust der Heterozygotie (LOH).

Zellen sind in größerem oder kleinerem Umfang stets Strahlung oder chemischen Noxen ausgesetzt, die potenziell erbgutschädigend sind. Außerdem birgt jede Zellteilung und Replikation des Genoms die Gefahr einer Mutation. Damit Veränderungen des Erbguts nicht an Tochtergenerationen weitergegeben werden und diese sich als Mutanten im Zellverband etablieren, gibt es innerhalb des Zellzyklus sogenannte „Checkpoints“. An den G₁/S- und G₂/M-Checkpoint wird die Integrität des Genoms durch spezielle Proteine überwacht. Potenziell gefährliche DNA-Schäden werden durch „Schadenssensoren“ wie ATM (Genprodukt des Ataxia teleangiectasia Gens) oder DNA-PK (DNA-Proteinkinase) erkannt. Im weiteren Verlauf wird u. a. p53 aktiviert, welches für verschiedene Gene transaktivierende Eigenschaften hat und dadurch maßgeblich die darauffolgenden Vorgänge bestimmt. So kann p53 u. a. über Transaktivierung des Gens *CDKN1A*, welches die Expression des Proteins p21^{WAF-1} bedingt, einen Zellzyklusarrest herbeiführen, damit geschädigtes Erbgut repariert werden kann (Gartel und Tyner 2002). Außerdem ist p53 selbst mit Reparaturvorgängen assoziiert. Ein Beispiel ist hier die Interaktion von p53 mit Rad51, welches in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) eine zentrale Rolle spielt (Sturzbecher et al. 1996). Alternativ kann p53 über Transaktivierung proapoptotischer Gene wie dem *bax*-Gen Apoptose auslösen (Miyashita und Reed 1995). Ein Hinweis dafür, dass p53 bei der Tumorentstehung eine wichtige Rolle spielt, ist die Tatsache, dass es in über 40% aller menschlichen Tumoren mutiert ist (Selivanova 2001).

Weitere wichtige Tumorsuppressoren stellen die brustkrebsassoziierten *BRCA 1* und *2* Gene dar. Mutationen der *BRCA* Gene beim Menschen gehen mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer Brustkrebserkrankung einher. *BRCA* Gene codieren für Proteine, die im Zellkern lokalisiert sind und deren Expression besonders in proliferierenden Epithelien wie der Brustdrüse während der Pubertät oder Schwangerschaft hoch ist. Die Genprodukte *BRCA 1* und *2* sind an DNA-Reparaturvorgängen und an der homologen Rekombination beteiligt. Insbesondere *BRCA 2* ist in Assoziation mit Rad51 für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen von Bedeutung. Das Fehlen der C-terminalen Rad51-Interaktionsdomäne von *BRCA 2* resultiert in einer erhöhten Rate an DNA-Doppelstrangbrüchen (Sharan et al. 1997; Patel et al. 1998).

2.5 DNA-Reparaturmechanismen

Ein zentraler Bestandteil zur Sicherung der Integrität des Genoms sind DNA-Reparatursysteme. Wird die DNA in solcher Art geschädigt, dass noch ein intakter Matrizenstrang zur Resynthese vorhanden ist, stehen Reparatursysteme wie Basenexzision,

Nukleotidexzision und die Reparatur durch das „mismatch“-Reparatursystem zur Verfügung. Es existieren jedoch auch Schäden, bei denen kein intakter DNA-Strang mehr bestehen bleibt, um als Matrize zu fungieren. Dies ist bei DNA-Doppelstrangbrüchen der Fall, welche vornehmlich durch γ -Strahlung oder bestimmte chemische Mutagene wie z. B. Mitomycin entstehen. Diese Schäden können mittels nicht-homologer Verbindung von DNA-Enden (NHEJ-„non homologous end joining“) durch DNA-Proteinkinase (DNA-PK) und anderen Proteinen behoben werden (Valerie und Povirk 2003). NHEJ wird auch bei physiologischen Doppelstrangbrüchen angewandt, die beim Rearrangement der T-Zell-Rezeptoren entstehen (Lieber et al. 2003). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, DSB durch homologe Rekombination (HR) zu reparieren. Die HR wird beim Menschen vornehmlich durch das Protein Rad51 reguliert. Homologe Rekombination verwendet ein unversehrtes homologes Chromosom oder das intakte Schwesterchromatid als Matrize, um eine in der Regel fehlerfreie Reparatur zu gewährleisten. Dabei lagert sich der betroffene Bereich des intakten, homologen Chromosoms oder des Schwesterchromatids an das offene Ende des Doppelstrangbruchs. Durch Einzelstranginvasion in den homologen DNA-Abschnitt wird ein neuer DNA-Strang erzeugt, welcher dann wiederum als Matrize für den Komplementärstrang genutzt wird (Shinohara und Ogawa 1995). Auch bei der physiologischen Rekombination in der Meiose wird Rad51 in den synaptonemalen Komplexen gefunden (Barlow et al. 1997).

2.6 Rad51 und seine Rolle in der Tumorprogression

Rad51 ist das eukaryontische Homolog zum RecA-Protein in *E. coli*. Der Genlocus befindet sich beim Menschen auf Chromosom 15 und codiert für ein 37kDa großes Protein, bestehend aus 339 Aminosäuren. Rad51 ist zentral an der homologen Rekombination und an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt (Henning und Sturzbecher 2003).

Doppelstrangbrüche, die durch Einwirkung ionisierender Strahlung oder chemischer Agenzien entstehen, werden unter anderem durch ATM, dem Produkt des Ataxia teleangiectasia Gens, detektiert. ATM komplexiert mit c-Abl, welches wiederum Rad51 an spezifischen Tyrosinresten phosphoryliert, wodurch eine Assoziation mit anderen Faktoren wie Rad52 ermöglicht wird (Chen et al. 1999). Aktiviertes Rad51 ist in oligomerisierter Form in sogenannten Foci im Zellkern zu finden (Raderschall et al. 2002). In diesen Foci bildet Rad51 mit einzelsträngiger DNA sogenannte Nucleofilamentkomplexe, welche den ersten Schritt für den DNA-Strangaustausch markieren (Baumann und West 1998). Diese

Komplexe können durch andere Proteine wie Rad54 beeinflusst werden (Mazin et al. 2003)

Rad51 übt seine Funktionen in Assoziation mit verschiedenen anderen Proteinen aus. Die Genprodukte der *BRCA1*- und *BRCA2*-Gene haben jeweils eine Bindungsdomäne für Rad51. So kann zum Beispiel die Foci-Bildung abhängig und unabhängig von BRCA2 geschehen (Tarsounas et al. 2003). BRCA2 beeinflusst die Funktion von Rad51 zusätzlich durch eine BRC-repeat Domäne. Sie ist strukturell der Oligomerisierungsdomäne von Rad51 ähnlich und ist imstande, die Oligomerisierung und Nucleofilamentformierung von Rad51 zu regulieren. Des Weiteren wurde gezeigt, dass p53 und Rad51 direkt miteinander interagieren (Sturzbecher et al. 1996). p53 nimmt dabei offenbar regulatorische Funktionen wahr und wählt den jeweils passenden Reparaturmechanismus für DNA-Schäden aus (Henning und Sturzbecher 2003).

Rad51 hat offensichtlich auch für das Zellüberleben fundamentale Bedeutung. Tsuzuki et al. zeigten, dass eine Rad51^{-/-} Mutation in Mäusen schon im Embryonalstadium vor der Implantation zum Tode führt (Tsuzuki et al. 1996).

In einigen Tumoren (Mamma, Urothel) konnte durch immunhistochemische Methoden eine Rad51-Überexpression dargestellt werden. So zeigten Maacke et al. eine positive Korrelation zwischen Rad51-Überexpression und histologischem Grading von Mammatumoren (Maacke et al. 2000). CML-Zelllinien, die das Philadelphiagenprodukt bcr/Abl exprimieren, weisen häufig eine erhöhte Rad-Expression auf, welche offensichtlich in kausalem Zusammenhang mit der Resistenz gegenüber DNA-Doppelstrangbruch-induzierenden Agenzien wie Mitomycin oder Cisplatin steht (Slupianek et al. 2001). Ferner konnte durch Experimente mit Sense- und Antisensenukleotiden gezeigt werden, dass Rad51 eine entscheidende Rolle bei der Resistenz gegenüber Etoposid spielt (Hansen et al. 2003). Die Rad51-Überexpression in Tumoren scheint also nicht nur den Charakter eines Epiphänomens zu haben. Vielmehr trägt eine Rad51-Überexpression vor allem durch die resultierende Resistenzentwicklung gegenüber Zytostatika direkt zur Malignität bei.

2.7 Chemotherapeutika und ihr Einfluss auf das Wachstum transformierter Zellen

Neben der Bestrahlung und der Operation gehört die Chemotherapie mit Zytostatika zu den Grundpfeilern der klassischen Krebstherapie.

Durch den Einsatz von Zytostatika ist es möglich, Krebs auf systemischer Ebene zu therapieren. Ihre Zytotoxizität wird besonders in schnell proliferierenden Zellen wirksam, weswegen transformierte Zellen in der Regel sensibel gegenüber chemotherapeutischen

Agenzien sind. Bedingt durch die fehlende Selektivität von Chemotherapeutika werden auch Körperzellen geschädigt, die physiologischerweise eine erhöhte Proliferationsrate haben, wie z. B. Schleimhautepithelien, Haarfollikel, das Keimepithel des Hodens und das blutbildende Knochenmark.

Als Zytostatika werden sowohl synthetische Chemotherapeutika als auch Antibiotika, aus Pflanzen oder Mikroorganismen isolierte Stoffe, verwendet.

Spindelgifte wie Paclitaxel besitzen eine mitosehemmende Eigenschaft, indem sie mit der Bildung von Kernspindeln interferieren (Bhalla 2003).

Zur Gruppe der Antimetaboliten gehören unter anderem 5-Fluorouracil (5-FU) und Methotrexat (MTX). 5-FU hemmt die DNA-Synthese und führt zu Fehleinbau von Nukleotiden in der RNA. MTX stört als Folsäureantagonist die Nukleotidsynthese in der G₁-Phase (Chen und Grem 1992).

Zu den Alkylanzien werden Stoffe gezählt, die die DNA Struktur direkt verändern und abnorme Basenpaarung, DNA-Crosslinking oder DNA-Spaltungen herbeiführen. Zu ihnen gehören Busulfan, die N-Loxiderivate Cyclophosphamid und Ifosfamid sowie die Platin-komplexe Carboplatin und Cisplatin (Hall und Tilby 1992).

Eine weitere wichtige Gruppe bilden die aus Streptomyces-Arten isolierten Anthrazykline. Zu ihnen gehören Doxorubicin, Epirubicin und Daunorubicin. Sie induzieren DNA-Doppelstrangbrüche durch Hemmung der Topoisomerase II und durch Bildung freier Radikale. Außerdem interkalieren sie mit der DNA-Doppelhelix. Sie wirken deshalb vor allem in der S-Phase hemmend auf das Wachstum (Hortobagyi 1997).

Ein großes Problem der zytostatischen Therapie ist die Resistenzentwicklung des Tumorgewebes. Maligne Tumoren sind durch zwei wesentliche Merkmale charakterisiert, die unkontrollierte Proliferation und die genomische Instabilität, welche eine gesteigerte Mutationsrate impliziert. Die genomische Instabilität kann sogar von einigen direkt an der DNA angreifenden Zytostatika wie den Alkylanzien oder Anthrazyklinen weiter erhöht werden. Das Tumorgewebe reagiert in einem Selektionsprozess analog der Resistenzbildung bei Bakterien gegen Antibiotika. In diesem Prozess expandieren Zellklone, die die Eigenschaft erworben haben, trotz Einwirkung von Zytostatika zu überleben. Diese Resistenzbildung kann durch Inaktivierung (vermehrter enzymatischer Abbau; verminderte Bioaktivierung) oder beschleunigte Ausschleusung aus dem Zytoplasma erfolgen. Bei der Ausschleusung spielt die verstärkte Expression des MDR-Proteins („multi drug resistance protein“) bzw. des P170-Glykoproteins eine entscheidende Rolle. Ein weiterer Weg, speziell der Einwirkung von Alkylanzien und anderen DNA-schädigenden Agenzien

entgegenzuwirken, ist eine gesteigerte DNA-Reparaturrate (Hansen et al. 2003). Scheinbar paradoxerweise erschweren dabei gerade diejenigen Mechanismen die Tumorthherapie, die ursprünglich vor maligner Entartung schützen sollten.

Moderne Therapiestrategien zielen auf charakteristische molekulare Veränderungen in Tumoren, um eine möglichst spezifische und damit nebenwirkungsarme Therapie zu ermöglichen. So inhibiert Gleevec[®] (Imatinib) spezifisch das Philadelphiagenprodukt „bcr-Abl“, seine Haupteinsatzgebiete sind die CML und GIST (gastrointestinaler Stromatumor) (Demetri et al. 2002; Kantarjian et al. 2002). Herceptin[®] (Trastuzumab) inhibiert als monoklonaler Antikörper den HER2-Rezeptor und wird bei der Therapie von HER2-positiven Mammakarzinomen angewandt (Pegram et al. 1998; Molina et al. 2001). Weitere Ansätze bestehen in der Modulation der Apoptose über Inhibition des anti-apoptotischen bcl-2 Proteins oder aber in einer Wiederherstellung von Wildtypfunktion von mutiertem p53 (Frankel et al. 2001; Fojo und Bates 2003). Diese Strategien versprechen zunächst eine Effektivitätssteigerung klassischer Chemotherapeutika durch Entgegenwirken von Resistenzmechanismen in Tumoren (Fojo und Bates 2003).

In 2.6 wurde beschrieben, dass überexprimiertes Rad51 mit einer Zytostatikaresistenz in malignen Tumorzellen korreliert und höchstwahrscheinlich mitursächlich für die Entstehung der Resistenz ist. Die Rad51-Überexpression kann somit als direktes molekulares Charakteristikum bestimmter resistenter Tumorzellen aufgefasst werden. In diesem Zusammenhang könnte Rad51 ein wichtiges neues Zielprotein, sog. „molecular target“, bei der Entwicklung neuer, spezifischer Chemotherapeutika darstellen. Durch eine spezifische Modulation/Suppression der Rad51-Funktion könnte eine Verzögerung oder Einschränkung der Resistenzentwicklung erreicht werden.

2.8 Fragestellung

In Rad51-überexprimierenden Zellen konnte eine erhöhte Resistenz gegenüber verschiedenen Zytostatika nachgewiesen werden (Kremer 2003). Dabei erstreckte sich die Resistenz nicht nur auf DNA-Doppelstrangbruch (DSB)-induzierende Zytostatika wie Mitomycin C, Cisplatin oder Calicheamicin- γ 1, sondern auch auf nicht-DSB-induzierende Substanzen wie z. B. MTX und Taxol. Ferner wurde gezeigt, dass die durch verschiedene Agenzien induzierte Apoptose in Zellen mit überexprimiertem Rad51 inhibiert wird (Kremer 2003).

Die bekannte Funktion von Rad51 als Reparaturprotein für DSB bietet hier keine hinreichende Erklärung für die Resistenzbildung und Apoptoseinhibition. Somit liegt die Vermutung nahe, dass Rad51 neben der Reparatur durch homologe Rekombination weitere intrinsische Funktionen aufweist, deren nähere Aufklärung eine wichtige Rolle im Verständnis der Resistenzbildung maligner Tumoren spielen könnte.

Um weiteren Einblick in die Mechanismen der Resistenzbildung und anti-apoptischen Wirkung der Rad51-Überexpression auf molekularer Ebene zu erhalten, sollen in dieser Arbeit intrazelluläre Veränderungen durch Zytostatikaeinwirkung in Rad51-überexprimierenden Zellen erfasst und charakterisiert werden. Besondere Berücksichtigung erfahren hierbei die direkten Veränderungen bei Rad51 und assoziierter Proteine wie p21 und p53 im Kontext der Zytostatikaexposition und Apoptoseinduktion durch verschiedene Agenzien. So soll die Frage geklärt werden, ob die Einwirkung Apoptose-induzierender wie auch nicht-induzierender zytostatischer Substanzen Einfluss auf die Rad51-Expression nimmt. Sollte dies der Fall sein, stellt sich die Frage nach dem Mechanismus einer etwaigen Wechselwirkung zwischen Zytostatikum und Rad51-Expression.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Reagenzien für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM):	Invitrogen, Leek, NL
Dimethylsulfoxid (DMSO):	Merck, Darmstadt, D
Neomycin:	Sigma, Deisenhofen, D
Ponasteron A:	Invitrogen, Leek, NL
Trypsin:	PAA Laboratories GmbH, Linz, A
Zeocin:	Invitrogen, Leek, NL

3.2 Zytostatika

Bezeichnung	Hersteller	Eingesetzte Konzentration (soweit nicht anders angegeben)
Actinomycin D:	Sigma, Deisenhofen, D	0,3µg/ml
5-Fluorouracil (5-FU):	Lederle Arzneimittel GmbH & Co, Wolfratshausen, D	1mM
Calicheamicin-γ1:	Sigma, Deisenhofen, D	1nM
Methotrexat (MTX):	Lederle Arzneimittel GmbH & Co, Wolfratshausen, D	1mM
Staurosporin:	Sigma, Deisenhofen, D	1µM
Doxorubicin:	Pharmacia + Upjohn GmbH, Erlangen, D	17,25µM
Cisplatin:	Bristol Myers Squibb GmbH, München, D	200µM

3.3 Proteasominhibitoren

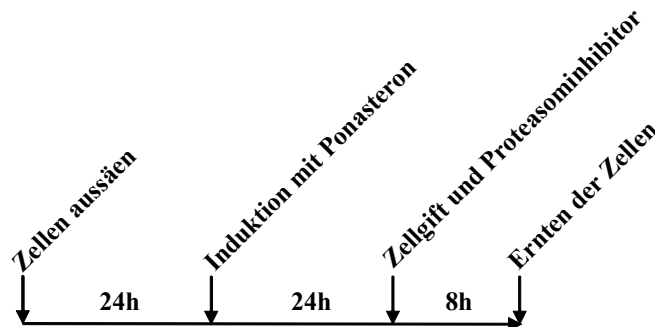
Zur spezifischen Inhibition von Proteasomen wurden die Peptidyl-Aldehyde MG-132 (*N*-Carbobenzoxyl-Leuciny-Leuciny-Leucinal) (Hersteller: Calbiochem/Merck KGaA, Darmstadt, D) und ALLN (*N*-Acetyl-Leucyl-Leucyl-Norleucinal) (Calbiochem/Merck KGaA, Darmstadt, D) eingesetzt, welche die Peptidaseaktivität von 20S- und 26S-Proteasomen reversibel inhibieren (Rock et al. 1994). Des Weiteren wurde der Inhibitor Lactacystin verwendet (Calbiochem/Merck KGaA, Darmstadt, D), der spezifisch und irreversibel das 20S-Proteasom inhibiert durch kovalente Modifikation einer Threoninseitenkette im katalytischen Zentrum der MB-1 Untereinheit (Fenteany et al. 1995).

Eingesetzte Konzentrationen:

- MG-132: 2,5-25 μ M
- ALLN: 3,13-25 μ g/ml
- Lactacystin: 2,5-25 μ M

3.4 Schema bei Versuchen mit Zellgiften

Soweit nicht anderweitig angegeben, wurde folgendes Versuchsschema bei der Exposition der UiRad51-Zellen mit Giften und Proteasominhibitoren angewandt:



Die Induktion mit Ponasteron erfolgte mit einer Konzentration von 0,5 μ g/ml.

