

Bedeutung von konstitutiv aktiviertem ERK1/2 und Galectin-3 für den malignen Phänotyp neuraler Tumorzellen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Andrea Mocigemba

aus

Viersen

Bonn 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Priv.-Doz. Dr. R. Probstmeier
2. Referent: Prof. Dr. E. A. Galinski

Tag der Promotion: 21. Dezember 2005

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert (2006).

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Charakteristika von Tumorzellen	1
1.1.1 Zelluläre Veränderungen von Tumorzellen	1
1.1.2 Molekulare Veränderungen von Tumorzellen	5
1.1.3 Charakteristika neuraler Tumore	9
1.2 ERK1/2 bzw. der Ras/MAPK-Signalweg	10
1.2.1 Der Ras/MAPK-Signalweg	10
1.2.2 Molekulare und zelluläre Effekte der ERK1/2-Aktivierung	11
1.2.3 Konstitutiv aktiviertes ERK1/2 in Tumorzellen	12
1.3 Galectin-3	13
1.3.1 Protein-/ Genstruktur:	13
1.3.2 Subzelluläres Expressionsmuster	14
1.3.3 Zelltypspezifische Expression und Expressionsregulation	14
1.3.4 Biologische Funktionen von Gal-3	16
1.4 Möglichkeiten zur Analyse von Proteinfunktionen	21
1.4.1 Beeinflussung der Proteinexpression	22
1.4.2 Beeinflussung von Signalwegen	23
1.5 Aufgabenstellung	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Antibiotika, Inhibitoren, Wachstumsfaktoren	25
2.1.2 Antikörper	25
2.1.3 Apoptoseinduktoren	25
2.1.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	26
2.1.5 Enzyme, Proteine, Peptide	26
2.1.6 Geräte	27
2.1.7 Häufig verwendete Lösungen	28
2.1.8 Kits und Assays	28
2.1.9 Primer	29
2.1.10 Vektoren und Plasmide	29
2.1.11 Zelllinien	30
2.2 Methoden	30
2.2.1 Zellkultur	30
2.2.2 Proteinanalytische Methoden	31
2.2.3 Nukleinsäureanalytische Methoden	32
2.2.4 Funktionsanalytische Methoden	35

3	<u>Resultate</u>	39
3.1	Bedeutung von aktiviertem ERK1/2 für neurale Tumorzellen	39
3.1.1	Expression von konstitutiv aktiviertem ERK1/2 in Gliomzelllinien	39
3.1.2	Bedeutung von konstitutiv aktiviertem ERK1/2 für die Proliferation neuraler Tumorzellen	41
3.1.3	Bedeutung von konstitutiv aktiviertem ERK1/2 für Zelladhäsion und –spreading	42
3.1.4	Bedeutung von konstitutiv aktiviertem ERK1/2 für die Migration neuraler Tumorzellen	43
3.2	Bedeutung von Gal-3 für neurale Tumorzellen	46
3.2.1	Herstellung und primäre Charakterisierung stabiler Zelllinien mit induzierbarer Gal-3-Expression	46
3.2.2	Einfluss von Gal-3 auf Differenzierungs-/ Proliferationsprozesse neuraler Tumorzellen	48
3.2.3	Einfluss von Gal-3 auf das Absterbeverhalten neuraler Tumorzellen	50
4	<u>Diskussion</u>	58
4.1	Bedeutung von aktiviertem ERK1/2 für neurale Tumorzellen	58
4.1.1	Konstitutive Aktivierung von ERK1/2 in Gliomzelllinien	58
4.1.2	Aktiviertes ERK1/2 fördert die Zellproliferation glialer Tumorzellen	60
4.1.3	Aktiviertes ERK1/2 erhöht das Migrationspotential glialer Tumorzellen	61
4.1.4	Aktiviertes ERK1/2 beeinflusst weder Zelladhäsion, noch Zellspreeding	62
4.2	Funktionelle Relevanz von Gal-3 in neuronalen Tumorzellen	63
4.2.1	Ektopisches Gal-3 hat keinen Einfluss auf Differenzierungs- und Proliferationsprozesse neuraler Zelllinien	63
4.2.2	Ektopisches Gal-3 hat primär kein antiapoptotisches Potential in neuronalen Tumorzellen	64
5	<u>Zusammenfassung</u>	71
6	<u>Literaturverzeichnis</u>	73
7	<u>Anhang</u>	86
7.1	Vektoren und Plasmide	86

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADP	Adenosintriphosphat
APAF	„apoptosome activating factor“
BA	„betulinic acid“
bp	„base pairs“
BSA	„bovine serum albumin“
C	Cytosin
CI	„collagen type I“
CIV	„collagen type IV“
cDNA	„complementary DNA“
CDK	„cyclin dependend kinase“
CMV	„cytomegaly virus“
CRD	„carbohydrate recognition domain“
ddH₂O	„doppelt“ destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DISC	„death inducing signaling complex“
DMEM	„dulbecco’s modified eagle’s medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„deoxyribonucleic acid“
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
ECL	„enhanced chemiluminescence“
ECM	„extracellular matrix“
EDTA	Ethylen-diaminotetraessigsäure
EGF	„epidermal growth factor“
ELISA	„enzyme linked immunosorbant assay“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	„extracellular signal regulated kinase“