3.5 Antikörper

Bezeichnung	Quelle (Referenz)	erkanntes Antigen	Typ / Herkunft
1G8	eigene Arbeitsgruppe, (Sturzbecher et al. 1996)	Rad51	monoklonal, Maus
anti-p21	PharMingen, San Diego, USA, (el-Deiry et al. 1993)	p21	monoklonal, Maus
anti-PARP	PharMingen, San Diego, USA, (Kaufmann et al. 1993)	PARP	monoklonal, Maus
anti-MausIgG-HRPO (Meerrettich-Peroxidase konjugiert)	Sigma, Deisenhofen, D, (Voller und Bidwell 1976)	Maus IgG	monoklonal, Ziege
DO-1	Calbiochem, San Diego, USA, (Pilch et al. 1994)	p53	monoklonal, Maus

3.6 Chemikalien und Biochemikalien

Acrylamid (30%):	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Amidoschwarz:	Merck, Darmstadt, D
Ammoniumpersulfat (APS):	Invitrogen, Leek, NL
BCA Protein Assay Kit:	Pierce, Rockford, IL, USA
Bromphenol Blau:	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Essigsäure:	Merck, Darmstadt, D
Formaldehyd:	Sigma, Deisenhofen, D
Glycerin:	Merck, Darmstadt, D
Glycin:	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
HCl:	Merck, Darmstadt, D
Isopropanol:	Merck, Darmstadt, D
KCl:	Merck, Darmstadt, D
KH ₂ PO ₄ :	Merck, Darmstadt, D
Luziferase Assay Kit:	Promega, Madison, WI, USA
Mercapto-Ethanol:	Merck, Darmstadt, D
Methanol:	Merck, Darmstadt, D

Milchpulver:	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
MTT-Salz (in Lösung in PBS):	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, D
Na ₂ HPO ₄ :	Merck, Darmstadt, D
NaCl:	Merck, Darmstadt, D
Igepal:	Sigma, Deisenhofen, D
Leupeptin:	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Pefabloc SC [®] :	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
SuperSignal ULTRA [®] :	Pierce, Rockford, IL, USA
Propidiumiodid:	Sigma, Deisenhofen, D
Protein A Sepharose:	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
PVDF-Membran:	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
RNase-free DNase-Kit:	Qiagen, Hilden, D
RNeasy-Kit:	Qiagen, Hilden, D
One-Step-RT-PCR-Kit:	Qiagen, Hilden, D
SDS:	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
TEMED:	Merck, Darmstadt, D
Trasyol [®] (Aprotinin):	Bayer, Leverkusen, D
Tris:	Sigma, Deisenhofen, D
Tween 20 [®] :	Merck, Darmstadt, D

3.7 Lösungen und Puffer

Transferpuffer:	25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1% SDS, 20% Methanol
Block-Puffer:	5% Milchpulver in 1xTBS/0,2%Tween
Antikörperpuffer:	1% Milchpulver in 1xTBS/0,2%Tween
Sammelgel:	0,5ml Acrylamid (30%), 0,9ml Sammelgelpuffer, 2,3ml H ₂ O, 30µl APS (10% in Wasser), 3µl TEMED
Trenngel 12,5%:	2,4ml Acrylamid (30%), 1,5 ml Trenngelpuffer, 2,1ml H ₂ O, 50µl APS (10% in Wasser), 5µl TEMED
Trenngel 15%:	3ml Acrylamid (30%), 1,5 ml Trenngelpuffer, 1,5ml H ₂ O, 50µl APS (10% in Wasser), 5µl TEMED
Elektrophorese-Laufpuffer:	25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1% SDS,
Amidoschwarz-Färbelösung:	0,1% Amidoschwarz, 45% Methanol, 10% Essigsäure

Amidoschwarz-Entfärbelösung:	10% Isopropanol, 10% Essigsäure in Wasser
PBS:	136 mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8mM KH ₂ PO ₄ , pH=7,4
Lämmli-Puffer:	8% SDS, 30% Glycerin, 125mM Tris pH=6,8; für die Gelelektrophorese frisch dazugegeben: 0,02% BPB + 10% Mercapto-Ethanol
MTT- Salzlösung:	5mg/ml MTT-Salz in PBS
Solubilisations-Lösung (MTT):	10% SDS in 0,01M HCl
TBS:	25mM Tris, 140mM NaCl, 2,7mM KCl, pH=7,4
Trenngelpuffer:	375mM Tris, 0,1% SDS, pH=8,8
Sammelgelpuffer:	125mM Tris, 0,1% SDS, pH=6,8
Igepal-Lysispuffer:	120 mM NaCl; 0,5% Igepal; 10% Glycerin; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

3.8 Geräte und Gebrauchsgegenstände

12-Loch Polystyren Platte:	Sarstedt Inc., Newton, NC, USA
15ml Röhrchen:	Sarstedt Inc., Newton, NC, USA
50ml Röhrchen:	Greiner, Solingen, D
96-Loch Mikrotiterplatte für die Zellkultur:	Sarstedt Inc., Newton, NC, USA
Becton Dickinson FACStar:	BectonDickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Eppendorf-Tischzentrifuge:	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Köln, D
Fluoreszenzmikroskop:	Carl Zeiss, Göttingen, D
Gewebekulturschale 6 und 10cm:	Greiner, Solingen, D
kühlbare Zentrifuge (Biofuge fresco):	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
Lucy-Soft software:	Anthos Analytical Apparatus, Inc., Durham, NC, USA
Lucy3-Luminometer:	Anthos Analytical Apparatus, Inc., Durham, NC, USA
Nassblotapparatur:	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Schwenkzentrifuge:	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
Wasserbad:	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D

Zählkammer nach Neubauer:	Blau Brand, D
Thermoblock (Thermocycler):	Biometra, Göttingen, D
SDS-PAGE-Kammer:	PHASE, Lübeck, D
Agarosegelelektrophorese-Kammer:	PHASE, Lübeck, D
Whatman 3MM-Papier:	Whatman International Ltd., Maidstone, UK
Filmfolien:	Amersham Pharmacia, UK

3.9 Primer

Bezeichnung	Quelle	Sequenz (5'-3')	Bemerkung
A* (pIND-prom-fwd)	MWG ¹	AGCAAAGTGAACAC GTCGC	in Promotorregion des pIND- Vektors (exogenes Rad)
A (Ex1Rad-fwdB)	MWG	CCAGAGACCGAGCC CTAA	im nicht translatierten Exon 1 (endogenes Rad51)
B (pINDRad-prom-rev)	MWG	ATCTCTGACCGCCTT TGG	in Exon 4 der Rad51-mRNA
C (GAPDH-fwd)	MWG	GAAGGTGAAGGTCG GAGTCA	Ladekontrolle
D (GAPDH-rev)	MWG	TGATGACCCTTTTG GCTCC	Ladekontrolle

3.10 Verwendete Zelllinie, Expressionssystem und Vektorkonstrukte

Für die Experimente wurden die Zelllinien „UiRad51“ und „UiLacZ“ verwendet. Diese wurden durch stabile Transfektion der Osteosarkomzelllinie U2-OS von Miska mit folgend beschriebenen Ecdyson-induzierbaren Expressionssystem von Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, erzeugt (Maacke et al. 2000).

Die Vektoren pIND-Rad51 und pIND-LacZ wurden durch Klonierung der cDNA von Rad51 bzw. LacZ (β -Galactosidase) in den Vektor pIND (Invitrogen) hergestellt. Ferner wurde der Vektor pVgRXXR (Invitrogen) verwendet.

pIND-Rad51 („UiRad51“) und pIND-LacZ („UiLacZ“) wurden jeweils mit pVgRXXR in U2-OS Zellen cotransfiziert. Positive Klone wurden durch die Antibiotika Neomycin und Zeocin selektiert.

¹ MWG-Biotech AG, Ebersberg, D

Die Zugabe von Ponasteron A in das Kulturmedium vermittelt die Komplexbildung der beiden durch pVgRXR codierten Rezeptoren, Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und modifizierter Ecdysonrezeptor (VgEcr), zu einem Heterodimerrezeptor, welcher die Transkription des auf dem cotransfizierten pIND-Vektor codierten Gens induziert (Abb. 1) (No et al. 1996). Das Expressionssystem ermöglicht somit die regulierbare Expression des klonierten Gens in der Zelle.

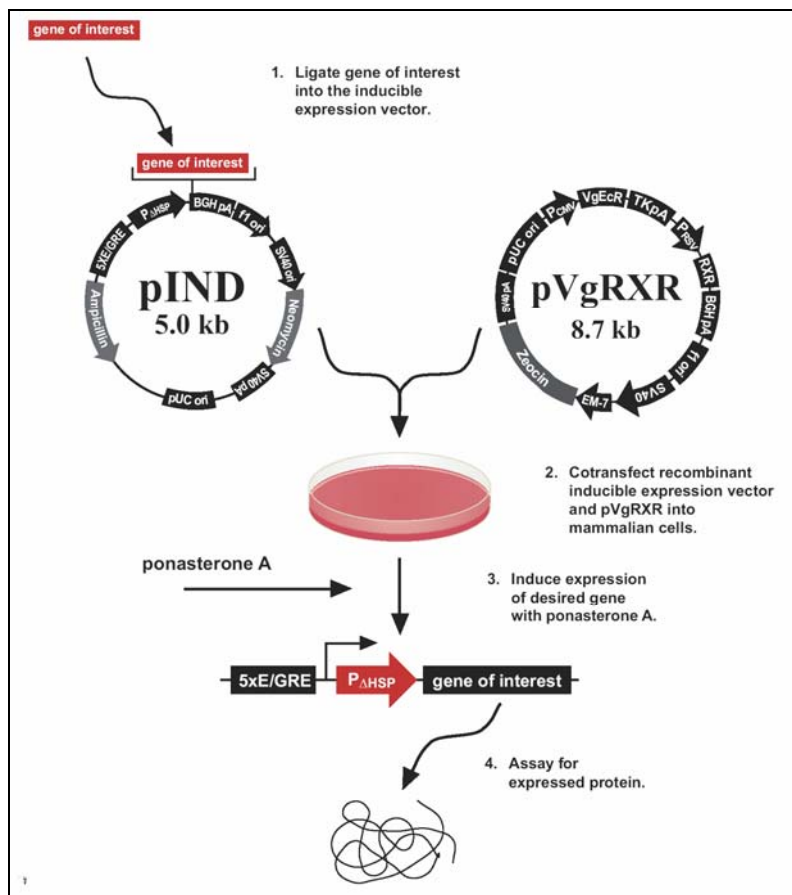


Abb. 1: Ecdysone-induzierbares Expressionssystem¹

3.11 Zellkulturtechniken – Kultivierung von UiRad51 und UiLacZ

Die Zellen wurden in „Dulbecco’s Modified Eagle Medium“ (DMEM) mit 10% „Fetal Calf Serum“ (FCS) und den Antibiotika Zeocin und Neomycin bei einer Temperatur von 37°C (wasserdampfgesättigt) und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert.

Die Antibiotika dienen der Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks. Der pIND-Vektor enthält ein Neomycin-Resistenzgen, der pVgRXR-Vektor enthält ein Gen für Zeocin-Resistenz. Alle drei Tage wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA umgesetzt.

¹ © Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. Reproduktion mit freundlicher Genehmigung von Invitrogen.

3.12 Zellextraktion mit dem Lämmli-System

Die Zellen wurden in der Kulturschale (\varnothing 94mm) zwei Mal mit PBS gewaschen. Nach gründlichem Absaugen der Flüssigkeit wurde 100 μ l Lämmli Puffer auf die Schale pipettiert. Durch Einsatz eines Gummispatels wurde der Lämmli Puffer verteilt, um sämtliche Zellen auf der Schale zu lysieren. Schließlich wurde das Lysat in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden anschließend fünf Minuten bei 95°C erhitzt und bei 14.000 UPM in einer Tischzentrifuge 30 Minuten lang zentrifugiert.

3.13 Zellextraktion mit Igepal-Lysispuffer

Die Zellen wurden in der Kulturschale zwei Mal mit PBS gewaschen und die Schale wurde auf Eis gekühlt. Nach gründlichem Absaugen des PBS-Puffers wurde 1ml eiskalter Igepal-Lysispuffer mit Zusatz von Proteaseinhibitoren (Trasyol[®] 14 μ g/ml, Pefabloc SC[®] 400 μ g/ml, Leupeptin 10 μ g/ml) auf die Schale pipettiert. Mit einem Gummispatel wurde der Lysis-Puffer verteilt, um sämtliche Zellen auf der Schale zu lysieren. Schließlich wurde das Zelllysat in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann bei 14.000 UPM in einer Kühlzentrifuge 30 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert.

3.14 Quantitative Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der Zelllysate erfolgte mit der BCA (Bicinchonsäure) -Methode nach Angaben des Herstellers Pierce, Rockford, IL, USA. Proben, die unter denaturierenden Bedingungen mit Lämmli Puffer hergestellt wurden, wurden zuvor im Verhältnis 1:10 in Wasser verdünnt. Die BCA-Reaktion erfolgte in 96-well Platten und die Messung am Anthos Lucy3 Luminometer.

3.15 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Anhand der Ergebnisse aus der Proteinbestimmung wurden die einzelnen Proben mit Lämmli-BPB (Bromphenolblau) und β -Mercaptoethanol (10% Endkonzentration) eingestellt, sodass gleiche Volumina zu gleichen Proteinmengen führten.

Die so aufbereiteten Proteinproben wurden in der Natriumdodecylsulfat(SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Es wurde dazu das diskontinuierliche Lämmli-System mit separat gegossenen Sammel- und Trenngelen verwendet (Laemmli 1970). Pro Spur wurde eine Gesamtproteinmenge von 50 μ g geladen.

Je nach zu untersuchendem Protein wurden Trenngele mit 12,5% (für p53, Rad51 und β -Actin) und 15% (für p21) Acrylamidgehalt verwendet.

3.16 Westernblot und Immundetektion

Nach der Elektrophorese wurde das SDS-Gel mit einer zuvor in Methanol äquilibrierten PVDF-Membran in eine Nassblotapparatur platziert. Die Proteine wurden dann bei einem Stromfluss von 300mA und einer Dauer von 5h vom SDS-PAGE-Gel auf die PVDF-Membran transferiert.

Um unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wurde die mit Proteinen beladene Membran mindestens 2h lang in Block-Puffer inkubiert. Die Membran wurde zunächst mit jeweiligen spezifischen Primärantikörper 2h inkubiert. Danach erfolgte die einstündige Inkubation mit dem für den Primärantikörper spezifischen und peroxydasekonjugierten Sekundärantikörper. Schließlich wurde die Membran 5 Minuten mit dem Chemlumineszenzfarbstoff SuperSignal-ULTRA[®] von Pierce, Rockford, IL, USA, inkubiert. Zur Dokumentation der lumineszierenden Membranen wurden HyperfilmECL[®] Filmfolien von Amersham Pharmacia, UK, belichtet.

3.17 Amidoschwarzfärbung der Membranen

Die Membranen wurden nach der Entwicklung des Westernblots mit Amidoschwarz gefärbt, um die Proteinbanden der aufgetrennten Proben sichtbar zu machen. Dazu wurden sie 5 Minuten mit Amidoschwarzlösung inkubiert und über Nacht entfärbt.

3.18 Extraktion zytoplasmatischer mRNA

Die zu extrahierenden Zellen wurden gewaschen, trypsiniert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zur Extraktion von cytoplasmatischer mRNA wurde das RNeasy-Kit in Kombination mit dem RNase-freien DNase Kit von Qiagen, Hilden, D, gemäß Anleitung verwendet. Die so aufgereinigte mRNA wurde mit destilliertem Reinstwasser eluiert.

3.19 RT-PCR (Reverse Transkriptase – Polymerase Kettenreaktion)

Extrahierte mRNA wurde mit dem One-Step RT-PCR Kit von Qiagen, Hilden/D, amplifiziert. Abb. 2 zeigt die Position der verwendeten Primer A, A*, B und C (vgl. auch 3.9). Für die RT-PCR-Reaktion wurden die mRNA Proben mit jeweils einem Primerpaar und Komponenten aus dem Kit gemäß Angaben des Herstellers in einem Reaktionsgefäß gemischt und mit Mineralöl überschichtet, um Verdunstung während der Reaktion zu vermeiden.

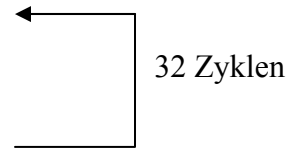
Die RT-PCR-Reaktion wurde auf einem Thermoblock von Biometra, Göttingen, D, durchgeführt.

Im ersten Schritt wurde die mRNA 30 Minuten lang bei 50°C durch die Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Nach einer anschließenden Aktivierung der DNA Polymerase bei 95°C für 15 Minuten, folgte ein PCR-Programm mit 32-facher Wiederholung des folgenden dreischrittigen Zyklus:

94°C, 1 Minute (Denaturierung der cDNA)

60°C, 1 Minute (Hybridisierung der Primer an die cDNA)

72°C, 1 Minute (Verlängerung der durch die Primer initiierten DNA-Stränge)



Die PCR-Reaktion schloss mit einer terminalen Verlängerung der DNA bei 72°C, 10 Minuten, ab.

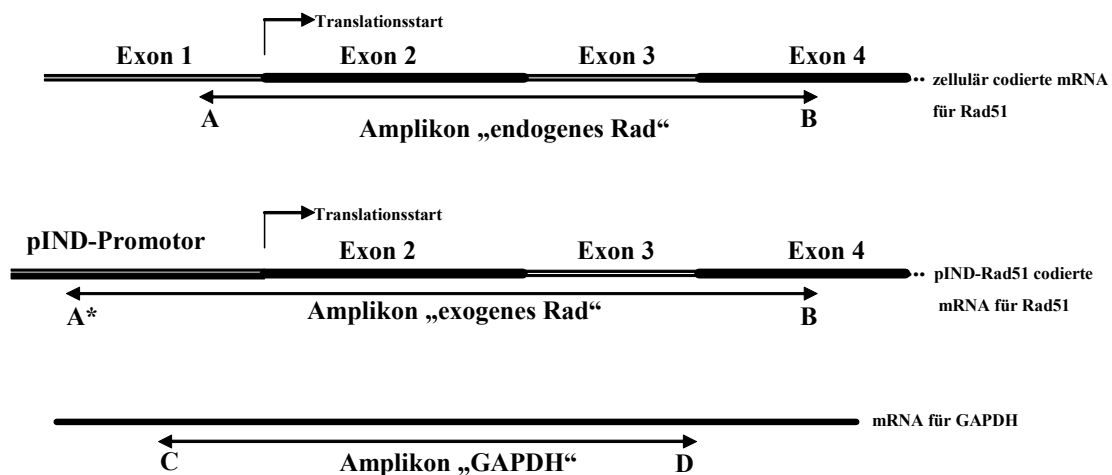


Abb. 2: Position der RT-PCR-Primerpaare; „zellulär codierte mRNA für Rad51“ – mRNA-Transkript des Hs(Homo sapiens)Rad51-Gens auf Chromosom 15; „pIND-Rad51 codierte mRNA für Rad51“ – mRNA-Transkript der in den pIND-Vektor klonierten HsRad51-cDNA (es wurde nur der translatierte Abschnitt beginnend mit Exon2 kloniert); „mRNA für GAPDH“ – mRNA-Transkript des GAPDH-Gens auf Chromosom 12.

3.20 Agarose Gelelektrophorese

Die durch RT-PCR amplifizierten Proben wurden mit Ladepuffer und TAE-Puffer versetzt und über Agarosegele (bestehend aus 1%(w/v) Agarose, 0,5µg/ml Ethidiumbromid und TAE-Puffer) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80V. Die Gele wurden nach dem Lauf unter UV-Licht am Fluor-S Imager von Bio-Rad, Hercules, CA, USA, dokumentiert.

3.21 MTT-Assay

Der MTT-Assay wurde erstmals von Mosmann beschrieben und erfasst mittels Photometrie den Anteil vitaler Zellen in einer Zellpopulation (Mosmann 1983). Hierfür wurden die in einer Mikrotiterplatte wachsenden Zellen 4h lang unter Kulturbedingungen dem Tetrazolium Salz MTT ausgesetzt. Vitale Zellen metabolisieren das gelbe MTT-Salz in violette Formazankristalle. Anschließend wurden die Zellen über Nacht mit einer Detergenzlösung lysiert, sodass eine homogene violettfarbene Lösung entstand. Diese in den Mikrotiterplatten befindliche Lösung wurde im Luminometer ausgewertet. Die Extinktion bei 550nm korreliert dabei mit der Zahl vitaler Zellen.

4 Ergebnisse

Bei der Therapie maligner Tumoren tritt das Phänomen der Resistenzentwicklung gegenüber Zytostatika auf. Dabei können einzelne Tumorzellen während der Zytostatikatherapie durch die erworbene Resistenz einen Überlebensvorteil erlangen und im Tumorzellverband expandieren. Die Ausbildung der Resistenz wird dabei unter anderem auf die Expression bestimmter Proteine (z. B. P-Glykoprotein, MDRP) zurückgeführt. In den letzten Jahren häufen sich zusätzlich Beobachtungen, die der Überexpression von Faktoren bestimmter DNA-Reparaturwege als Ursache einer Resistenzentwicklung einen hohen Stellenwert beimessen. Hier sind unter anderem Proteine MSH3 (mismatch-Reparatur) (Marti et al. 2002), DNA-PK (nicht-homologe Verbindung von DNA-Enden - NHEJ) (Lieber et al. 2003), vor allem aber Rad51 als zentraler Faktor der DSB-Reparatur durch homologe Rekombination zu nennen. Untersuchungen an Zelllinien zeigen, dass die Überexpression von Rad51 eine Resistenz gegenüber einer Reihe von Zytostatika erzeugt (Maacke et al. 2000; Kremer 2003). Die resistenzfördernde Eigenschaft von überexprimiertem Rad51 beruht dabei nicht allein auf der Funktion der Reparatur zytostatikainduzierter DNA-Doppelstrangbrüche. So lässt sich nämlich bei Rad51-Überexpression auch eine Resistenz gegenüber Zellgiften wie Staurosporin oder 5-FU nachweisen, welche keine DSB induzierenden Eigenschaften aufweisen (Kremer 2003). Offensichtlich besitzt Rad51 intrinsische resistenzbildende Eigenschaften, die unabhängig von der Funktion der DSB-Reparatur sind und deren molekulare Mechanismen zum großen Teil noch ungeklärt sind. Zusätzlich ist bekannt, dass bestimmte Zytostatika den Rad51-Gehalt modulieren. Hier ist z. B. Chlorambucil (CLB), ein alkylierendes N-Lost Derivat, zu nennen, welches in B-CLL-Zellen zu einer Steigerung des Rad51-Expression führt (Christodoulopoulos et al. 1999). Vor diesem Hintergrund war das Ziel dieser Arbeit, die Interaktionen ausgewählter Zytostatika (Staurosporin, Doxorubicin, Calicheamicin- γ 1) mit Rad51 und deren molekulare Grundlagen näher zu charakterisieren. Als Modell wurde die Rad51-überexprimierende Osteosarkomzelllinie „UiRad51“ verwendet (Maacke et al. 2000).

4.1 Charakterisierung Rad51-überexprimierender Osteosarkomzelllinie UiRad51

Die Zelllinie UiRad51 wurde von Miska nach Transfektion der Osteosarkomzelllinie U2-OS mit dem Ecdysonsystem von Invitrogen etabliert (Maacke et al. 2000). Der Vorteil dieses regulierbaren Expressionssystems besteht in der Möglichkeit, die Rad51-Überexpression zu einem gegebenen Zeitpunkt zu induzieren. Als Kontrollzelllinie wurde durch Miska die β -Galactosidase überexprimierende Zelllinie UiLacZ etabliert. Durch das verwendete Expressionssystem kann ein direkter Vergleich zwischen Überexpression (induziert) und normaler Expression (nicht induziert) in einem isogenen System angestellt werden (Maacke et al. 2000). Als induzierende Substanz wurde das Insektenhormon-Analogon Ponasteron verwendet. Abb. 3A zeigt, dass 24h nach Induktion von UiRad51 mit Ponasteron der Gehalt von Rad51 um ein Vielfaches angestiegen ist.

Durchflusszytometrische Untersuchungen (FACS) ergaben, dass nach Induktion ein großer Teil der Zellen in der G_1 , vor allem aber in der G_2 -Phase arretieren (vgl. Abb 3B, 3C). Parallel wird ein unabhängig von p53 erfolgender Anstieg des Proteingehalts von p21^{Waf-1} (syn. p21) beobachtet, einem Inhibitor cyclin-abhängiger Kinasen (CDK-Inhibitor) (Abb. 3A).

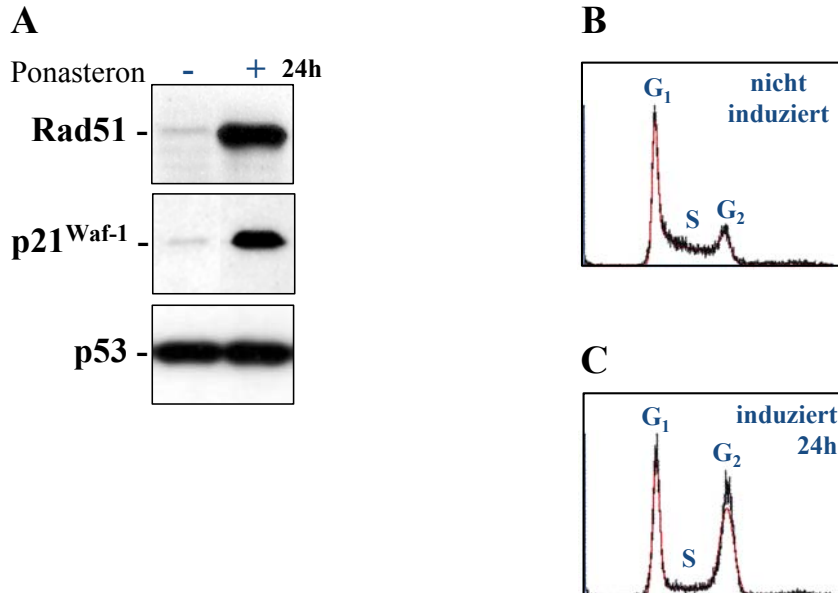


Abb. 3: Charakterisierung der Rad51-überexprimierenden Zelllinie UiRad51. **A** Western-Blot Analyse von Rad51, p21 und p53 aus UiRad51 vor (-) und 24h nach (+) Induktion mit Ponasteron. **B** FACS Analyse von UiRad51 vor Induktion. **C** FACS Analyse von UiRad51 24h nach Induktion. (Kremer 2003, Maacke et al. 2000)

Die nicht-DSB-induzierenden Zytostatika lassen sich im Falle der untersuchten UiRad51-Zellen nach ihrer Wirkung zusätzlich in Apoptose auslösende (z. B. Staurosporin, Doxorubicin, Cisplatin, Actinomycin D) und nicht-auslösende (5-FU, MTX) Gifte differenzieren. Die Rad51-Überexpression bewirkte nicht nur eine Resistenzinduktion gegenüber den genannten Zytostatika. Abb. 5 zeigt, dass die Rad51-Überexpression auch eine Inhibition der Caspase-3 abhängigen Apoptosekaskade verursacht. Die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) wird nach Induktion der Apoptose relativ früh durch Caspase-3 gespalten. Der Nachweis der Spaltprodukte gilt daher als Indikator für die Apoptose (Kaufmann et al. 1993; Nicholson et al. 1995). Kremer wies in Gegenwart hoher Rad51-Proteinmengen eine deutlich verringerte Spaltung von PARP nach Exposition mit Staurosporin, Doxorubicin, Cisplatin Actinomycin D nach (Kremer 2003). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden (Abb. 5, Spuren 3-10). Obschon auch für DSB-induzierende Agenzien ein Apoptose auslösender Effekt erwartet werden kann (Jackson 2002), konnte für Calicheamicin- γ 1 im UiRad51-Zellsystem keine Apoptose-induktion nachgewiesen werden (Abb. 5, Spuren 11 und 12).

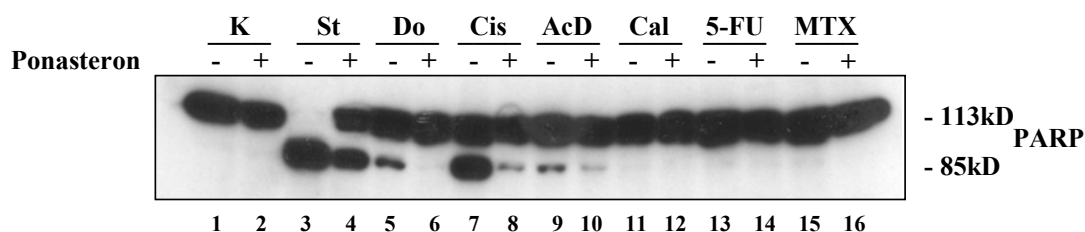


Abb. 5: Reduzierte Caspase-3-Aktivierung bei Rad51-Überexpression. Nicht-induzierte (Ponasteron „-“) bzw. 24h vorinduzierte (Ponasteron „+“) UiRad51-Zellen wurden 16h lang mit verschiedenen Zytostatika exponiert. Der Proteinnachweis erfolgte durch Westernblot auf Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), die 85kD Bande zeigt das spezifische PARP-Fragment nach Spaltung durch Caspase-3. K – Kontrolle, St – Staurosporin, Do – Doxorubicin, Cis – Cisplatin, AcD – Actinomycin D, Cal – Calicheamicin- γ 1, 5-FU – 5-Fluorouracil, MTX – Methotrexat.

4.2 Modulation des Rad51-Gehalts in UiRad51-Zellen durch Zellgifte

Verschiedene Berichte liefern Hinweise, dass bestimmte Substanzen den Rad51-Gehalt modulieren können. Christodoulopoulos et al. konnten anhand fluoreszenzmikroskopischer Daten in Chronischen B-Zelllymphomzellen (B-CLL) bei Exposition mit dem alkylierenden Zytostatikum Chlorambucil (CLB) Hinweise auf eine Erhöhung des Rad51-Gehalts liefern. Das Ausmaß der Erhöhung korrelierte zusätzlich mit der Resistenz gegenüber CLB (Christodoulopoulos et al. 1999). Kanamoto et al. zeigten in Mv1Lu-Zellen bei TGF- β -

Exposition den proteasomalen Abbau von Rad51, was womöglich zu einer erhöhten DNA-Instabilität führen könnte (Kanamoto et al. 2002).

Eine direkte Untersuchung des Rad51-Gehalts in UiRad51-Zellen unter CLB-Exposition konnte die Daten von Christodououlos bestätigen. Abb. 6 zeigt bei Exposition induzierter UiRad51-Zellen mit einer CLB-Konzentration von 10 μ M (Spur 5) eine deutliche Zunahme des Rad51-Gehalts im Vergleich zur induzierten Kontrolle (Spur 2).

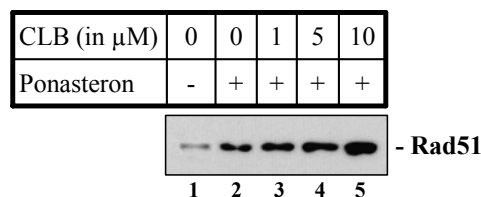


Abb. 6: Veränderungen im Rad51-Gehalt unter Chlorambucil-Exposition. 24h-vorinduzierte (Ponasteron +) UiRad51-Zellen wurden 16h mit CLB inkubiert. Der Rad51-Proteinnachweis erfolgte durch Westernblot. 1. nicht-induzierte Kontrolle, 2. induzierte Kontrolle, 3.-5. CLB-Exposition in aufsteigender Konzentration; CLB – Chlorambucil.

Um weitere Modulationsmöglichkeiten des Rad51-Gehalts durch Zellgifte zu untersuchen, wurden UiRad51-Zellen unter nicht-induzierten und induzierten (=Rad51-überexprimierenden) Bedingungen mit verschiedenen Zellgiften inkubiert.

Alle Gifte, die sich aufgrund der Ergebnisse in 4.1 als Apoptose-induzierend erwiesen haben (Staurosporin, Doxorubicin, Cisplatin, Actinomycin D), führten im Vergleich zur Kontrolle zu einer Verminderung des induzierten, exogenen Rad51-Gehalts (Abb. 7, vgl. jeweils Spur 2 mit 4, 6, 8, 10). Besonders ausgeprägt war der Effekt bei Staurosporin (Abb. 7, Spur 4), Doxorubicin (Spur 6) und Actinomycin D (Spur 10), während dies bei Cisplatin weniger ausgeprägt war (Spur 8). Im Ansatz schien sich dieser Effekt auch auf dem basalen Expressionsniveau widerzuspiegeln (Abb. 7, vgl. jeweils Spur 1 mit 3, 5, 7, 9). Hier war jedoch die Aussagefähigkeit eingeschränkt, da sich die Intensität der Banden gerade an der Nachweisgrenze befanden.

Während MTX als eines der nicht-Apoptose-induzierenden Gifte keine offensichtliche Änderung des Rad51-Gehalts hervorrief (Abb. 7, vgl. Spur 2 mit 16), zeigte sich bei Calicheamicin- γ 1 (Spur 12) und 5-FU (Spur 14) eine signifikante Erhöhung des Rad51-Gehalts auf mehr als die doppelte Menge.

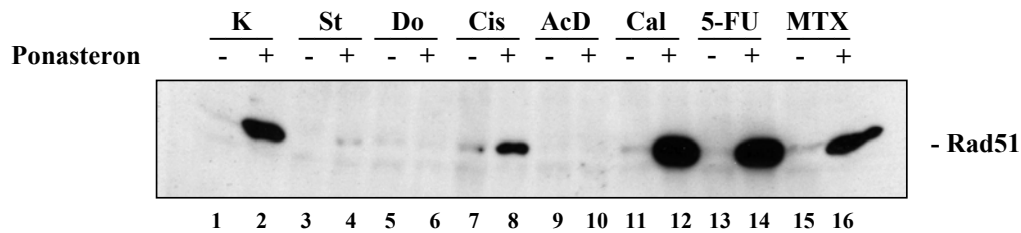


Abb 7: Untersuchung zum Rad51-Gehalt in UiRad51 während Exposition mit Zytostatika. Nicht-induzierte (Ponasteron -) bzw. 24h vorinduzierte (Ponasteron +) UiRad51-Zellen wurden 16h lang mit verschiedenen Zytostatika exponiert. Der Proteinnachweis erfolgte durch Westernblot auf Rad51. K – Kontrolle, St – Staurosporin, Do – Doxorubicin, Cis – Cisplatin, AcD – Actinomycin D, Cal – Calicheamicin- γ 1, 5-FU – 5-Fluorouracil, MTX – Methotrexat.

4.3 Dynamik der Rad51- und p21-Abnahme in UiRad51

Um die zeitliche Dynamik der Gift-induzierten Ab- bzw. Zunahme von Rad51 zu untersuchen, wurden für Staurosporin und Calicheamicin- γ 1 jeweils Zeitreihenexperimente durchgeführt. Um eine Vergleichsreihe zu erhalten, wurde zunächst der zeitliche Verlauf der Rad51-Expression vorinduzierter UiRad51-Zellen nach Entzug des Induktors allein, ohne Einwirkung von Gift, untersucht. Abb. 8A zeigt, dass bei Entzug des Induktors das basale Rad51-Niveau nach 16h wieder erreicht wurde. Die Halbwertszeit des überexprimierten Rad51 betrug dabei ungefähr 8h. Vorinduzierte UiRad51-Zellen wurden dann jeweils 24h mit den Giften Staurosporin bzw. Calicheamicin- γ 1 unter Induktionsbedingungen (gleichzeitige Anwesenheit von Ponasteron) inkubiert. Während das Niveau von Rad51 unter Staurosporin schon innerhalb von 4h auf praktisch nicht mehr nachweisbare Mengen fiel (Abb. 8C), nahm die Rad51-Menge unter Calicheamicin- γ 1 signifikant nach 24h Exposition zu (Abb. 8B).

Die Überexpression von Rad51 führte zu einer p53-unabhängigen Induktion des Kinase-Inhibitors p21 (vgl. Abb 3A) (Kremer 2003). Nach Entzug des Induktors persistierte p21 bis zu 24h auf gleichem Niveau (Abb. 8A), um dann nach 48h deutlich abzufallen (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu führte die Inkubation induzierter UiRad51-Zellen mit Staurosporin analog zu Rad51 zu einer raschen Abnahme (4h) des Proteingehalts (Abb. 8C). Unter Calicheamicineinfluss stieg der p21-Gehalt bis 24h nur diskret an (Abb. 8B).

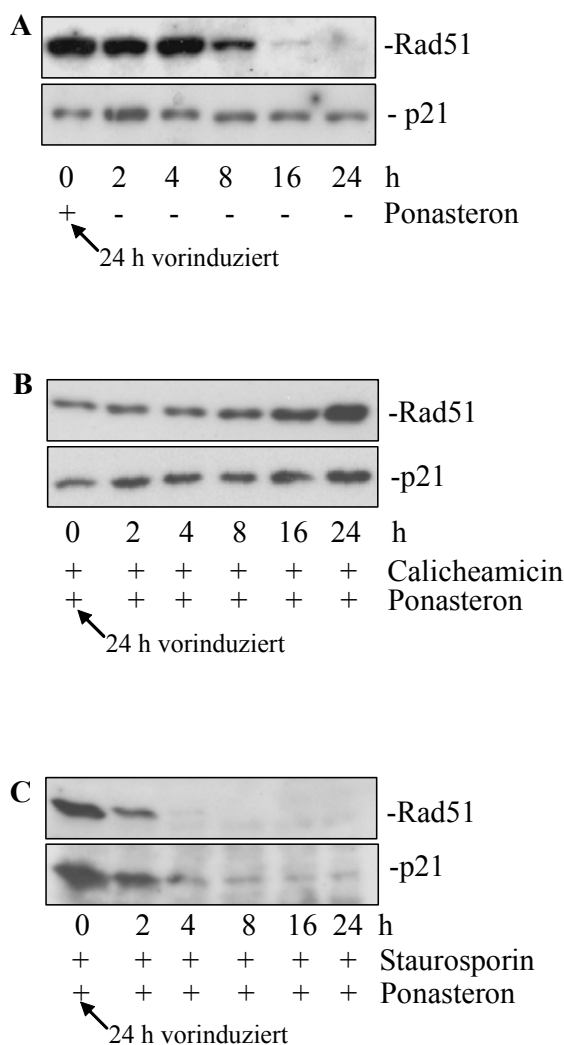


Abb. 8: Zeitreihenexperimente zur Rad51- und p21-Abnahme in UiRad51-Zellen. Die Zellen wurden nach den angegebenen Zeitabständen geerntet und mittels Westernblot auf ihren Gehalt an Rad51 und p21 untersucht.

A Entzug des Induktors allein.

B Exposition mit Calicheamicin- γ 1.

C Exposition mit Staurosporin.

Die Abnahme von Rad51 und p21 unter Staurosporinexposition war nach diesen Ergebnissen auffällig schneller als die Abnahme unter Entzug des Induktors allein (vgl. Abb. 8A und 8C). Während bei Entzug des Induktors der Rad51-Gehalt erst nach 16-24 auf ein basales Niveau sank, fand dieser Rückgang unter Exposition mit Staurosporin innerhalb der ersten 4h statt. Der p21-Gehalt sank bei Entzug des Induktors innerhalb von 24h nur diskret, unter Staurosporinexposition sank er hingegen binnen 8h auf ein basales Niveau.

Um zu untersuchen, ob die durch Staurosporin und Calicheamicin- γ 1 verursachte Ab- und Zunahme des Rad51-Gehalts vom zellulären Hintergrund abhängig war, wurde der Rad51-Gehalt verschiedener Zelllinien nach Inkubation mit den Zellgiften durch einen Westernblot bestimmt.

In allen getesteten Zelllinien nahm der Rad51-Gehalt nach Inkubation mit Staurosporin deutlich ab (Abb. 9, vgl. jeweils Spur 1 mit Spur 2). Eine Erhöhung des Rad51-Gehalts nach Calicheamicinexposition konnte nur in Sk-Mel-Zellen nachgewiesen werden. Der

Rad51-Gehalt in U2-OS, UiLacZ, Meuro, T47D und in nicht induzierten UiRad51-Zellen blieb gleich, während in Huh7 und MCF7 eine deutliche Abnahme nachzuweisen war (vgl. jeweils Spur 1 mit Spur3).

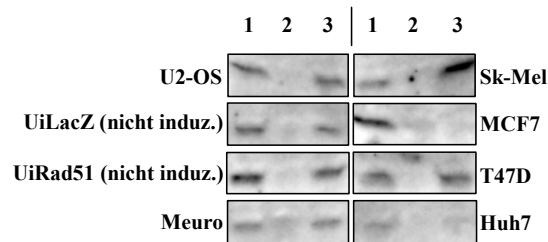


Abb. 9: Vergleich des Rad51-Gehalts in verschiedenen Zelllinien nach Giftexposition. Die Zelllinien U2-OS, UiLacZ, UiRad51, Meuro, Sk-Mel, MCF7, T47D und Huh7 wurden jeweils 16h ohne Gift, mit Staurosporin oder mit Calicheamicin- γ 1 inkubiert und danach geerntet. Die quantitative Bestimmung des Rad51-Gehalts erfolgte durch Westernblot. 1. ohne Gift, 2. Staurosporin (1 μ M), 3. Calicheamicin- γ 1 (1nM).

4.4 Analyse der Rad51-mRNA-Expression in UiRad51-Zellen

Die Exposition von UiRad51 mit Staurosporin, Doxorubicin, Actinomycin D und Cisplatin bewirkte eine deutliche Abnahme des Rad51-Gehalts. Die Exposition mit Calicheamicin- γ 1 zeigte dagegen in UiRad51 eine Zunahme des exogenen Rad51.

Der Proteingehalt einer Zelle stellt ein Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und -degradation dar. So kann sich die Transkriptionsrate und somit die Menge an mRNA des für das Protein codierenden Gens ändern. Es kann sich jedoch auch der Abbau des Proteins verändern. Dies wiederum würde zu einer veränderten Halbwertszeit bei primär gleichbleibender Transkriptionsrate führen.

Zunächst wurde untersucht, ob die Ursache für die Veränderung des Rad51-Proteingehalts auf transkriptioneller Ebene zu finden war. UiRad51-Zellen wurden mit den Giften Staurosporin, Doxorubicin (bewirken Rad51-Abnahme) und Calicheamicin- γ 1 (bewirkt Rad51-Zunahme) exponiert. Durch anschließende mRNA-Extraktion und Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) wurde der spezifische mRNA-Gehalt für Rad51 in den UiRad51 Zellen bestimmt. Durch die gewählten Primerpaare wurden dabei drei verschiedene, spezifische Amplifikate erzeugt:

1. Das Amplifikat „endogenes Rad“ wies mRNA des zellulären Rad51 nach.
2. „exogenes Rad“ wies mRNA des durch den Vektor pIND-Rad integrierten Rad51 nach.
3. „GAPDH“: wies mRNA des Glycerin-Aldehydphosphat-Dehydrogenase-Gens nach und diente als Ladekontrolle.

Die amplifizierten Produkte wurden mittels Agarose-Ethidiumbromid-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch UV-Licht sichtbar gemacht.

Die Ergebnisse in Abb. 10 zeigen, dass die Expression des endogenen Rad51 unter verschiedenen Bedingungen (mit/ohne Gift, induziert/nicht induziert) nahezu konstant war. Das durch das Expressionssystem exogen codierte Rad51 zeigte ohne Induktion eine basale Transkriptionrate (Abb. 10, Spuren 1, 3, 5, 7, 9). Dies war wahrscheinlich auf ein „Leakage“ des Expressionssystems zurückzuführen. Dabei wird in geringem Umfang trotz Abwesenheit eines Induktors das eingebrachte Zielgen transkribiert. Nach Giftexposition war sowohl auf induziertem wie auch auf nicht-induziertem Niveau keine signifikante Änderung der Transkriptionsrate im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten (nicht-induziertes Niveau: vgl. in Abb. 10 jeweils Kontrollspur 1 mit Spuren 3, 5 bzw. Kontrollspur 7 mit Spur 9; induziertes Niveau: vgl. in Abb. 10 jeweils Kontrollspur 2 mit Spuren 4, 6 bzw. Kontrollspur 8 mit Spur 10).

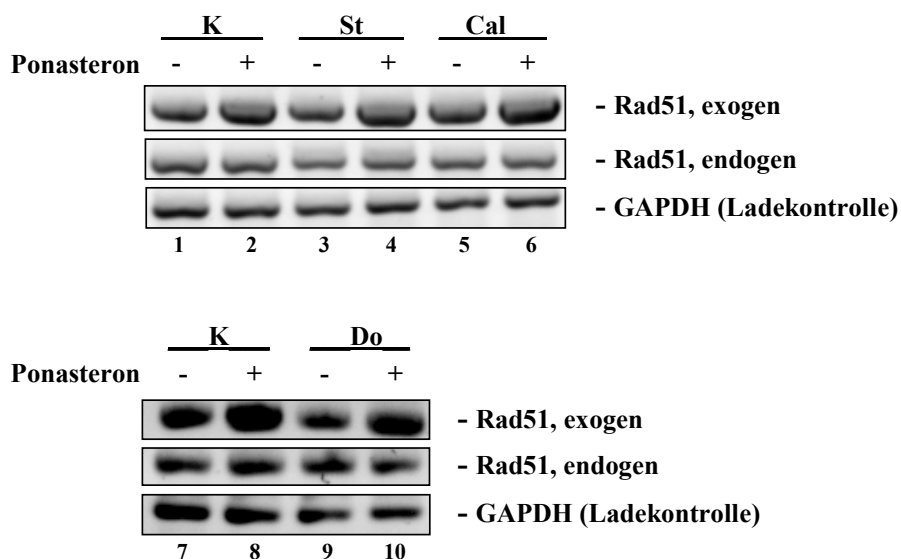


Abb. 10: Vergleich der Transkriptionrate für Rad51 in UiRad51 unter Giftexposition. Nicht-induzierte (Ponasteron -) und induzierte (Ponasteron +) UiRad51-Zellen wurden 24h mit Gift inkubiert. Anschließend erfolgte eine mRNA-Extraktion und RT-PCR. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte durch Ethidiumbromid Agarosegelelektrophorese; K - Kontrolle ohne Gift, St – Staurosporin, Cal – Calicheamicin- γ 1, Do – Doxorubicin (Doxorubicin wurde in einem separaten Experiment untersucht, in den Spuren 7 und 8 ist die zugehörige Kontrolle abgebildet).

Die Analyse der mRNA-Expression mittels RT-PCR zeigte demnach, dass die Veränderung der Proteinmenge nach Giftexposition nicht auf eine veränderte Transkriptionsrate zurückzuführen war.

4.5 Untersuchung eines möglichen Caspase-3-abhängigen Rad51-Abbaus

In einer Arbeit von Flygare et al. wird eine Caspase-3 abhängige proteolytische Spaltung von Rad51 während der Apoptose beschrieben (Flygare et al. 2000).

Um zu untersuchen, ob dieser Zusammenhang für den beobachteten Effekt auf Rad51 durch Staurosporin und Doxorubicin im überexprimierenden UiRad51 System eine Rolle spielt, wurden in einem Zeitreihenexperiment die Dynamik des Rad51-Abbaus mit der Dynamik der Caspase-3 Aktivierung verglichen. Als Indikator für die Aktivierung der Caspase-3 diente hier der Nachweis der proteolytischen Spaltung von PARP, welches spezifisches Hauptsubstrat der aktivierten Caspase-3 ist (Kaufmann et al. 1993; Lazebnik et al. 1994; Nicholson et al. 1995). Da eine Rad51-Überexpression den Caspase-3-abhängigen PARP-Abbau inhibiert (Kremer 2003), wurde das Zeitreihenexperiment für die PARP-Spaltung ohne Induktor durchgeführt. In diesen nicht-induzierten UiRad51-Zellen war die Caspase-3-Aktivität erst etwa 6h nach Beginn der Staurosporinexposition nachzuweisen (Abb. 11B). Abb. 11A zeigt hingegen, dass der Rad51-Gehalt in 24h vorinduzierten und unter Induktionsbedingungen gehaltenen UiRad51-Zellen bei Exposition mit Staurosporin innerhalb von 4h auf praktisch nicht mehr nachweisbare Mengen sank.

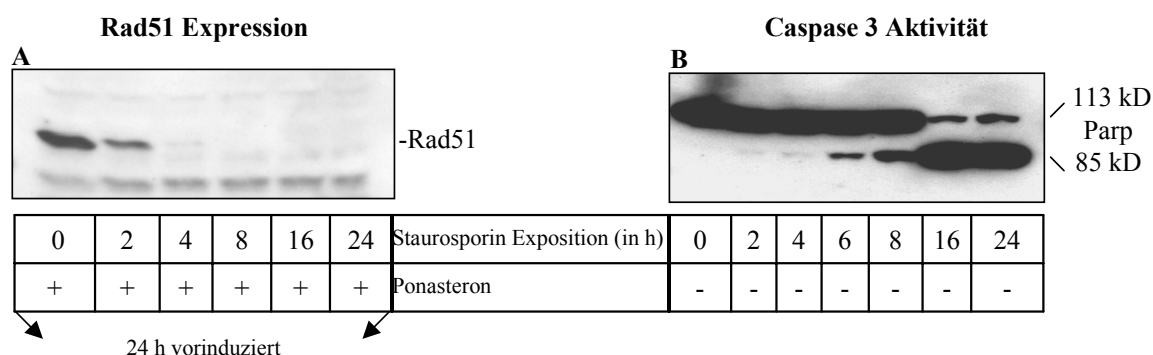


Abb. 11: Vergleich von Rad51 und Caspase 3 Aktivität (PARP als Indikator für Caspase 3 Aktivität).

Zur Analyse der Rad51-Dynamik wurden 24h vorinduzierte UiRad51-Zellen mit Staurosporin (1 μ M) inkubiert und zu bezeichneten Zeitpunkten geerntet. Zur Analyse der Caspase-3-Dynamik wurden nicht-induzierte UiRad51-Zellen mit Staurosporin (1 μ M) inkubiert und zu bezeichneten Zeitpunkten geerntet. Dargestellt sind die zugehörigen Westernblots auf Rad51 und PARP.

Da der durch Staurosporin induzierte Rad51-Abbau innerhalb der ersten 4h stattfand, die Caspase-3-Aktivität jedoch erst nach 6h einsetzte, schloss sich ein Caspase-3-bedingter Abbau zeitlich aus. Die proteolytische Aktivität der aktivierten Caspase-3 spielte somit keine Rolle beim Staurosporin vermittelten Abbau von Rad51.

4.6 Proteasom-abhängige Rad51-Degradation

Die meisten Proteine unterliegen einem intrazellulären Fließgleichgewicht, in welchem sie auf der einen Seite durch die Mechanismen der Transkription und Translation de novo synthetisiert, auf der anderen Seite durch Proteasomen gezielt degradiert werden. Da die Abnahme des Rad51-Gehalts weder durch eine Änderung der Transkriptionsrate noch durch die Aktivität von Caspase-3 begründet werden konnte, wurde im nächsten Schritt ein möglicher proteasomaler Abbau untersucht.

Zumeist werden Proteine durch Ligasen mit kurzen Proteinen/Polypeptiden wie Ubiquitin oder „small ubiquitin-related modifier“ (SUMO) kovalent verbunden, um sie zu markieren und somit dem Abbau durch Proteasomen zuzuführen. Ein direkter Nachweis Ubiquitin- bzw. SUMO-ligierten Rad51 mittels Immunopräzipitation (IP) führte zu keinen verwertbaren Ergebnissen (Ergebnisse nicht gezeigt). Es wurde daraufhin in einem indirekten Ansatz die mögliche Beteiligung proteasomaler Enzyme durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren der Proteasomen untersucht.

Wenn unter Verwendung dieser spezifisch aktiven Substanzen kein Verlust von Rad51 auftritt, so wäre dies als deutlicher, wenn auch indirekter, Hinweis einer proteasomalen Beteiligung zu deuten. Dazu wurden in dieser Arbeit die beiden reversiblen Inhibitoren MG-132 und ALLN, sowie der irreversible Inhibitor Lactacystin verwendet. Induzierte UiRad51 Zellen wurden mit Staurosporin unter Zugabe jeweils eines der Proteasominhibitoren exponiert. Die Proteasominhibitoren wurden dabei in verschiedenen Konzentrationsbereichen getestet, die basierend auf einer publizierten Arbeit mit Proteasominhibitoren im Zusammenhang mit Rad51 (Kanamoto et al. 2002) gewählt wurden. Nach Ermittlung einer effektiven Konzentration für die Inhibitoren in Kombination mit Staurosporin wurden für die Versuche mit Doxorubicin nur jeweils zwei Konzentrationen verwendet (für MG-132 und Lactacystin im mittleren, für ALLN im ursprünglich oberen Konzentrationsbereich). Zusätzlich zu den Veränderungen in Rad51 sollten auch mögliche Veränderungen in p21 erfasst werden, da sich bei Staurosporin und Doxorubicin auch der Gehalt an p21 vermindert.

Abb. 12A zeigt unter Induktion bei Exposition mit Staurosporin allein (Spur 3) die Abnahme von Rad51 und p21 im Vergleich zur Kontrolle (Spur 2). Wurde jedoch der Proteasominhibitor MG-132 zugesetzt (Spuren 4 bis 6), blieb der Rad51- und p21-Gehalt in den Zellen stabil auf dem induzierten Niveau (induzierte Kontrolle zum Vergleich in Spur 2). Der Rad51-stabilisierende Effekt konnte sowohl mit Lactacystin als auch mit ALLN reproduziert werden (Abb. 12B und 12C). Dabei zeigte ALLN einen deutlichen dosisabhän-

gigen Effekt im gewählten Konzentrationsbereich. Die Versuchsreihen mit Doxorubicin konnten den stabilisierenden Effekt der drei getesteten Proteasominhibitoren vollständig reproduzieren (Abb. 13A-C).

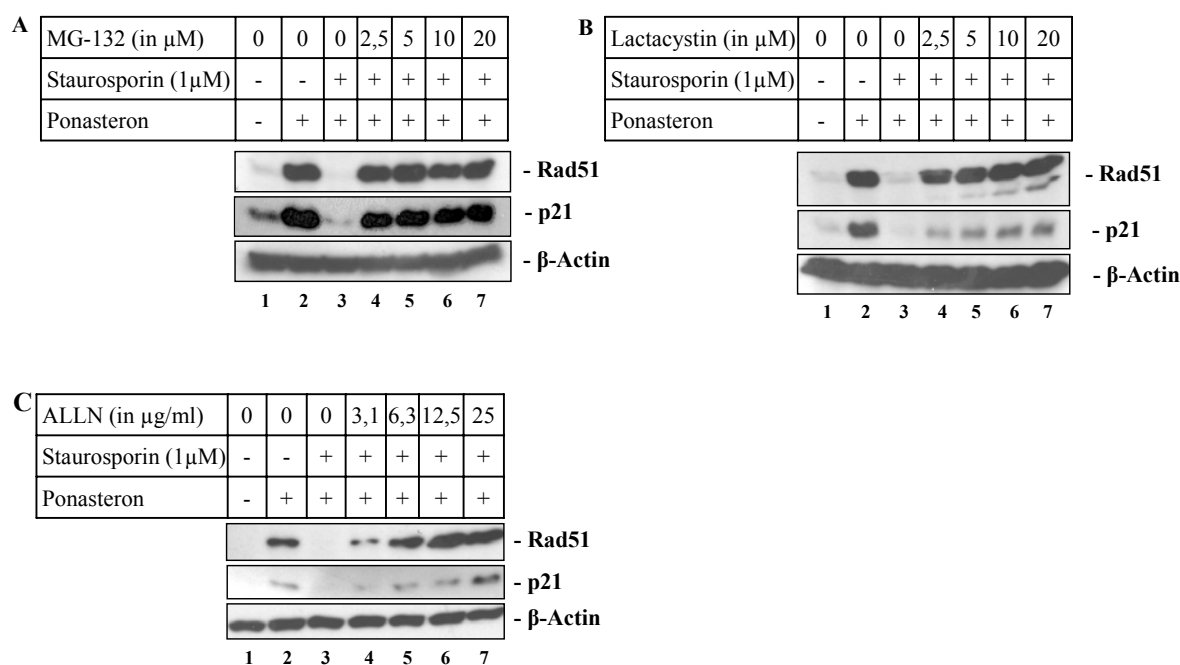


Abb. 12: Einfluss von Proteasominhibitoren auf Staurosporin exponierte UiRad51-Zellen. Induzierte UiRad51-Zellen wurden 8h mit Staurosporin (1 μM) allein bzw. mit Staurosporin und Proteasominhibitor inkubiert. Zusätzlich sind Kontrollen ohne Gift bzw. ohne Gift/ohne Induktion aufgeführt. Nach Exposition wurden die Zellen lysiert. Der Gehalt an Rad51, p21 und β -Actin (Ladekontrolle) wurde durch Westernblot dargestellt. **A** Staurosporin und MG-132. **B** Staurosporin und Lactacystin. **C** Staurosporin und ALLN.

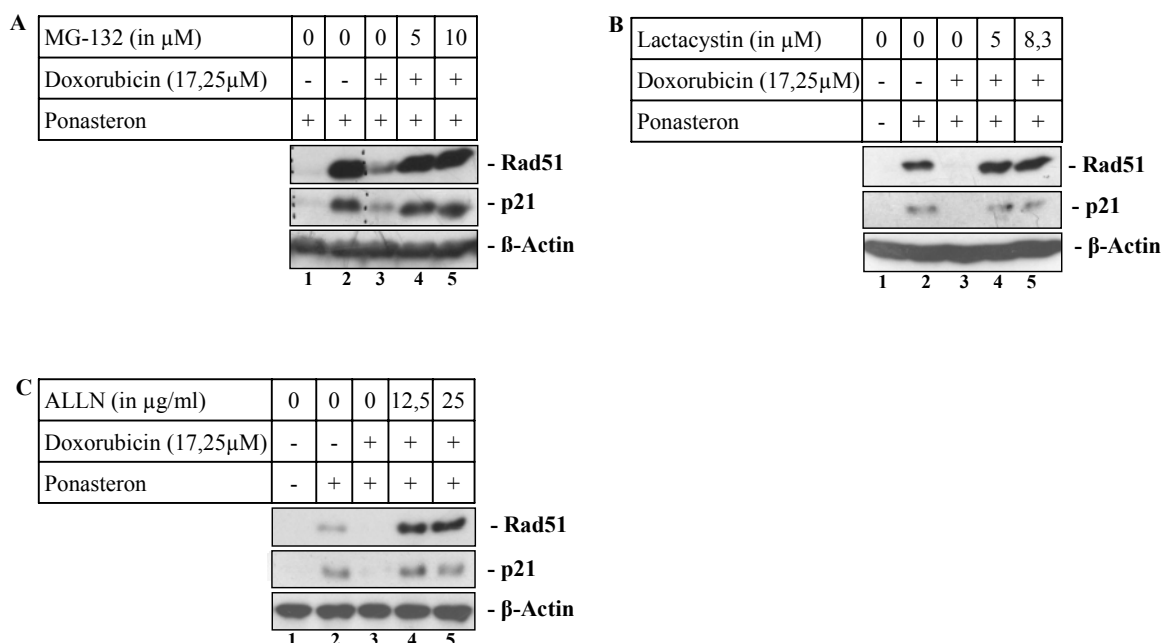


Abb. 13: Einfluss von Proteasominhibitoren auf Doxorubicin exponierte UiRad51-Zellen. Induzierte UiRad51-Zellen wurden 8h mit Doxorubicin (17,25 μM) allein bzw. mit Doxorubicin und Proteasominhibitor inkubiert. Zusätzlich sind Kontrollen ohne Gift bzw. ohne Gift/ohne Induktion aufgeführt. Nach Exposition wurden die Zellen lysiert. Der Gehalt an Rad51, p21 und β -Actin (Ladekontrolle) wurde durch Westernblot dargestellt. **A** Doxorubicin und MG-132 (Staurosporin zum direkten Vergleich hinzugenommen). **B** Doxorubicin und Lactacystin. **C** Doxorubicin und ALLN.

Die bisher gezeigten Veränderungen des Rad51-Gehalts wurden in induzierten UiRad51-Zellen gezeigt. Sie waren demnach primär bezogen auf das durch den Vektor exprimierte, exogene Rad51, welches unter Induktion den größten Teil des mittels Westernblot nachgewiesenen Rad51 darstellte. Die Inhibition des Rad51-Abbaus konnte jedoch auch anhand des endogenen Rad51 in der Parentalzelllinie U2-OS nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigten sich identische Ergebnisse in den Melanomzelllinien Meuro und Sk-Mel und in den Mammakarzinomzelllinien T47D und MCF7. In Abb. 14 ist die Verminderung des Rad51-Gehalts bei Staurosporinexposition in Spur 2 zu sehen, bei Zugabe von MG-132 wurde das Niveau von Rad51 stabilisiert (Abb. 14, Spur 3).

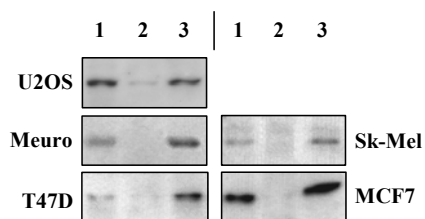


Abb. 14: Inhibition des Staurosporin vermittelten Rad51-Abbaus durch MG-132 wird in verschiedenen Zelllinien reproduziert. Die Zelllinien U2-OS, Meuro, Sk-Mel, T47D und MCF7 wurden 8h mit Staurosporin bzw. Staurosporin und Proteasominhibitor inkubiert. Zusätzlich ist eine Kontrolle ohne Gift aufgeführt. Nach Exposition wurden die Zellen lysiert und der Gehalt an Rad51 durch Westernblot bestimmt. 1. Kontrolle ohne Gift, 2. Staurosporin (1 μ M), 3. Staurosporin 1 μ M und MG-132 (5 μ M).

4.7 Nachweis der reversiblen Inhibition des proteasomalen Rad51-Abbaus

Die Inhibition der Proteasomen ließ darauf schließen, dass die Abnahme des Rad51-Gehalts nach Inkubation mit Staurosporin oder Doxorubicin über die proteasomale Degradation des Proteins erfolgte. Sowohl ALLN als auch MG-132 sind reversible Proteasominhibitoren. Um die Reversibilität des Rad51-Abbaus nachzuweisen, wurde ein Zeitreihenexperiment mit MG-132 durchgeführt. Die Zellen wurden nach dem vorbeschriebenen Versuchsschema behandelt. Nach 8h Exposition mit Staurosporin und MG132 wurde der Proteasominhibitor entzogen. Über einen Zeitraum von 8h wurden alle 2h Zellen geerntet. Im Westernblot konnte das Wiedereinsetzen der proteasomalen Degradation gezeigt werden (Abb. 15, Spuren 5-8).

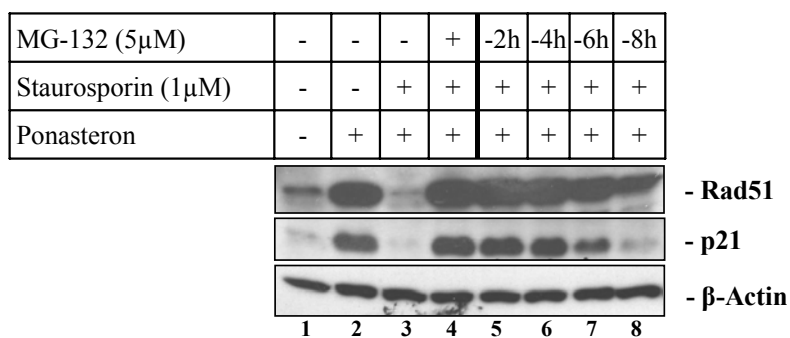


Abb. 15: Zeitreihenexperiment mit U2OS-Zellen exponiert mit Staurosporin und MG-132. Vorinduzierte U2OS Zellen wurden 8h mit Staurosporin und Proteasominhibitor inkubiert. Danach wurde der Proteasominhibitor entzogen und für einen Zeitraum von 8h alle 2h eine Probe lysiert. Zusätzlich Kontrolle ohne Induktion, mit Induktion, mit Induktion und Staurosporin. Der Gehalt an Rad51, p21 und β -Actin (Ladekontrolle) wurde durch Westernblot dargestellt;: 1. und 2. Kontrollen ohne Gift, 3. Exposition mit Staurosporin, 4. Exposition mit Staurosporin und MG-132, 5. bis 8. Exposition mit Staurosporin nach Entzug von MG-132 (Zeitangabe entspricht Zeitspanne nach Entzug).

4.8 Nachweis einer Apoptoseresistenz nach erfolgter Rad51-Überexpression

Die Ergebnisse in 4.5 zeigten, dass überexprimiertes Rad51 unter Staurosporineinwirkung schon binnen 4h komplett abgebaut wurde. Demgegenüber setzte die durch Staurosporin ausgelöste Apoptose in nicht-induzierten UiRad51-Zellen erst nach 4-6h ein, dargestellt anhand der dann erst einsetzenden Caspase-3-Aktivität. Zudem wurde in 4.1 gezeigt, dass in UiRad51 unter induzierten Bedingungen (=Rad51-Überexpression) die Caspase-3-Aktivität bei Staurosporinexposition verringert ist.

Kremer wies in MTT-Untersuchungen nach, dass bei Rad51-Überexpression eine Resistenz induziert wird, welche in einem vermehrten Zellüberleben bei Staurosporineinwirkung resultierte (Kremer 2003). Dieser Resistenznachweis wurde 4 Tage nach Kontakt der Rad51-überexprimierenden Zellen mit Staurosporin geführt, also zu einem Zeitpunkt, an dem Rad51 lange nicht mehr in den Zellen nachweisbar war.

Die zeitliche Diskrepanz zwischen Rad51-Verlust unter Staurosporin und einsetzender Caspase-3-Aktivität sowie der Nachweis der Staurosporinresistenz nach mehreren Tagen geben Hinweise darauf, dass die direkte Anwesenheit von Rad51 für die Resistenzbildung keine Rolle spielt. Vielmehr scheint eine einmalige Überexpression ausreichend zu sein.

Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte mithilfe von MTT-Untersuchungen gezeigt werden, ob und wie lange eine zeitlich isolierte, einmalige Überexpression von Rad51 einer Zelle Apoptoseresistenz verleiht.

Abb. 16A zeigt die Dynamik der induzierbaren Rad51-Überexpression ohne Einwirkung von Giften. 24h nach Beginn der Induktion wurde eine maximale Rad51-Expression erreicht. 16h nach Entzug des Induktors Ponasteron sank der Rad51-Gehalt wieder auf ein basales Niveau.

Basierend auf den Ergebnissen der Untersuchung zur Expressionsdynamik wurden MTT-Testreihen durchgeführt. Es wurden parallel UiRad51 und UiLacZ (zur Kontrolle) auf Mikrotiterplatten ausgesät und 24h lang induziert. Danach wurde der Induktor entzogen und erst nach verschiedenen Latenzzeiten (16h, 48h, 64h) Staurosporin in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Durch diese Vorgehensweise wurde sichergestellt, dass zu Beginn der Staurosporinexposition keine Rad51-Überexpression in den Zellen bestand, sondern wieder ein basales Expressionsniveau vorlag. Nach jeweils 16h Staurosporinexposition und anschließender Recovery-Zeit von 48h ohne Staurosporin wurde die MTT-Messung durchgeführt (Abb. 16B).

Bei 16h Latenzzeit zeigte sich deutlich über den gesamten Konzentrationsbereich, dass die vorher Rad51-überexprimierenden Zellen bei Staurosporinexposition einen signifikant

höheren Anteil überlebender Zellen aufwiesen als nicht-überexprimierende Zellen (Abb. 16C, oberstes Diagrammpaar). Bei 48h Latenzzeit war der Effekt noch bei einer Staurosporinkonzentration von 250 μ M zu beobachten (Abb. 16C, mittleres Diagrammpaar), während er bei 64h vollkommen verschwand (Abb. 16C, unteres Diagrammpaar). Bei der Kontrollzelllinie UiLacZ war bei allen Latenzzeiten kein signifikanter Unterschied zwischen β -Galactosidase-überexprimierenden Zellen und nicht-überexprimierenden Zellen zu sehen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch nach erfolgter Überexpression von Rad51 und anschließender Rückkehr auf ein basales Expressionsniveau für einen Zeitraum von 16 bis 48h ein anti-apoptotischer Effekt nachweisbar war.

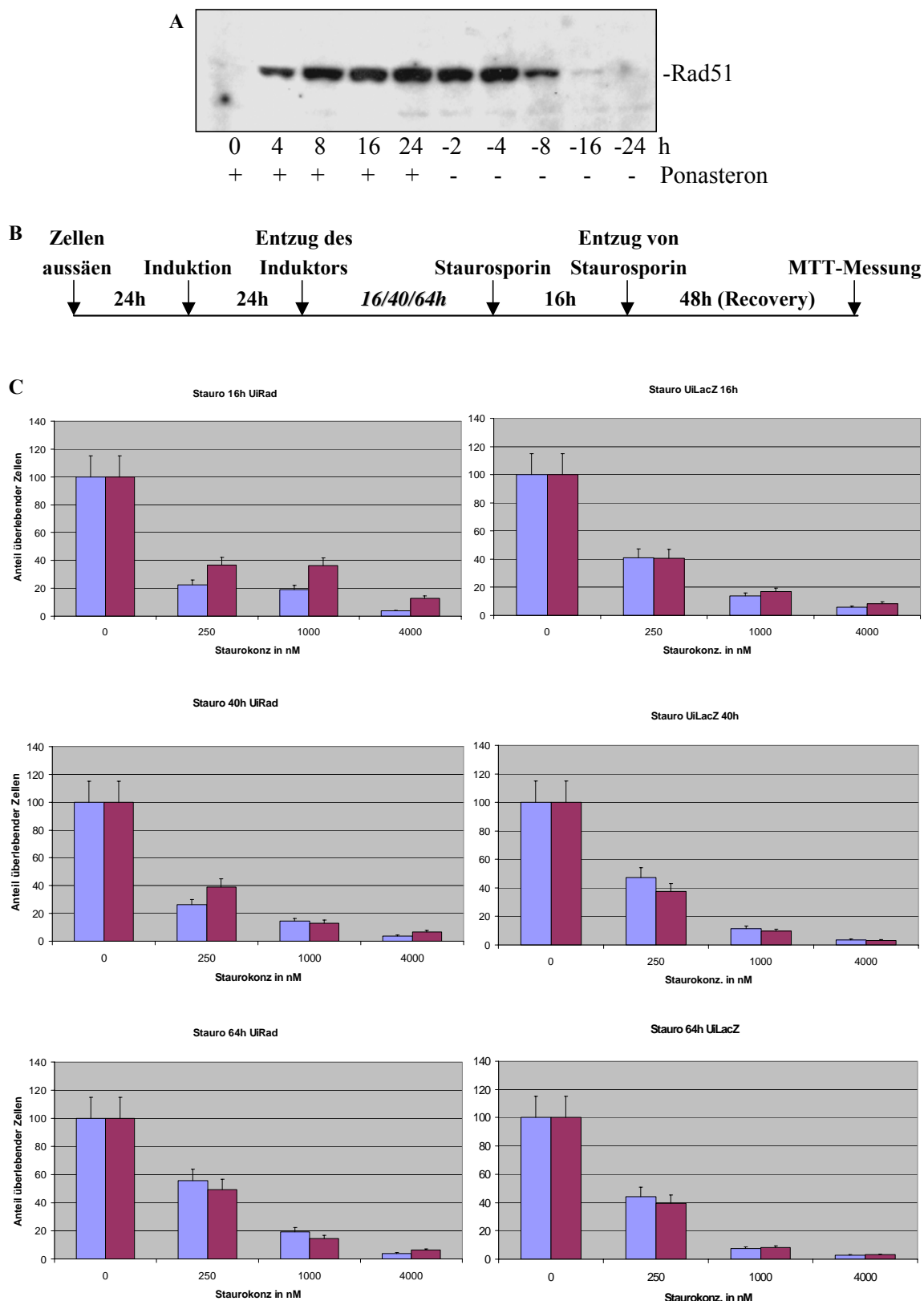


Abb. 16: MTT-Untersuchungen zur Resistenzbildung gegenüber Staurosporin bei vorangegangener Rad51-Überexpression. **A** Dynamik der Rad51-Überexpression in UiRad51 ohne Giftexposition, Western blot auf Rad51; **B** MTT-Untersuchung, Versuchsablauf; **C** MTT-Untersuchung, Ergebnisse: die Balken stellen den Anteil überlebender Zellen dar, helle Balken – nicht induziert, dunkle Balken – induziert.

5 Diskussion

Molekulargenetische Aspekte der Krebserkrankung sind nicht nur in der Grundlagenforschung von Bedeutung. Auch in der angewandten klinischen „Realität“ sind sie im Begriff, sich in Diagnostik und Therapie neben der klassischen mikroskopischen Histologie zu etablieren. So können mithilfe standardisierter DNA-Chips Expressionsprofile wichtiger Gene erstellt werden, oder es können verschiedene Gene auf Polymorphismen bzw. Mutationen untersucht werden. Diese molekulargenetische Charakterisierung kann neben klinischen und histologischen Merkmalen entscheidende prognostische Hinweise liefern in Bezug auf effektive Therapieoptionen. Hier ist vor allem die Charakterisierung der Tumoren hinsichtlich der Sensibilität bzw. Resistenz gegenüber bestimmten Zytostatikaklassen hervorzuheben, um Patienten möglichst früh einer maximal effektiven zytostatischen Therapie zuzuführen. In diesem Zusammenhang ist auch die Rolle von DNA-Reparaturgenen für die Zytostatikaresistenz von Bedeutung. So wurde u. a. jüngst berichtet, dass Polymorphismen in den Genen XPD und XRCC1 prognostische Bedeutung beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom unter Therapie mit platinhaltigen Zytostatika haben könnten (Gurubhagavatula et al. 2003). Diese Gene codieren für Proteine, welche an der DNA-Reparatur durch Basenexzision (XRCC1) und Nukleotidexzision (XPD) beteiligt sind (Rybicki et al. 2004).

5.1 Die Rolle von DNA-Reparatursystemen und Rad51 in der Tumorgenese und Resistenz

Die verschiedenen DNA-Reparatursysteme sind für den Erhalt der Integrität der genetischen Information unabdingbar. Die DNA ist ständig Schäden durch Strahlung (UV, ionisierende Strahlung) und chemischen Substanzen ausgesetzt. Folglich ist anzunehmen, dass Störungen in den DNA-Reparatursystemen zu einer erhöhten Mutagenität und Tumorgenität führen können. Dabei kann sowohl eine gesteigerte Funktion wie auch ein Funktionsverlust zu Tumorprogression und Resistenz führen. Die Zelle besitzt verschiedene Möglichkeiten, DNA-Schäden zu beheben. Eine große Untergruppe DNA-reparierender Enzyme bilden die Systeme zur Behebung veränderter Basen (Alkylierungen, Dimerisierungen, u. a.) und Basenfehlpaarungen, also lokalisierten Schäden auf einem DNA-Strang, welche jedoch noch nicht zum Verlust der Kontinuität des DNA-Doppelstrangs (Doppelstrangbruch – DSB) geführt haben. Dazu gehören die Basenexzisionsreparatur (BER),

Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und die „mismatch“-Reparatur (MMR) (Cortellino et al. 2003). Die Basenexzisionsreparatur erkennt und schneidet einzelne „defekte“, d. h. chemisch modifizierte, Basen aus und füllt die Lücke mit den entsprechenden richtigen Nukleotiden auf (Alberts et al. 2002). Untersuchungen von Cortellino et al. zeigten, dass der Verlust von MED1, einem an der BER beteiligten Protein, zu einer Resistenz gegenüber N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), Cisplatin und 5-FU führte (Cortellino et al. 2003). Die Nukleotidexzisionsreparatur ist in der Lage, einen ganzen Bereich eines DNA-Strangs, der schadhafte Nukleotide wie z. B. Pyrimidindimere enthält, auszuschneiden und mit den entsprechenden korrekten Nukleotiden wieder aufzufüllen (Alberts et al. 2002). Xu et al. haben für das an der NER beteiligte Protein XPD eine positive Korrelation zwischen XPD-Proteingehalt und Resistenz gegenüber alkylierenden Zytostatika in humanen Tumorzellen nachgewiesen (Xu et al. 2002). Das „mismatch“-Reparatursystem behebt Basenfehlpaarungen, die vor allem bei der DNA-Replikation auftreten. Dabei erkennen die zugehörigen Enzyme die Basenfehlpaarung im neu synthetisierten Strang, schneiden diesen Bereich aus und füllen die Lücke mittels Neusynthese wieder auf (Alberts et al. 2002). Zu den Proteinen des Systems gehören MLH-1, PMS-2, MSH-2 und MSH-3/MSH-6. Vererbte Mutationen in Faktoren des „mismatch“-Reparatursystems (v. a. in MLH-1 und MSH-2) gehen mit der Prädisposition für nicht-polypöse Kolonkarzinome („hereditary non polyposis colon cancer“ – HNPCC) einher. Daneben zeichnet in besonderer Weise der erworbene Funktionsverlust der MMR in etablierten Tumoren für Resistenz gegenüber bestimmten Zytostatika verantwortlich. MMR-defiziente Zellen zeigten eine Resistenz gegenüber methylierenden Substanzen, in geringerem Umfang auch gegenüber Thiopurinen und Cisplatin (Anthony et al. 1996; Fink et al. 1996; Branch et al. 2000). Die Resistenz bei MMR-Defizienz wird u. a. dadurch erklärt, dass DNA-Schäden durch methylierende Substanzen normalerweise durch das MMR erkannt werden, da diese Schäden strukturell Basenfehlpaarungen ähneln. Die Schäden werden durch das MMR jedoch nur fehlerhaft beseitigt. Dabei entstehende DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) lösen über eine DNA-Schadenssignalkaskade (ATM, p53, u. a.) Apoptose aus. Bei funktionsloser „mismatch“-Reparatur wird keine Apoptose ausgelöst, und die Zelle toleriert den durch das Zytostatikum verursachten DNA-Schaden (D'Atri et al. 1998; Hickman und Samson 1999; Toft et al. 1999; Colussi et al. 2001; Cejka et al. 2003). Die andere Untergruppe von DNA-Reparatursystemen behebt DNA-Doppelstrangbrüche (DSB), die aufgrund ionisierender Strahlung oder chemischer Substanzen entstanden sind. Hierzu stehen zwei verschiedene Systeme zur Verfügung:

1. Das Reparatursystem der „nicht-homologen Verbindung von DNA-Enden“ („non homologous end-joining“ – NHEJ) verbindet zwei freie DNA-Enden ohne Rücksicht darauf, ob die beiden Teilstücke zu homologen Abschnitten gehören. NHEJ wird auch in physiologischer Weise aktiv beim DNA-Rearrangement von codierenden Sequenzen der B- und T-Zellrezeptoren. Hierbei werden zufällig DNA-Kassetten für verschiedene Rezeptorabschnitte zu einem kompletten Rezeptor kombiniert. Auf diese Weise ist eine große Diversität von Rezeptoren möglich (Alberts et al. 2002).

2. DSB können auch mittels homologer Rekombination (HR) repariert werden. Zur Rekonstruktion des geschädigten DNA-Abschnitts dient dabei der jeweilige Abschnitt auf dem homologen Chromosom (Alberts et al. 2002). Derselbe Enzymkomplex, der für die Reparatur durch HR verantwortlich ist, führt auch die homologe Rekombination in der Meiose aus (Crossing-over und Strangaustausch).

Rad51, das Homolog zum bakteriellen Rekombinationsfaktor RecA, spielt bei der HR eine zentrale Rolle (Henning und Sturzbecher 2003). Hinsichtlich seiner Rolle in der Tumorentstehung und Resistenzentwicklung sind verschiedene Untersuchungen durchgeführt worden. Neue Ergebnisse deuten darauf hin, dass ähnlich dem MMR auch ein Verlust der HR zu einem tumorigenen Mutatorphänotyp führt. So zeigten Bertrand et al. anhand in Mäuse injizierter CHO-Zellen („chinese hamster ovary“), welche murines Rad51 überexprimierten oder für Rad51 vermittelte HR defizient waren, dass der Verlust von Rad51 vermittelter HR zu einer erhöhten Tumorfrequenz im Vergleich zu Kontrollzellen führte. In diesen HR-defizienten Zellen wurden auch gehäuft spontane Zentrosomduplikationen und Aneuploidie beobachtet (Bertrand et al. 2003).

In bereits etablierten Tumoren spielt Rad51 eine Rolle bei der Entwicklung von Zytostatikaresistenz. Im Gegensatz zur MMR, bei welcher ein Verlust der Funktion zur Resistenz führt, bewirkt gerade die Überexpression von Rad51 einen zytostatikaresistenten Phänotyp. Dies wurde zunächst anhand direkt DNA-schädigender und DSB induzierender Agenzien gezeigt, z. B. an alkylierenden Substanzen oder Etoposid (Slupianek et al. 2001; Panasci et al. 2002; Hansen et al. 2003). Diese Resistenz konnte mit einer erhöhten DNA-Reparaturrate bei Rad51-Überexpression erklärt werden.

Die durch Rad51 verursachte Resistenz umfasst auch Zytostatika, die nicht DSB-induzierend wirken, wie 5-FU, MTX und Staurosporin. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass eine Rad51-Überexpression Zellen eine Apoptoseresistenz verleiht (Kremer 2003).

Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten eine durch eine Rad51-Überexpression hervorgerufene Hemmung der Caspase-3 Aktivierung (vgl. 4.1). Da Caspase-3 einen zentralen

Faktor apoptotischer Signalwege darstellt (vgl. 5.3), können diese Ergebnisse weiter die anti-apoptotische Wirkung einer Rad51-Überexpression bestätigen.

Abb. 17 zeigt zusammenfassend Folgen einer dysregulierten Rad51-Expression auf normale und transformierte Zellen. Im Hinblick auf die resistenzfördernde Eigenschaft von überexprimiertem Rad51 in transformierten Zellen stellt sich die Frage, ob eine (herbeigeführte) Herunterregulation von Rad51 eine Resensitivierung gegenüber Zytostatika bewirken kann.

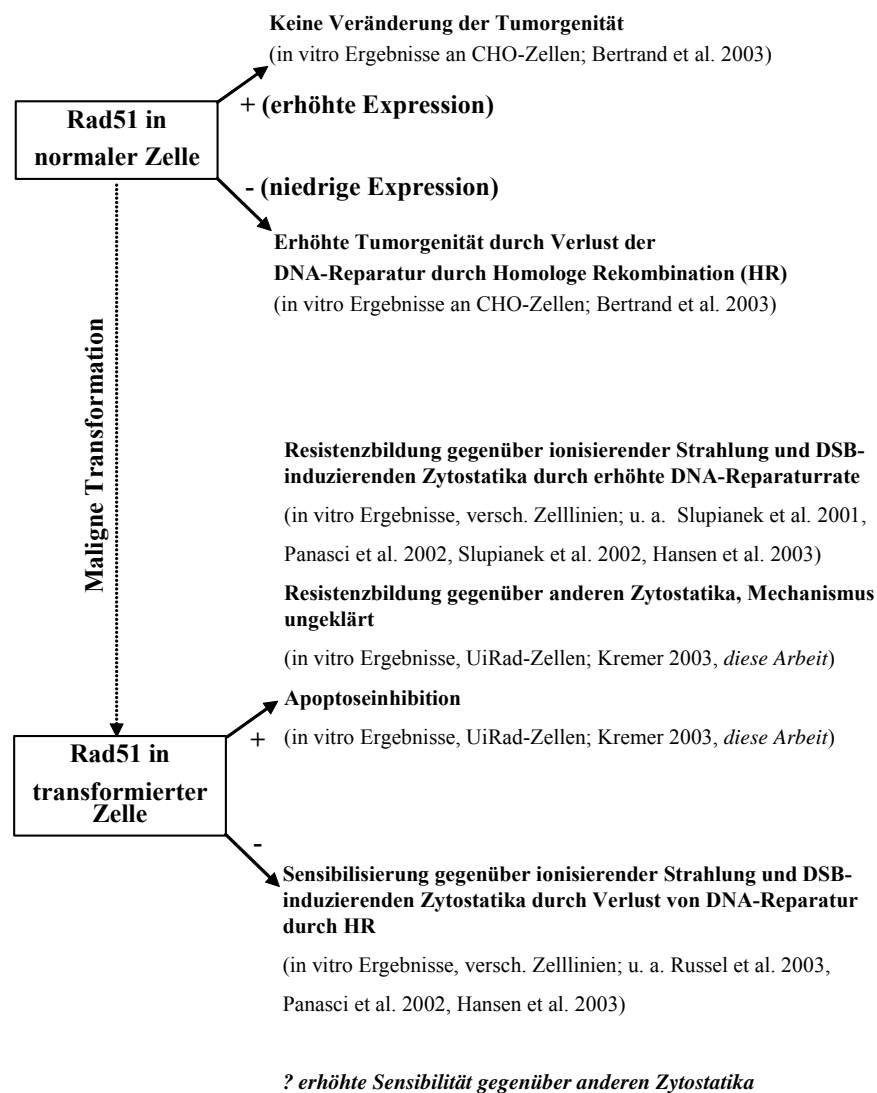


Abb. 17: Auswirkungen der Rad51-Expression in Abhängigkeit vom zellulären Kontext

5.2 Modulation des Rad51-Gehalts durch DNA-schädigende Zytostatika

Der Rad51-Gehalt einer Zelle kann durch verschiedene Substanzen moduliert werden. Die Behandlung von Mv1Lu-Zellen (epitheliale Lungenzellen) mit TGF- β im Wachstumsmedium führt zu einer Degradation von Rad51 (Kanamoto et al. 2002). TGF- β ist eine Mediatorsubstanz, die regulierend an verschiedenen zellulären Vorgängen wie embryonalem Wachstum, Angiogenese, Immunantwort und Tumorstadium beteiligt ist (Derynck und Zhang 2003). Rad51 ist ferner Substrat einer Caspase-3 bedingten Spaltung (Flygare et al. 2000). Gestützt auf fluoreszenzmikroskopische Daten gibt es Hinweise, dass der Rad51-Gehalt unter Einwirkung des alkylierenden N-Lost-Derivats Chlorambucil (CLB) erhöht ist. Interessanterweise korreliert dabei offenbar gleichzeitig die relative Zunahme am Rad51-Fluoreszenzsignal positiv mit erhöhter Resistenz gegenüber CLB (Christodoulopoulos et al. 1999). Die Vermutung, dass das Rad51-vermittelte Reparatursystem auf DNA-Schäden dynamisch reagiert, wird weiter durch Untersuchungen gestützt, welche eine positive Korrelation von Rad51- und XRCC-Proteingehalt und CLB-Resistenz in B-CLL-Zellen nachwies (Bello et al. 2002).

Untersuchungen in dieser Arbeit können die Ergebnisse von Christodoulopoulos et al. und Bello et al. weiter bestätigen und spezifizieren, die Exposition von UiRad51-Zellen mit CLB zeigte im Westernblot eine deutliche Zunahme des Rad51-Gehalts.

Ferner wird nach DNA-Doppelstrangbruch (DSB)-induzierenden Ereignissen, wie z. B. bei der Exposition gegenüber ionisierender Strahlung oder DSB-induzierenden Substanzen, eine Rad51-Akkumulation und Organisation in sogenannten Foci im Zellkern sowie eine transkriptionelle Hochregulation von Rad51 beobachtet (Raderschall et al. 2002). Um die Auswirkung DSB-induzierender Substanzen auf Rad51-überexprimierende Zellen näher zu charakterisieren, wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt des DSB-induzierenden Agens Calicheamicin- γ 1 auf UiRad51-Zellen untersucht, unter der Annahme, dass Rad51 in Folge der entstandenen DSB ebenso hochreguliert wird. Calicheamicin- γ 1 ist ein aus einer Microsporaspezies isoliertes Antibiotikum, welches an spezifischen DNA-Stellen DSB erzeugt (Zein et al. 1988). Zur klinischen Anwendung kommt es als Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg[®], Calicheamicin- γ 1 gekoppelt an monoklonalen CD33-Antikörper) bei der Therapie der AML (Tomblyn und Tallman 2003).

Im Gegensatz zur hier verwendeten UiRad51-Zelllinie wurde in verschiedenen Zelllinien unter Calicheamicineinfluss eine Apoptoseinduktion beobachtet. Dies wurde auf DSB-Schaden nachfolgende Effekte zurückgeführt (Nicolaou et al. 1994). Somit ist offenbar der zelluläre Hintergrund entscheidend über die apoptotische Wirkung von Calicheamicin- γ 1.

In dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen an Rad51-überexprimierenden UiRad51-Zellen zeigten eine deutliche Zunahme des Rad51-Gehalts bei Calicheamicinexposition. In anderen Zelllinien wurde jedoch ein heterogenes Bild des Calicheamicineffektes auf Rad51 beobachtet. Während der Rad51-Gehalt in der Melanom-Zelllinie Sk-Mel ebenfalls nach 24h Calicheamicinexposition deutlich Anstieg, blieb er in den meisten anderen Zelllinien unverändert, im Falle der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 sank der Rad51-Gehalt sogar deutlich.

Aufgrund der in dieser Arbeit vorliegenden Daten ist daher anzunehmen, dass wiederum der zelluläre Hintergrund entscheidend dafür ist, ob Calicheamicin- γ 1 bedingte DSB eine Hochregulation des Rad51-Proteingehalts induzieren.

5.3 Modulation des Rad51-Gehalts durch Apoptose-induzierende Substanzen

Überexprimiertes Rad51 hat offenbar eine anti-apoptotische Wirkung. Hinweisend scheint insbesondere der Nachweis verminderter PARP-Spaltung bei Rad51-Überexpression zu sein, welche indirekt eine Inhibition der für die apoptotische Signaltransduktion zentralen Caspase-3 darstellt (Kremer 2003).

Als Apoptose wird der Prozess des programmierten Zelltods bezeichnet. Im Gegensatz zur Nekrose, bei der die Zelle direkt durch die Einwirkung exogener Noxen abstirbt, wird bei der Apoptose der Zelltod infolge eines intra- oder extrazellulären Signals durch zelleigene Enzyme herbeigeführt (Alberts et al. 2002). Zentrale Bestandteile der intrazellulären Signalkaskade, die zur Apoptose führen, sind die Caspasen (*Cysteiny-Aspartatspezifische Proteinasen*). Zu den Charakteristika der Caspasen zählt eine Cystein-Seitenkette im aktiven Zentrum und die Aminosäuresequenz-spezifische Proteaseaktivität an der Erkennungssequenz „-Aspartat-x-y-z-“ (wobei x, y, z andere Aminosäuren darstellen; insgesamt vier Aminosäuren bestimmen somit die Zielsequenz einer Caspase, wobei die erste immer Aspartat ist) von Zielproteinen (Thornberry et al. 1997; Hengartner 2000). Caspasen liegen in der Zelle als inaktive Procaspasen vor, erst durch die Abspaltung der regulatorischen Domänen durch andere, aktivierte Caspasen wird die Procaspase in die aktive Caspase überführt. Durch die gegenseitige Aktivierung von Caspasen entsteht eine Signaltransduktionskaskade (Abb. 18). Es existieren zwei Hauptsignalwege, innerhalb welcher die Signaltransduktion durch Caspasen zur Apoptose führt. Der erste, durch exogene Stimulation aktivierte Weg führt über die Bindung von CD95-Ligand an den CD95-Rezeptor (syn. „Fas-Rezeptor“). Auf der intrazellulären Seite des CD95-Rezeptors sind die Proteine

FADD (Fas-associated death domain) und Procaspase-8 gebunden. Die Aktivierung von CD95 führt zur Assoziation mehrerer aktivierter CD95-Rezeptor-Ligand-Komplexe. Obwohl Procaspasen nicht aktiv sind, besitzen sie eine intrinsische Restaktivität. Diese kommt im Falle der in gegenseitige Nähe gerückten Procaspase-8 Moleküle zum Tragen und führt zur gegenseitigen proteolytischen Spaltung und Aktivierung (Muzio et al. 1998). Caspase-8 aktiviert in Folge Caspase-3, die zentrale Effektorcaspase in der Signaltransduktionskaskade. Caspase-3 spaltet proteolytisch verschiedene spezifische Effektorproteine, darunter die in dieser Arbeit untersuchte Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP). Der zweite, intrinsische Aktivierungsweg führt über die Erkennung kritischer Zellschäden. So können DNA-Schäden oder Hypoxie eine Aktivierung von p53 herbeiführen. Aktiviertes p53 besitzt verschiedene Möglichkeiten, Apoptose auszulösen. So kann die Transkription proapoptotischer Gene wie Bax und Bak induziert werden und gleichzeitig die anti-apoptotischen Gene wie Bcl-2, Bcl-X_L und IAPs („inhibitors of apoptosis“) unterdrückt werden (Bartke et al. 2001; Ryan et al. 2001; Wu et al. 2001; Hoffman et al. 2002). Bax und andere proapoptotische Proteine der Bcl2-Familie führen schließlich zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Hengartner 2000). Cytochrom c assoziiert danach mit Apaf-1 und Procaspase-9. Zusammen bilden sie das sog. Apoptosom, ein aktivierter Caspase-9-Komplex, der Procaspase-3 in aktive Caspase-3 überführt. Von hier aus verläuft der weitere Weg gleich dem exogenen. p53 kann jedoch auch direkt an der Apoptose-signal-kaskade beteiligte Proteine wie Apaf-1 transaktivieren (Moroni et al. 2001; Robles et al. 2001). Es sind noch viele weitere Proteininteraktionen mit der Apoptosesignalkaskade beschrieben, deren Funktion in der positiven oder negativen Regulation der Apoptose besteht (Hengartner 2000). Zum Beispiel üben Proteine wie FLIP, IAPs, Bcl-2 und Bcl-X_L einen inhibitorischen Effekt auf die Apoptosekaskade aus. So entsteht in der normalen Zelle ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Faktoren. Erst wenn ein Signal ein Übergewicht eines proapoptotischen Wegs herbeiführt, wird der nicht mehr aufzuhaltende Apoptoseprozess ausgelöst (Johnstone et al. 2002). Mutationen, die zu Funktionsverlusten in proapoptotischen Genen wie p53 (das am häufigsten mutierte Gen in Tumoren) oder zu unkontrollierter Funktion von anti-apoptotischen Genen wie Bcl-2 führen, können somit Tumorzellen einen Überlebensvorteil verschaffen.

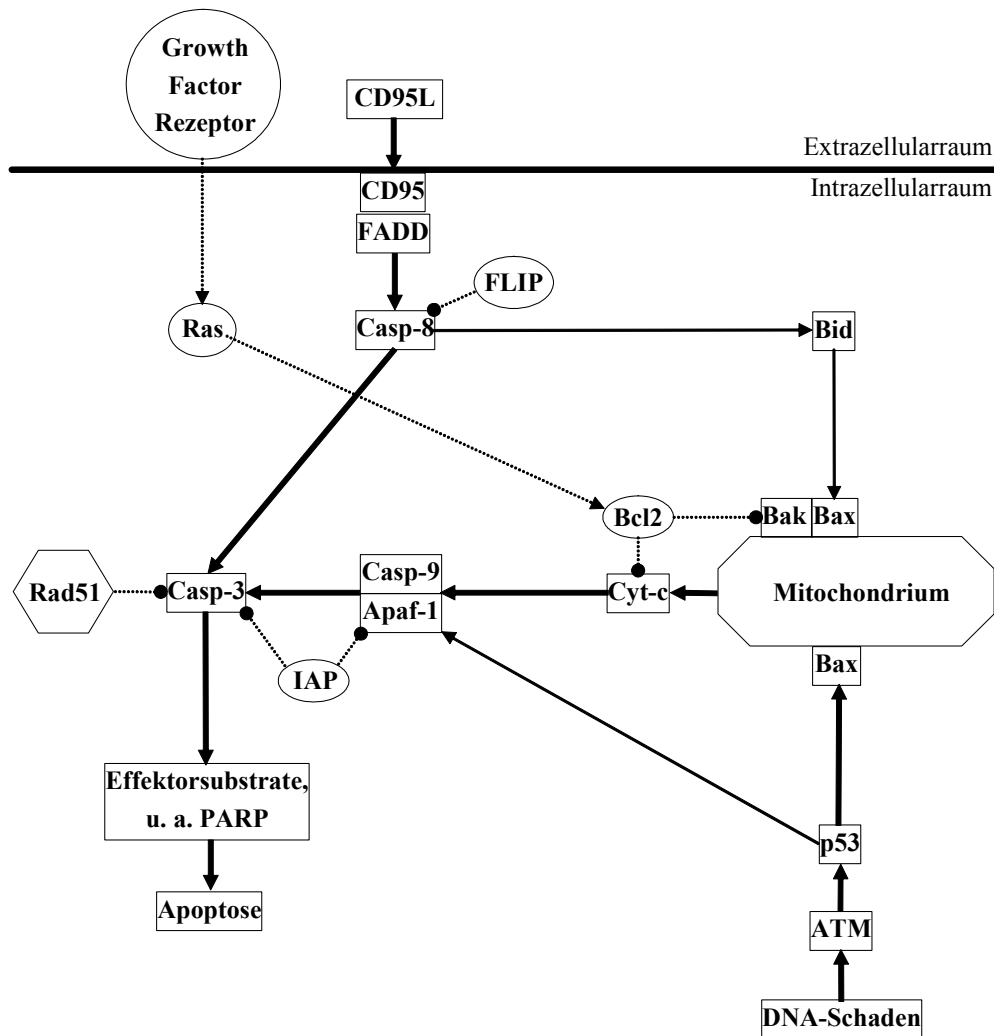


Abb. 18: Caspase-3 abhängige Apoptosewege (vereinfacht), durchgezogene Linien – proapoptische Wege, gepunktete Linien – anti-apoptische Wege; Cyt-c – Cytochrom c, Casp-[n] – Caspase-[n], IAP – „inhibitors of apoptosis“; modifiziert nach Johnstone, 2002

Eine Interaktion der Apoptosekaskade mit Rad51 wurde vor allem in Bezug auf Caspase-3 aufgezeigt. So scheint Rad51 spezifisches Substrat einer Caspase-3 katalysierten Spaltung zu sein. Dies wurde sowohl unter Einwirkung von ionisierender Strahlung (Huang et al. 1999), als auch unter Exposition mit Apoptose-induzierenden Substanzen (Camptothecin, anti-Fas-Antikörper, Staurosporin) (Flygare et al. 1998; Choi et al. 2000; Flygare et al. 2000) beobachtet. Auch bei Exposition mit Ursolsäure tritt in Folge Caspaseaktivierung eine proteolytische Spaltung von Rad51 auf (Choi et al. 2000). Somit waren in dieser Arbeit zusätzlich zum DSB-induzierenden Calicheamicin- γ 1 vor allem die Apoptose-induzierenden Gifte wie Staurosporin und Doxorubicin hinsichtlich ihrer Wirkung auf Veränderungen im Rad51-Gehalt von Interesse.

Doxorubicin ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Anthrazykline. Es wird im klinischen Einsatz z. B. bei der Therapie des Mammakarzinoms häufig in einem Kombinationsregime

mit anderen Chemotherapeutika verwendet. Die primäre zytostatische Wirkung wird durch Inhibition von Topoisomerase erreicht, einem Enzym, das DNA-Verwindungen während Replikations- oder Transkriptionsvorgängen auflöst. Zusätzlich löst Doxorubicin auch direkt Apoptose aus. Die genauen Mechanismen hierfür sind jedoch noch nicht ganz aufgeklärt. Es wird angenommen, dass Doxorubicin Apoptose über eine Erhöhung des Ceramidgehalts und nachfolgender Aktivierung des CD95-Signalwegs induziert (Herr et al. 1997; Friesen et al. 1999; Friesen et al. 1999; Lucci et al. 1999; Cuvillier et al. 2001). Es wurde jedoch auch eine CD95-unabhängige Apoptoseinduktion durch direkte Aktivierung von Caspasen nachgewiesen (Asakura et al. 1999; Gamen et al. 2000; Yang et al. 2001). Die Inhibition der Caspasekaskade verhindert offenbar die Doxorubicin-induzierte Apoptose, schützt jedoch nicht vor der zytotoxischen Wirkung. Es gibt Hinweise darauf, dass dann der Zelltod auf dem Wege der Seneszenz eintritt (Rebbaa et al. 2003). Die Frage, ob Doxorubicin auf p53-abhängige, -unabhängige oder auf beide Weisen Apoptose induziert, ist Gegenstand der Diskussion (Brantley-Finley et al. 2003; Tsang et al. 2003; Liu et al. 2004). Resistenz gegenüber Doxorubicin wird zumindest teilweise auf die Inhibition proapoptotischer Wege zurückgeführt (Osmak et al. 1998).

Staurosporin, ein aus *Streptomyces staurospora* isoliertes Zellgift (Omura et al. 1977), ist als potenter Proteinkinase-C (PKC)- Inhibitor und Apoptose-induzierende Substanz charakterisiert worden (Tamaoki et al. 1986; Matsumoto und Sasaki 1989; Chae et al. 2000). Der genaue Mechanismus der Apoptoseinduktion ist jedoch noch nicht ganz aufgeklärt. Apoptose wird durch Staurosporin offenbar durch die Aktivierung der Caspasekaskade über den intrinsischen, mitochondrialen Weg induziert (Zhang et al. 1998; Tang et al. 2000; Kashkar et al. 2002). Neuere Befunde geben jedoch auch Hinweise auf eine zusätzliche, Caspase-unabhängige Apoptoseinduktion durch Staurosporin (Belmokhtar et al. 2001; Stepczynska et al. 2001; Xue et al. 2003). Resistenz gegenüber Staurosporin-vermittelter Apoptose wurde bei Bcl-X_L-Überexpression (Li et al. 2001), fehlender Bax-Aktivierung (Kashkar et al. 2002), Cyclooxygenaseinhibition (Moore et al. 1999) und Rad51-Überexpression (Kremer 2003) beobachtet. Wegen seiner Apoptose-auslösenden und wachstumshemmenden Eigenschaften dient Staurosporin als Prototypsubstanz zur Entwicklung möglicher Krebstherapeutika. Hier ist v. a. das Staurosporinanalogue UCN-01 durch seine antineoplastischen Eigenschaften in vitro und sein günstiges Toxizitätsprofil Kandidat für den klinischen Einsatz (Gescher 1998). Klinische Tests der Phase I sind inzwischen durchgeführt worden, dabei wurden erste Hinweise auf eine Wirksamkeit

gegenüber malignen Melanomen, besonders aber gegen alk-positive anaplastische großzellige Lymphome beobachtet (Sausville et al. 2001).

Eine direkte Wechselwirkung der Apoptosekaskade mit Rad51 bei Staurosporinexposition wurde von Flygare et al. gezeigt (Flygare et al. 2000). Darin wird eine durch aktivierte Caspase-3 vermittelte Degradation von Rad51 durch proteolytische Spaltung an den Erkennungssequenzen DVLD187↓N und AQVD274↓G beschrieben. Schon vorher konnten Huang et al. eine spezifische Rad51-Spaltung an der Erkennungssequenz DVLD187↓N durch Caspase-3 bei Exposition mit ionisierender Strahlung zeigen (Huang et al. 1999).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu Rad51-Veränderungen bei Exposition mit Doxorubicin und Staurosporin wiesen eine drastische Verminderung des Rad51-Proteingehalts innerhalb der ersten 4h nach. In den Untersuchungen der zugrunde liegenden Mechanismen der Rad51-Reduktion zeigte sich jedoch, dass zumindest im UiRad51-Zellsystem eine Caspase-3 Beteiligung unwahrscheinlich ist. Die Ergebnisse konnten zeigen, dass Caspase-3 erst frühestens 6h nach Kontakt mit Staurosporin aktiviert wurde, wohingegen Rad51 schon nach 4h auf nicht mehr nachweisbare Mengen abgesunken war. Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine Rad51-Überexpression eine Inhibition der proteolytischen Aktivität von Caspase-3 herbeiführt (vgl. 4.1). Somit ist wahrscheinlich, dass Rad51 bei Überexpression auch seinen eigenen Caspase-3 bedingten Abbau hemmt. Unterstützend ist weiterhin der Befund, dass auch in MCF7-Zellen, die einen Funktionsverlust in Caspase-3 aufweisen (Kurokawa et al. 1999), eine Abnahme des Rad51-Gehalts zu beobachten ist.

5.4 Mechanismen der Modulation des Rad51-Gehalts

In der vorliegenden Arbeit wurden RT-PCR-Untersuchungen der Rad51-mRNA durchgeführt, um die Frage zu klären, ob die beobachteten Veränderungen im Rad51-Proteingehalt durch die eingesetzten Gifte auf prinzipielle Änderung der mRNA-Expression zurückzuführen sind. Hier zeigte sich, dass bei 24h-Exposition mit Staurosporin oder Doxorubicin Rad51-mRNA noch deutlich nachweisbar war, obwohl auf Proteinebene schon nach 4h kein Rad51 mehr zu detektieren war. Die differenzierte Untersuchung der Rad51-mRNA zeigte ferner, dass bei Staurosporin- und Doxorubicinexposition sowohl endogene als auch exogene (Vektor-codierte) Rad51-mRNA deutlich nachweisbar waren, sodass eine spezifische Wechselwirkung des Gifts mit dem Expressionssystem auszuschließen ist. Dies sind

deutliche Hinweise darauf, dass die Modulation im Rad51-Gehalt durch Apoptosegifte nicht durch Änderung der Expression auf RNA-Ebene zustande kommt. Bei der Untersuchung der Rad51-mRNA unter 24h-Calicheamicinexposition zeigte sich keine mit der gesteigerten Rad51-Proteinmenge korrelierende, signifikante Zunahme der mRNA. Obwohl die RT-PCR nur im semi-quantitativen Ansatz durchgeführt wurde, könnte dies ein erster Hinweis auf eine mögliche posttranslationale Stabilisierung von Rad51 durch Calicheamicineinwirkung sein.

Die Ergebnisse der RT-PCR-Untersuchungen bei Exposition mit Staurosporin und Doxorubicin deuteten darauf hin, dass weniger eine Veränderung der Transkription, sondern vielmehr ein Mechanismus auf posttranskriptioneller Ebene für die Abnahme des Rad51-Proteingehalts verantwortlich ist. Eine induzierte proteasomale Degradation könnte die Halbwertszeit eines Proteins entscheidend verkürzen und bietet demnach eine Erklärungsmöglichkeit. In der Literatur wird zum Beispiel eine durch TGF- β induzierte Ubiquitylierung und proteasomale Degradation von Rad51 beschrieben (Kanamoto et al. 2002).

Proteasomen sind hochmolekulare Enzymkomplexe, die bis zu 1% des Gesamtproteinbestandes einer Zelle ausmachen und deren Aufgabe primär in der Degradation von Proteinen besteht (Alberts et al. 2002). Dabei erstreckt sich die Funktion der Proteasomen von der Beseitigung gealterter oder fehlerhaft gefalteter Proteine bis hin zur aktiven Modulation der Halbwertszeit bestimmter Proteine im Rahmen von Regulationsvorgängen, z. B. bei der Degradation von Cyclinen im Rahmen der Zellzyklusprogression (DeMartino und Slaughter 1999). Zentraler Bestandteil des Proteasomkomplexes ist das 20S-Proteasom, welches aus 28 Untereinheiten zusammengesetzt ist und mehrere katalytische Zentren zur vollständigen proteolytischen Degradation von Zielproteinen beinhaltet. Als aktiver Proteasomkomplex ist das 20S-Proteasom mit anderen Untereinheiten assoziiert, welche den Zugang zum katalytischen Zentrum regulieren. So ist typischerweise jeweils ein 20S-Proteasom mit zwei 19S-Untereinheiten assoziiert, um einen 2,1-Megadalton großen 26S-Holoenzymkomplex zu bilden (Adams et al. 1997). Der Großteil zellulärer Proteine, die einer proteasomalen Degradation zugeführt werden sollen, werden zunächst durch kovalente Bindung des kleinen Proteins Ubiquitin markiert. Dabei sorgt ein Enzymsystem bestehend aus Ubiquitin-aktivierendem Enzym (E1), Ubiquitin-konjugierendem Enzym (E2) und Ubiquitin-Protein Ligase (E3) für die kovalente Modifikation von Proteinen. Die Enzyme E2 und E3 existieren in mehreren verschiedenen Varianten und agieren im Heterodimerkomplex. Bisher sind ungefähr 300 verschiedene E2-E3-Komplexe bekannt (Alberts et al. 2002). Zusätzlich besitzen sie Domänen für regulatorische Faktoren. Dadurch kann

eine hohe, differenzierte Substratspezifität erreicht werden, weswegen die Ubiquitinylierung als übergeordneter Regulationsmechanismus der proteasomalen Degradation aufgefasst wird. Proteasomale Prozessierung ist jedoch nicht notwendigerweise ubiquitinabhängig. So wurde die Degradation von nicht-ubiquitinylierten Proteinen durch Proteasomen mehrfach nachgewiesen (DeMartino und Slaughter 1999). Es sind zudem mehrere Proteine charakterisiert, die strukturelle Ähnlichkeit zu Ubiquitin haben und somit auch als proteasomale Markierung dienen könnten, z. B. SUMO („small ubiquitin-like modifier“), FAT10 und NEDD8 (Kamitani et al. 1997; Su und Li 2002; Hipp et al. 2004).

Zur Untersuchung einer proteasomalen Beteiligung bei der Modulation des Rad51-Proteingehalts durch Apoptosegifte wurden in dieser Arbeit definierte Hemmstoffe des 20S-Proteasoms, Lactacystin (irreversible Hemmung) (Fenteany et al. 1995), MG-132 und ALLN (reversible Hemmung) (Rock et al. 1994), eingesetzt. Durch jedes der drei Proteasominhibitoren konnte eine Reduktion des Rad51-Proteinspiegels durch Staurosporin- und Doxorubicineinwirkung verhindert werden. Des Weiteren konnte auch in anderen Zelllinien als UiRad51, nämlich in der Parentallinie U2-OS, in den beiden Melanomzelllinien Sk-Mel und Meuro sowie den beiden Mammakarzinomzelllinien T47D und MCF7 ein Rad51-stabilisierender Effekt nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse belegen eindeutig die Beteiligung proteasomalen Abbaus bei der Modulation des Rad51-Gehalts durch Apoptose-induzierende Gifte. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass dieser Modulationseffekt offensichtlich unabhängig vom zellulären Hintergrund ist. Im Gegensatz zu Kanamoto et al., die unter TGF- β -Einwirkung eine Ubiquitinylierung von Rad51 nachwiesen, konnte in dieser Arbeit kein ubiquitinyliertes Rad51 nachgewiesen werden. Grund hierfür könnte ein anderer Signalweg zur proteasomalen Degradation unter Einfluss von Apoptosegiften sein als der bei TGF- β . Die Degradation durch Proteasomen ist nicht notwendigerweise an die Ubiquitinylierung von Zielproteinen gebunden (s. o.). Es konnte in der Vergangenheit unter anderem eine Assoziation zwischen Rad51 und SUMO nachgewiesen werden (Shen et al. 1996; Li et al. 2000). Eine nähere Untersuchung dieser Assoziationen hinsichtlich einer proteasomalen Markierung unter Einfluss von Apoptosegiften könnte weiteren Aufschluss über den genauen Abbauprozess von Rad51 ergeben. Zusätzliche Hinweise könnten zudem Untersuchungen zur Degradation von p21 liefern. So wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der p21-Gehalt von Apoptosegiften in gleicher Weise moduliert wie Rad51 (im folgenden Abschnitt besprochen).

5.5 Hinweise für die Induktion einer proteasomalen p21-Degradation durch Apoptosegifte

p21 ist primär als p53-abhängiger Regulationsfaktor des Zellzyklus bekannt (Li et al. 1994). Es wird dabei vor allem als Effektorprotein von p53 hinsichtlich der Auslösung eines Zellzyklusarrests beschrieben. p21 besitzt hierfür mehrere inhibitorische Interaktionsdomänen mit den Cyclinen-E und -D1 sowie der Cyclin-abhängigen Kinase 2 (CDK-2) (Chen et al. 1996). Die direkte Assoziation mit dem Faktor E2F unabhängig von der Bindung an Cyclin und CDK-2 scheint eine weitere Regulationsmöglichkeit des Zellzyklus durch p21 zu sein (Delavaine und La Thangue 1999). Neuere Ergebnisse zeigen jedoch, dass p21 auch an verschiedenen anderen Prozessen regulierend beteiligt ist, so z. B. in DNA-Synthese, Zelldifferenzierung und Apoptose (Dotto 2000). Auch direkte Verbindungen zwischen Rad51 und p21 sind in der Literatur beschrieben. So korreliert eine Rad51-Überexpression positiv mit einer gleichzeitig erhöhten p21-Expression, umgekehrt bewirkt eine Suppression der Rad51-Transkription auch eine Reduktion des p21-Proteingehalts (Raderschall et al. 2002). Rad51 kann zudem eine p53-unabhängige p21-Hochregulation bewirken (Kremer 2003), sodass offenbar eine enge Verschränkung zwischen Rad51-abhängigen Regulationsvorgängen und p21 vorliegt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen nicht nur bei Rad51, sondern in gleicher Weise auch bei p21 eine Absenkung des Proteingehalts bei Exposition mit Staurosporin und Doxorubicin. Analog zu Rad51 konnte durch Einsatz von Proteasominhibitoren die Abnahme von p21 verhindert werden.

In der Literatur wurde an mehreren Stellen eine Regulation des p21-Gehalts durch Ubiquitylierung und proteasomale Degradation beschrieben, z. B. im Rahmen der Keratinozytendifferenzierung (Di Cunto et al. 1998), innerhalb der Ras-Signaltransduktion (Coleman et al. 2003), unter UV-Bestrahlung innerhalb bestimmter Dosisbereiche (Bendjennat et al. 2003) und unter Einfluss von Stickstoffmonoxyd in glatten Gefäßmuskelzellen (Kibbe et al. 2000). p21 kann offenbar auch Ubiquitin-unabhängig der proteasomalen Degradation zugeführt werden. So kann MDM2 durch direkte Interaktion eine erleichterte Bindung von p21 an die C8-Untereinheit des 20S-Proteasoms herbeiführen und somit eine beschleunigte proteasomale Prozessierung bewirken (Touitou et al. 2001; Zhang et al. 2004).

Die Wahrscheinlichkeit ist daher hoch, dass auch p21 bei Einwirkung von Apoptosegiften einer proteasomalen Degradation unterworfen ist. Bei p21 gibt es in dieser Arbeit keinen Anhalt für eine Ubiquitylierung, sodass auch hier eine Ubiquitin-unabhängige proteasomale Degradation vermutet wird. Künftige Untersuchungen könnten hier Aufschluss

darüber geben, ob einerseits die durch MDM2 verursachte erleichterte Bindung von p21 an C8 auch für die induzierte p21-Degradation durch Apoptosegifte verantwortlich ist und ob dies andererseits auch einen möglichen Mechanismus für die induzierte Rad51-Degradation darstellt.

5.6 Mechanismen der Rad51-induzierten Apoptoseresistenz

Kremer konnte zeigen, dass eine Rad51-Überexpression ursächlich für eine Apoptoseresistenz verantwortlich ist und dass gleichzeitig durch die Überexpression eine Inhibition der Caspase-3 Aktivierung verursacht wird (Kremer 2003). Der genaue Mechanismus der Rad51-induzierten Resistenz ist nicht geklärt. Eine naheliegende Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass überexprimiertes Rad51 durch eine direkte Interaktion die Inhibition von Caspase-3 herbeiführt und dass die Inhibition der für die Apoptosekaskade zentralen Caspase-3 ursächlich für die Resistenz ist.

In dieser Arbeit konnte jedoch nachgewiesen werden, dass zu dem Zeitpunkt, an dem die Caspase-3 Aktivierung durch Apoptosegifte stattfindet, Rad51 nicht mehr nachweisbar war. Es liegt somit der Schluss nahe, dass Rad51 nicht direkt an der Inhibition von Caspase-3 beteiligt ist.

Diese Annahme wird durch weitere Ergebnisse dieser Arbeit gestützt, die belegen, dass eine Apoptoseresistenz noch in einem Zeitraum von 16 bis 40h nach einmaliger Überexpression von Rad51 und Rückkehr auf ein basales Expressionsniveau fortbesteht. Die Unabhängigkeit der Caspase-3-Inhibition bzw. Apoptoseresistenz von der direkten physischen Interaktion mit Rad51 impliziert, dass wahrscheinlich entweder ein Caspase-3 inhibierender Faktor zwischengeschaltet ist, der durch Rad51 aktiviert wird, oder dass die Caspase-3 Inhibition durch eine Rad51-vermittelte Inhibition übergeordneter Faktoren erreicht wird (Abb. 19).

Vorstellbar ist auch eine Koexistenz beider Wege. Aufgabe künftiger Untersuchungen wird es sein, Rad51-abhängige Effektoren zu identifizieren und Interaktionen zu charakterisieren. Die Literatur gibt Hinweise auf mögliche Kandidaten, so zeigten z. B. Husain et al., dass der Rad51-assoziierte Faktor BRCA1, welcher als ein zentraler Regulationsfaktor für verschiedene Prozesse wie Zellwachstum, DNA-Reparatur und Zellzyklusprogression angesehen wird (Deng und Brodie 2000), offenbar in MCF7 (Mammakarzinom)- und SKOV-3 (Ovarialkarzinom)- Zellen entscheidend für die Apoptoseresistenz gegenüber dem Zytostatikum Cis-Diaminodichloroplatin(II) (CDDP) ist (Husain et al. 1998).

Es bleibt jedoch offen, ob die Caspase-3 Inhibition überhaupt ursächlich für die Apoptoseresistenz durch überexprimiertes Rad51 ist oder nur ein Epiphänomen darstellt, da zumindest für Staurosporin und Doxorubicin gezeigt wurde, dass Apoptose auch unabhängig von Caspase-3 induziert wird (Cuvillier et al. 2001; Xue et al. 2003) (Abb. 19).

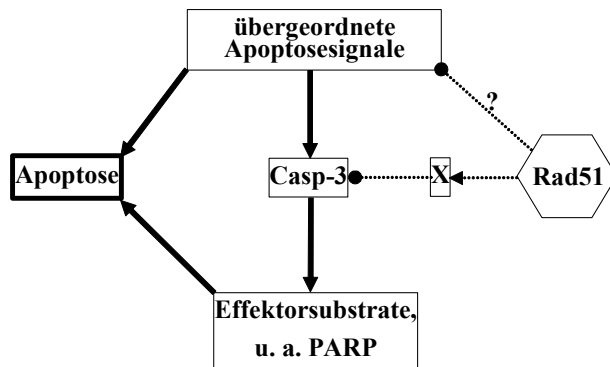


Abb. 19: Mögliche Rolle von Rad51 in der Induktion einer Apoptoseresistenz. Durchgezogene Linien – Effektorwege der Apoptose; gepunktete Linien – mögliche Inhibition durch Rad51; X – postulierter, zwischengeschalteter Faktor der Rad51-abhängigen Caspase-3 Inhibition; Casp-3 – Caspase-3.

5.7 Rad51 in der spezifischen Tumorthherapie - Ausblick

Die Vorteile neuer, spezifischer Tumorthapeutika bestehen vor allem in der Steigerung der Effizienz klassischer Chemotherapeutika in der Kombinationstherapie. Moderne Therapeutika werden spezifisch gegen verschiedene „molecular targets“, also spezifische krebsassoziierte Proteine, entwickelt. Einige sind schon zugelassen und versprechen zumindest in einem differenziert selektierten Patientenkollektiv eine effiziente und zugleich nebenwirkungsärmere Therapie. Bekannteste Vertreter dieser neuen Generation dürften zur Zeit das in der Mammakarzinomtherapie eingesetzte Trastuzumab (Herceptin[®], monoklonaler Antikörper gegen den wachstumsfördernden HER2-Rezeptor) und das bei der CML eingesetzte Imatinib (Gleevec[®], spezifischer Inhibitor des Philadelphiagenprodukts BCR-Abl) sein.

Da auch Proteine des DNA-Reparatursystems für Tumorprogression und besonders für Therapieresistenz verantwortlich sind, stellen sie vielversprechende Zielproteine in der Entwicklung therapeutischer Substanzen dar. Rad51 könnte demnach auch Kandidat eines Zielproteins für die Entwicklung spezifisch wirksamer Substanzen sein, besonders in bezug auf eine (Re-)Sensitivierung von etablierten Tumoren gegenüber DNA-schädigenden Zytostatika oder Bestrahlung.

So gibt es Hinweise, dass das Zytostatikum Gemcitabin (Gemzar[®]) durch spezifische Inhibition der HR eine Strahlensensitivierung herbeiführt, wobei Rad51 wahrscheinlich eine entscheidende Rolle spielt (Wachters et al. 2003). Auch Imatinib führt über die spezifische

Repression von Bcr-abl zur verminderten abl-abhängigen Rad51-Phosphorylierung. Dies führt offenbar zu Verlust der Rad51-abhängigen DNA-Reparatur und Sensitivierung gegenüber alkylierenden Substanzen wie Chlorambucil in CLL-Zellen (Aloyz et al. 2004) und zur Sensitivierung gegenüber Bestrahlung in Glioma-Zellen (Russell et al. 2003).

Aber auch die modernen Therapeutika sind nicht vor Resistenzerscheinungen sicher. So wird z. B. beim Einsatz des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib in der Therapie der CML besonders während der Blastenkrise über Resistenzerscheinungen berichtet (Roumiantsev et al. 2002; Daley 2003). Es könnte sich gegen hochspezifische Therapeutika sogar eher eine Resistenz ausbilden als gegen breit wirksame Zytostatika, denn selten lässt sich ein Tumor kausal auf ein oder wenige mutierte Gene zurückführen, wie dies im Falle der CML und dem Philadelphiachromosom der Fall ist. Meistens sind mehrere Mutationen in verschiedenen Genen nötig um einen stabilen Tumorklon zu etablieren (Vogelstein und Kinzler 1993). Selbst wenn nur ein entscheidendes Gen für den Tumor verantwortlich ist, können verschiedene Mutationen in diesem Gen auch ein unterschiedliches Ansprechen eines spezifischen, molekularen Therapeutikums bedeuten. Zusätzlich erschwerend ist die Tatsache, dass zelluläre Signalwege in außerordentlichem Maße komplex und teilweise redundant sind, sodass die Blockierung einzelner Proteine oder sogar Signalwege durch andere Signalwege umgangen werden kann. Somit ist es sehr unwahrscheinlich, dass in absehbarer Zeit ein spezifisches Medikament gegen eine Tumorerkrankung allein Heilung verschafft, vielmehr wird sich wahrscheinlich eine Kombinationstherapie aus klassischen und neuen, spezifischen Substanzen individualisiert auf Basis einer molekulargenetischen Tumorcharakterisierung etablieren.

Im Hinblick auf Rad51 und Apoptose-induzierende Zytostatika könnte dies auch basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit bedeuten, dass selbst wenn eine Substanz spezifisch die Rad51-Expression in Tumoren supprimiert, eine Zytostatikaresistenz besonders gegen Apoptosegifte erhalten bleibt. So könnten z. B. Mutationen in den noch unbekanntem nachgeschalteten Effektorproteinen, welche als eigentliche Faktoren die Apoptoseresistenz bewirken, zu einer von Rad51-unabhängigen Aktivität führen. Daher erscheint eine weitere Aufklärung des Rad51-abhängigen Resistenzmechanismus von Bedeutung.

6 Zusammenfassung

Rad51 ist einer der Schlüsselfaktoren bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) durch homologe Rekombination (HR). Die Überexpression von Rad51 führt in bestimmten Tumorzellen zur Resistenz gegenüber Zytostatika. Dabei erstreckt sich die Resistenzbildung sowohl auf direkt DSB-induzierende Zytostatika als auch auf solche, die nicht direkt mit der DNA interagieren. Während die Resistenz gegenüber DSB-induzierenden Zytostatika u. a. durch eine erhöhte DNA-Reparatur durch HR erklärt wird, ist der Mechanismus bei den anderen Zytostatika ungeklärt. In der Literatur gibt es Hinweise, dass DNA-schädigende Substanzen Veränderungen des Rad51-Gehalts induzieren. Des Weiteren wurde ein Caspase-3-abhängiger Rad51-Abbau während der Apoptose beschrieben.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss DSB-induzierender (Calicheamicin- γ 1) und Apoptose-auslösender (Staurosporin und Doxorubicin) Zytostatika auf den Gehalt an Rad51 und assoziierter Proteine wie p21 und p53 untersucht. Hierzu wurde das Zellsystem „UiRad51“ (Osteosarkomzelllinie) genutzt, welches induzierbar Rad51 überexprimiert. Die Ergebnisse zeigten bei der Exposition mit Calicheamicin- γ 1 in Rad51-überexprimierenden UiRad51-Zellen eine weitere Zunahme des Rad51-Gehalts, in anderen Zelllinien jedoch heterogene Veränderungen des Rad51-Proteinspiegels. Diese durch Calicheamicin- γ 1 verursachten Veränderungen der Rad51-Expression scheint daher vom zellulären Hintergrund abhängig zu sein. Die Exposition von UiRad51-Zellen mit Staurosporin oder Doxorubicin verursachte dagegen eine starke Abnahme des Rad51-Proteinniveaus. Diese Abnahme konnte auf eine Induktion des proteasomalen Abbauweges zurückgeführt werden, während die Caspase-3-abhängige Spaltung hier keine Rolle spielte. Die Transkriptionsrate wurde durch die Zytostatika nicht signifikant verändert. Dieser bisher nicht beschriebene Effekt der Apoptose-induzierenden Substanzen auf die Expression des Rekombinationsfaktor Rad51 konnte in verschiedenen Zelllinien reproduziert werden. Der Mechanismus scheint daher unabhängig vom zellulären Hintergrund zu sein.

Ferner wurde gezeigt, dass die durch überexprimiertes Rad51 erzeugte Resistenz gegenüber Apoptose-auslösenden Substanzen nicht an eine kontinuierlich hohe Rad51-Expression gebunden war, vielmehr reichte eine einmalige Rad51-Überexpression aus, um einen Resistenzeffekt auch nach Rückkehr auf ein basales Expressionsniveau zu erhalten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Einblick in bisher nicht beschriebene Mechanismen Zytostatika-assoziiierter Modulationen der Rad51-Expression. Zusätzlich werden neue Aspekte der Rad51-vermittelten Apoptoseresistenz aufgezeigt.

7 Literaturverzeichnis

- Adams GM, Falke S, Goldberg AL, Slaughter CA, DeMartino GN, Gogol EP: "Structural and functional effects of PA700 and modulator protein on proteasomes." *J Mol Biol* 273: 646-57 (1997).
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: "Molecular Biology of the Cell." Garland Science, New York (2002).
- Alexander WS, Bernard O, Cory S, Adams JM: "Lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice can involve ras mutations." *Oncogene* 4: 575-81 (1989).
- Aloyz R, Grzywacz K, Xu ZY, Loignon M, Alaoui-Jamali MA, Panasci L: "Imatinib sensitizes CLL lymphocytes to chlorambucil." *Leukemia* 18: 409-14 (2004).
- Anthony DA, McIlwrath AJ, Gallagher WM, Edlin AR, Brown R: "Microsatellite instability, apoptosis, and loss of p53 function in drug-resistant tumor cells." *Cancer Res* 56: 1374-81 (1996).
- Asakura T, Sawai T, Hashidume Y, Ohkawa Y, Yokoyama S, Ohkawa K: "Caspase-3 activation during apoptosis caused by glutathione-doxorubicin conjugate." *Br J Cancer* 80: 711-5 (1999).
- Barlow AL, Benson FE, West SC, Hulten MA: "Distribution of the Rad51 recombinase in human and mouse spermatocytes." *Embo J* 16: 5207-15 (1997).
- Bartke T, Siegmund D, Peters N, Reichwein M, Henkler F, Scheurich P, Wajant H: "p53 upregulates cFLIP, inhibits transcription of NF-kappaB-regulated genes and induces caspase-8-independent cell death in DLD-1 cells." *Oncogene* 20: 571-80 (2001).
- Bauer KH: "Mutationstheorie der Geschwulstentstehung." Berlin, Springer (1928).
- Baumann P, West SC: "Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair." *Trends Biochem Sci* 23: 247-51 (1998).
- Bello VE, Aloyz RS, Christodoulouopoulos G, Panasci LC: "Homologous recombinational repair vis-a-vis chlorambucil resistance in chronic lymphocytic leukemia." *Biochem Pharmacol* 63: 1585-8 (2002).
- Belmokhtar CA, Hillion J, Segal-Bendirdjian E: "Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms." *Oncogene* 20: 3354-62 (2001).
- Bendjennat M, Boulaire J, Jascur T, Brickner H, Barbier V, Sarasin A, Fotedar A, Fotedar R: "UV irradiation triggers ubiquitin-dependent degradation of p21(WAF1) to promote DNA repair." *Cell* 114: 599-610 (2003).
- Bertrand P, Lambert S, Joubert C, Lopez BS: "Overexpression of mammalian Rad51 does not stimulate tumorigenesis while a dominant-negative Rad51 affects centrosome fragmentation, ploidy and stimulates tumorigenesis, in p53-defective CHO cells." *Oncogene* 22: 7587-92 (2003).

- Bhalla KN: "Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis." *Oncogene* 22: 9075-86 (2003).
- Bos JL: "ras oncogenes in human cancer: a review." *Cancer Res* 49: 4682-9 (1989).
- Boveri T: "Zur Frage der Entstehung maligner Tumore." Jena, Gustav Fischer (1914).
- Branch P, Masson M, Aquilina G, Bignami M, Karran P: "Spontaneous development of drug resistance: mismatch repair and p53 defects in resistance to cisplatin in human tumor cells." *Oncogene* 19: 3138-45 (2000).
- Brantley-Finley C, Lyle CS, Du L, Goodwin ME, Hall T, Szwedo D, Kaushal GP, Chambers TC: "The JNK, ERK and p53 pathways play distinct roles in apoptosis mediated by the antitumor agents vinblastine, doxorubicin, and etoposide." *Biochem Pharmacol* 66: 459-69 (2003).
- Cejka P, Stojic L, Mojas N, Russell AM, Heinimann K, Cannavo E, di Pietro M, Marra G, Jiricny J: "Methylation-induced G(2)/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1." *Embo J* 22: 2245-54 (2003).
- Chae HJ, Kang JS, Byun JO, Han KS, Kim DU, Oh SM, Kim HM, Chae SW, Kim HR: "Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts." *Pharmacol Res* 42: 373-81 (2000).
- Chen AP, Grem JL: "Antimetabolites." *Curr Opin Oncol* 4: 1089-98 (1992).
- Chen G, Yuan SS, Liu W, Xu Y, Trujillo K, Song B, Cong F, Goff SP, Wu Y, Arlinghaus R, Baltimore D, Gasser PJ, Park MS, Sung P, Lee EY: "Radiation-induced assembly of Rad51 and Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl." *J Biol Chem* 274: 12748-52 (1999).
- Chen J, Saha P, Kornbluth S, Dynlacht BD, Dutta A: "Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1." *Mol Cell Biol* 16: 4673-82 (1996).
- Choi YH, Baek JH, Yoo MA, Chung HY, Kim ND, Kim KW: "Induction of apoptosis by ursolic acid through activation of caspases and down-regulation of c-IAPs in human prostate epithelial cells." *Int J Oncol* 17: 565-71 (2000).
- Christodoulopoulos G, Malapetsa A, Schipper H, Golub E, Radding C, Panasci LC: "Chlorambucil induction of HsRad51 in B-cell chronic lymphocytic leukemia." *Clin Cancer Res* 5: 2178-84 (1999).
- Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF: "Ras promotes p21(Waf1/Cip1) protein stability via a cyclin D1-imposed block in proteasome-mediated degradation." *Embo J* 22: 2036-46 (2003).
- Colussi C, Fiumicino S, Giuliani A, Rosini S, Musiani P, Macri C, Potten CS, Crescenzi M, Bignami M: "1,2-Dimethylhydrazine-induced colon carcinoma and lymphoma in msh2(-/-) mice." *J Natl Cancer Inst* 93: 1534-40 (2001).
- Cortellino S, Turner D, Masciullo V, Schepis F, Albino D, Daniel R, Skalka AM, Meropol NJ, Alberti C, Larue L, Bellacosa A: "The base excision repair enzyme MED1

- mediates DNA damage response to antitumor drugs and is associated with mismatch repair system integrity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15071-6 (2003).
- Cuvillier O, Nava VE, Murthy SK, Edsall LC, Levade T, Milstien S, Spiegel S: "Sphingosine generation, cytochrome c release, and activation of caspase-7 in doxorubicin-induced apoptosis of MCF7 breast adenocarcinoma cells." *Cell Death Differ* 8: 162-71 (2001).
- Daley GQ: "Gleevec resistance: lessons for target-directed drug development." *Cell Cycle* 2: 190-1 (2003).
- D'Atri S, Tentori L, Lacal PM, Graziani G, Pagani E, Benincasa E, Zambruno G, Bonmassar E, Jiricny J: "Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis." *Mol Pharmacol* 54: 334-41 (1998).
- Delavaine L, La Thangue NB: "Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1." *Oncogene* 18: 5381-92 (1999).
- DeMartino GN, Slaughter CA: "The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms." *J Biol Chem* 274: 22123-6 (1999).
- Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M, Fletcher JA, Silverman SG, Silberman SL, Capdeville R, Kiese B, Peng B, Dimitrijevic S, Druker BJ, Corless C, Fletcher CD, Joensuu H: "Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors." *N Engl J Med* 347: 472-80 (2002).
- Deng CX, Brodie SG: "Roles of BRCA1 and its interacting proteins." *Bioessays* 22: 728-37 (2000).
- Derynck R, Zhang YE: "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling." *Nature* 425: 577-84 (2003).
- Di Cunto F, Topley G, Calautti E, Hsiao J, Ong L, Seth PK, Dotto GP: "Inhibitory function of p21Cip1/WAF1 in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control." *Science* 280: 1069-72 (1998).
- Dotto GP: "p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle?" *Biochim Biophys Acta* 1471: M43-56 (2000).
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B: "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." *Cell* 75: 817-25 (1993).
- Fajac A, Benard J, Lhomme C, Rey A, Du villard P, Rochard F, Bernaudin JF, Riou G: "c-erbB2 gene amplification and protein expression in ovarian epithelial tumors: evaluation of their respective prognostic significance by multivariate analysis." *Int J Cancer* 64: 146-51 (1995).
- Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF: "The ABC of APC." *Hum Mol Genet* 10: 721-33 (2001).

- Fearon ER: "Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer." *Science* 278: 1043-50 (1997).
- Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ, Schreiber SL: "Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin." *Science* 268: 726-31 (1995).
- Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehme A, Christen RD, Howell SB: "The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance." *Cancer Res* 56: 4881-6 (1996).
- Flygare J, Armstrong RC, Wennborg A, Orsan S, Hellgren D: "Proteolytic cleavage of HsRad51 during apoptosis." *FEBS Lett* 427: 247-51 (1998).
- Flygare J, Hellgren D, Wennborg A: "Caspase-3 mediated cleavage of HsRad51 at an unconventional site." *Eur J Biochem* 267: 5977-82 (2000).
- Fojo T, Bates S: "Strategies for reversing drug resistance." *Oncogene* 22: 7512-23 (2003).
- Frankel AE, Schuster MW, Jurcic JG: "Novel therapeutics for chemotherapy-resistant acute myeloid leukaemia." *BioDrugs* 15: 55-71 (2001).
- Friesen C, Fulda S, Debatin KM: "Cytotoxic drugs and the CD95 pathway." *Leukemia* 13: 1854-8 (1999).
- Friesen C, Fulda S, Debatin KM: "Induction of CD95 ligand and apoptosis by doxorubicin is modulated by the redox state in chemosensitive- and drug-resistant tumor cells." *Cell Death Differ* 6: 471-80 (1999).
- Gamen S, Anel A, Perez-Galan P, Laserra P, Johnson D, Pineiro A, Naval J: "Doxorubicin treatment activates a Z-VAD-sensitive caspase, which causes deltapسيم loss, caspase-9 activity, and apoptosis in Jurkat cells." *Exp Cell Res* 258: 223-35 (2000).
- Gartel AL, Tyner AL: "The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis." *Mol Cancer Ther* 1: 639-49 (2002).
- Gescher A: "Analogues of staurosporine: potential anticancer drugs?" *Gen Pharmacol* 31: 721-8 (1998).
- Gullick WJ: "The role of the epidermal growth factor receptor and the c-erbB-2 protein in breast cancer." *Int J Cancer Suppl* 5: 55-61 (1990).
- Gurubhagavatula S, Liu G, Park S, Zhou W, Su L, Wain JC, Lynch TJ, Neuberger DS, Christiani DC: "XPD and XRCC1 genetic polymorphisms are associated with overall survival (OS) in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with platinum chemotherapy." *Proc Am Soc Clin Oncol* 22: 123 (2003).
- Hall AG, Tilby MJ: "Mechanisms of action of, and modes of resistance to, alkylating agents used in the treatment of haematological malignancies." *Blood Rev* 6: 163-73 (1992).

- Hansen LT, Lundin C, Spang-Thomsen M, Petersen LN, Helleday T: "The role of RAD51 in etoposide (VP16) resistance in small cell lung cancer." *Int J Cancer* 105: 472-9 (2003).
- Heisterkamp N, Jenster G, ten Hoeve J, Zovich D, Pattengale PK, Groffen J: "Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice." *Nature* 344: 251-3 (1990).
- Hengartner MO: "The biochemistry of apoptosis." *Nature* 407: 770-6 (2000).
- Henning W, Sturzbecher HW: "Homologous recombination and cell cycle checkpoints: Rad51 in tumour progression and therapy resistance." *Toxicology* 193: 91-109 (2003).
- Herr I, Wilhelm D, Böhler T, Angel P, Debatin KM: "Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis." *The EMBO journal* 16: 6200-8 (1997).
- Hickman MJ, Samson LD: "Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10764-9 (1999).
- Hipp MS, Raasi S, Groettrup M, Schmidtke G: "NEDD8 ultimate buster-1L interacts with the ubiquitin-like protein FAT10 and accelerates its degradation." *J Biol Chem* (2004).
- Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M: "Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53." *J Biol Chem* 277: 3247-57 (2002).
- Hortobagyi GN: "Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview." *Drugs* 54 Suppl 4: 1-7 (1997).
- Huang Y, Nakada S, Ishiko T, Utsugisawa T, Datta R, Kharbanda S, Yoshida K, Talanian RV, Weichselbaum R, Kufe D, Yuan ZM: "Role for caspase-mediated cleavage of Rad51 in induction of apoptosis by DNA damage." *Mol Cell Biol* 19: 2986-97 (1999).
- Husain A, He G, Venkatraman ES, Spriggs DR: "BRCA1 up-regulation is associated with repair-mediated resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II)." *Cancer Res* 58: 1120-3 (1998).
- Jackson SP: "Sensing and repairing DNA double-strand breaks." *Carcinogenesis* 23: 687-96 (2002).
- Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW: "Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy." *Cell* 108: 153-64 (2002).
- Kamitani T, Nguyen HP, Yeh ET: "Preferential modification of nuclear proteins by a novel ubiquitin-like molecule." *J Biol Chem* 272: 14001-4 (1997).
- Kanamoto T, Hellman U, Heldin CH, Souchelnytskyi S: "Functional proteomics of transforming growth factor-beta1-stimulated Mv1Lu epithelial cells: Rad51 as a target of TGFbeta1-dependent regulation of DNA repair." *Embo J* 21: 1219-30 (2002).

- Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, Resta D, Capdeville R, Zoellner U, Talpaz M, Druker B, Goldman J, O'Brien SG, Russell N, Fischer T, Ottmann O, Cony-Makhoul P, Facon T, Stone R, Miller C, Tallman M, Brown R, Schuster M, Loughran T, Gratwohl A, Mandelli F, Saglio G, Lazzarino M, Russo D, Baccarani M, Morra E: "Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia." *N Engl J Med* 346: 645-52 (2002).
- Kashkar H, Kronke M, Jurgensmeier JM: "Defective Bax activation in Hodgkin B-cell lines confers resistance to staurosporine-induced apoptosis." *Cell Death Differ* 9: 750-7 (2002).
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG: "Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis." *Cancer Res* 53: 3976-85 (1993).
- Kibbe MR, Nie S, Seol DW, Kovesdi I, Lizonova A, Makaroun M, Billiar TR, Tzeng E: "Nitric oxide prevents p21 degradation with the ubiquitin-proteasome pathway in vascular smooth muscle cells." *J Vasc Surg* 31: 364-74 (2000).
- Kremer T: "Auswirkungen einer Überexpression des Rekombinationsfaktors Rad51 auf Apoptose und Nekrose in Tumorzellen." Institut für Humangenetik, Universität zu Lübeck (2003).
- Kurokawa H, Nishio K, Fukumoto H, Tomonari A, Suzuki T, Saijo N: "Alteration of caspase-3 (CPP32/Yama/apopain) in wild-type MCF-7, breast cancer cells." *Oncol Rep* 6: 33-7 (1999).
- Laemmli UK: "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227: 680-5 (1970).
- Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC: "Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE." *Nature* 371: 346-7 (1994).
- Li W, Hesabi B, Babbo A, Pacione C, Liu J, Chen DJ, Nickoloff JA, Shen Z: "Regulation of double-strand break-induced mammalian homologous recombination by UBL1, a RAD51-interacting protein." *Nucleic Acids Res* 28: 1145-53 (2000).
- Li X, Marani M, Mannucci R, Kinsey B, Andriani F, Nicoletti I, Denner L, Marcelli M: "Overexpression of BCL-X(L) underlies the molecular basis for resistance to staurosporine-induced apoptosis in PC-3 cells." *Cancer Res* 61: 1699-706 (2001).
- Li Y, Jenkins CW, Nichols MA, Xiong Y: "Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21." *Oncogene* 9: 2261-8 (1994).
- Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K: "Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 712-20 (2003).
- Liu X, Chua CC, Gao J, Chen Z, Landy CL, Hamdy R, Chua BH: "Pifithrin-alpha protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H933-9 (2004).

- Lucci A, Han TY, Liu YY, Giuliano AE, Cabot MC: "Multidrug resistance modulators and doxorubicin synergize to elevate ceramide levels and elicit apoptosis in drug-resistant cancer cells." *Cancer* 86: 300-11 (1999).
- Maacke H, Jost K, Opitz S, Miska S, Yuan Y, Hasselbach L, Luttes J, Kalthoff H, Sturzbecher HW: "DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma." *Oncogene* 19: 2791-5 (2000).
- Maacke H, Opitz S, Jost K, Hamdorf W, Henning W, Kruger S, Feller AC, Lopens A, Diedrich K, Schwinger E, Sturzbecher HW: "Over-expression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer." *Int J Cancer* 88: 907-13 (2000).
- Marti TM, Kunz C, Fleck O: "DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways." *J Cell Physiol* 191: 28-41 (2002).
- Matsumoto H, Sasaki Y: "Staurosporine, a protein kinase C inhibitor interferes with proliferation of arterial smooth muscle cells." *Biochem Biophys Res Commun* 158: 105-9 (1989).
- Mazin AV, Alexeev AA, Kowalczykowski SC: "A novel function of Rad54 protein. Stabilization of the Rad51 nucleoprotein filament." *J Biol Chem* 278: 14029-36 (2003).
- Miyashita T, Reed JC: "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." *Cell* 80: 293-9 (1995).
- Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J: "Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells." *Cancer Res* 61: 4744-9 (2001).
- Moore RM, Lundgren DW, Moore JJ: "Cyclooxygenase inhibitors decrease apoptosis initiated by actinomycin D, cycloheximide, and staurosporine in amnion-derived WISH cells." *J Soc Gynecol Investig* 6: 245-51 (1999).
- Moroni MC, Hickman ES, Denchi EL, Caprara G, Colli E, Cecconi F, Muller H, Helin K: "Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53." *Nat Cell Biol* 3: 552-8 (2001).
- Mosmann T: "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65: 55-63 (1983).
- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM: "An induced proximity model for caspase-8 activation." *J Biol Chem* 273: 2926-30 (1998).
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, et al.: "Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis." *Nature* 376: 37-43 (1995).
- Nicolaou KC, Pitsinos EN, Theodorakis EA, Saimoto H, Wrasidlo W: "Synthetic calicheamicin mimics with novel initiation mechanisms: DNA cleavage, cytotoxicity, and apoptosis." *Chem Biol* 1: 57-66 (1994).

- No D, Yao TP, Evans RM: "Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3346-51 (1996).
- Omura S, Iwai Y, Hirano A, Nakagawa A, Awaya J, Tsuchya H, Takahashi Y, Masuma R: "A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization." *J Antibiot (Tokyo)* 30: 275-82 (1977).
- Osmak M, Brozovic A, Ambriovic-Ristov A, Hadzija M, Pivcevic B, Smital T: "Inhibition of apoptosis is the cause of resistance to doxorubicin in human breast adenocarcinoma cells." *Neoplasma* 45: 223-30 (1998).
- Panasci L, Xu ZY, Bello V, Aloyz R: "The role of DNA repair in nitrogen mustard drug resistance." *Anticancer Drugs* 13: 211-20 (2002).
- Patel KJ, Yu VP, Lee H, Corcoran A, Thistlethwaite FC, Evans MJ, Colledge WH, Friedman LS, Ponder BA, Venkitaraman AR: "Involvement of *Brca2* in DNA repair." *Mol Cell* 1: 347-57 (1998).
- Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D, Baly D, Baughman SA, Twaddell T, Glaspy JA, Slamon DJ: "Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment." *J Clin Oncol* 16: 2659-71 (1998).
- Pilch H, Weiss J, Heubner C, Heine M: "Differential diagnosis of keratoacanthomas and squamous cell carcinomas: diagnostic value of DNA image cytometry and p53 expression." *J Cutan Pathol* 21: 507-13 (1994).
- Raderschall E, Bazarov A, Cao J, Lurz R, Smith A, Mann W, Ropers HH, Sedivy JM, Golub EI, Fritz E, Haaf T: "Formation of higher-order nuclear Rad51 structures is functionally linked to p21 expression and protection from DNA damage-induced apoptosis." *J Cell Sci* 115: 153-64 (2002).
- Rebbaa A, Zheng X, Chou PM, Mirkin BL: "Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence." *Oncogene* 22: 2805-11 (2003).
- Robles AI, Bemmels NA, Foraker AB, Harris CC: "APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis." *Cancer Res* 61: 6660-4 (2001).
- Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL: "Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules." *Cell* 78: 761-71 (1994).
- Roumiantsev S, Shah NP, Gorre ME, Nicoll J, Brasher BB, Sawyers CL, Van Etten RA: "Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10700-5 (2002).
- Rowley JD: "Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining." *Nature* 243: 290-3 (1973).

- Russell JS, Brady K, Burgan WE, Cerra MA, Oswald KA, Camphausen K, Tofilon PJ: "Gleevec-mediated inhibition of Rad51 expression and enhancement of tumor cell radiosensitivity." *Cancer Res* 63: 7377-83 (2003).
- Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH: "Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein." *Curr Opin Cell Biol* 13: 332-7 (2001).
- Rybicki BA, Conti DV, Moreira A, Cicek M, Casey G, Witte JS: "DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and risk of prostate cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13: 23-9 (2004).
- Santoro M, Chiappetta G, Cerrato A, Salvatore D, Zhang L, Manzo G, Picone A, Portella G, Santelli G, Vecchio G, Fusco A: "Development of thyroid papillary carcinomas secondary to tissue-specific expression of the RET/PTC1 oncogene in transgenic mice." *Oncogene* 12: 1821-6 (1996).
- Sausville EA, Arbuck SG, Messmann R, Headlee D, Bauer KS, Lush RM, Murgu A, Figg WD, Lahusen T, Jaken S, Jing X, Roberge M, Fuse E, Kuwabara T, Senderowicz AM: "Phase I trial of 72-hour continuous infusion UCN-01 in patients with refractory neoplasms." *J Clin Oncol* 19: 2319-33 (2001).
- Selivanova G: "Mutant p53: the loaded gun." *Curr Opin Investig Drugs* 2: 1136-41 (2001).
- Sharan SK, Morimatsu M, Albrecht U, Lim DS, Regel E, Dinh C, Sands A, Eichele G, Hasty P, Bradley A: "Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2." *Nature* 386: 804-10 (1997).
- Shen Z, Pardington-Purtymun PE, Comeaux JC, Moyzis RK, Chen DJ: "UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins." *Genomics* 36: 271-9 (1996).
- Shinohara A, Ogawa T: "Homologous recombination and the roles of double-strand breaks." *Trends Biochem Sci* 20: 387-91 (1995).
- Slupianek A, Schmutte C, Tomblin G, Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Nowicki MO, Pierce AJ, Fishel R, Skorski T: "BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance." *Mol Cell* 8: 795-806 (2001).
- Stepczynska A, Lauber K, Engels IH, Janssen O, Kabelitz D, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K: "Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation." *Oncogene* 20: 1193-202 (2001).
- Sturzbecher HW, Donzelmann B, Henning W, Knippschild U, Buchhop S: "p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction." *Embo J* 15: 1992-2002 (1996).
- Su HL, Li SS: "Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins." *Gene* 296: 65-73 (2002).
- Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F: "Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺dependent protein kinase." *Biochem Biophys Res Commun* 135: 397-402 (1986).

- Tang D, Lahti JM, Kidd VJ: "Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis." *J Biol Chem* 275: 9303-7 (2000).
- Tarsounas M, Davies D, West SC: "BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci." *Oncogene* 22: 1115-23 (2003).
- Thakker RV: "Multiple endocrine neoplasia--syndromes of the twentieth century." *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2617-20 (1998).
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW: "A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis." *J Biol Chem* 272: 17907-11 (1997).
- Toft NJ, Winton DJ, Kelly J, Howard LA, Dekker M, te Riele H, Arends MJ, Wyllie AH, Margison GP, Clarke AR: "Msh2 status modulates both apoptosis and mutation frequency in the murine small intestine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3911-5 (1999).
- Tomblyn MR, Tallman MS: "New developments in antibody therapy for acute myeloid leukemia." *Semin Oncol* 30: 502-8 (2003).
- Touitou R, Richardson J, Bose S, Nakanishi M, Rivett J, Allday MJ: "A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome." *Embo J* 20: 2367-75 (2001).
- Tsang WP, Chau SP, Kong SK, Fung KP, Kwok TT: "Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis." *Life Sci* 73: 2047-58 (2003).
- Tsuzuki T, Fujii Y, Sakumi K, Tominaga Y, Nakao K, Sekiguchi M, Matsushiro A, Yoshimura Y, Morita T: "Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6236-40 (1996).
- Valerie K, Povirk LF: "Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair." *Oncogene* 22: 5792-812 (2003).
- Vogelstein B, Kinzler KW: "The multistep nature of cancer." *Trends Genet* 9: 138-41 (1993).
- Voller A, Bidwell DE: "Enzyme-immunoassays for antibodies in measles, cytomegalovirus infections and after rubella vaccination." *Br J Exp Pathol* 57: 243-7 (1976).
- Wachters FM, van Putten JW, Maring JG, Zdzienicka MZ, Groen HJ, Kampinga HH: "Selective targeting of homologous DNA recombination repair by gemcitabine." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57: 553-62 (2003).
- Wu Y, Mehew JW, Heckman CA, Arcinas M, Boxer LM: "Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells." *Oncogene* 20: 240-51 (2001).
- Wyke J (1997). *Viruses and Cancer. "Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer."* L. M. Franks, Teich, N. M. Oxford, Oxford University Press.

- Xu Z, Chen ZP, Malapetsa A, Alaoui-Jamali M, Bergeron J, Monks A, Myers TG, Mohr G, Sausville EA, Scudiero DA, Aloyz R, Panasci LC: "DNA repair protein levels vis-a-vis anticancer drug resistance in the human tumor cell lines of the National Cancer Institute drug screening program." *Anticancer Drugs* 13: 511-9 (2002).
- Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL: "Staurosporine-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: a distinction between caspase-3-dependent steps of apoptosis and the critical lethal lesions." *Exp Cell Res* 283: 135-45 (2003).
- Yang XH, Sladek TL, Liu X, Butler BR, Froelich CJ, Thor AD: "Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis." *Cancer Res* 61: 348-54 (2001).
- Zein N, Sinha AM, McGahren WJ, Ellestad GA: "Calicheamicin gamma II: an antitumor antibiotic that cleaves double-stranded DNA site specifically." *Science* 240: 1198-201 (1988).
- Zhang G, Yan G, Gurtu V, Spencer C, Kain SR: "Caspase inhibition prevents staurosporine-induced apoptosis in CHO-K1 cells." *Apoptosis* 3: 27-33 (1998).
- Zhang Z, Wang H, Li M, Agrawal S, Chen X, Zhang R: "MDM2 is a negative regulator of p21 WAF1/CIP1, independent of p53." *J Biol Chem* (2004).

8 Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Stürzbecher, sowie bei den Direktoren der Institute für Humangenetik, Herrn Prof. Dr. Schwinger, und Pathologie, Herrn Prof. Dr. Feller, bedanken für die Vergabe eines Dissertationsthemas und die Möglichkeiten und Mittel, dieses in den Laboratorien zu bearbeiten.

Ganz besonders herzlich danke ich Dr. Wilhelm Henning, der mich mit exzellentem Fachwissen und viel Geduld bei der Durchführung und beim Verfassen dieser Dissertation betreut hat.

Besonderer Dank gilt auch den Medizinisch-Technischen Laborassistentinnen Frau Beate Thode, Frau Vivian Sandberg und Frau Janine Pertack, die mir immer mit Rat und Tat bei technischen Fragen zur Seite gestanden haben.

Für das Korrekturlesen und besonders für die „seelische Unterstützung“ möchte ich mich bei Frau Dr. Ingrid Gauer bedanken.

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet, denen ich in besonderem Maße dafür danke, dass sie es mir ermöglichten, mein Studium mit Erfolg durchzuführen.

9 Lebenslauf

Tiantom Jarutat

*31. August 1976 in Bangkok, Thailand

Eltern: Patcharee und Walther Kaspar-Sickermann

Schulzeit:

1983-1987 Grundschule Wildschwanbrook, Hamburg

1987-1996 Kreisdgymnasium Bargteheide

1996 Abitur

1996-1997 Zivildienst am Kreiskrankenhaus Stormarn, Bad Oldesloe

Universität:

1997 Beginn des Medizinstudiums an der Medizinischen Universität zu Lübeck

1999 Ärztliche Vorprüfung

2000 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2002 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2003-04 Praktisches Jahr

2002-04 Promotion¹

2004 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Approbation zum Arzt im Praktikum

¹ Die praktischen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum Februar 2002 bis März 2004 durchgeführt.

Famulaturen/ PJ:

Monat/Jahr	Fach	Krankenhaus
März 2000	Innere Medizin	Medizinische Klinik, Borstel
März 2001	Chirurgie	Städt. Krankenhaus Süd, Lübeck
August 2001	Pädiatrie	St John's Hospital und Royal Hospital for Sick Children, Edinburgh, Schottland
März 2002	Allgemeinmedizin	Arztpraxis, Berlin
	Innere Medizin	Poliklinik für Hämatologie/Onkologie der Medizinischen Klinik I, Universitätsklinik Lübeck
März-Juli 2003	Chirurgie (PJ)	Sana Kliniken, Lübeck
August-Okt. 2003	Innere Medizin (PJ)	Concord Hospital, Sydney, Australien
Okt.-Nov. 2003	Innere Medizin (PJ)	Klinikum Neustadt in Holstein
Dez.-Feb. 2003/04	Pädiatrie (PJ)	Westküstenklinikum Heide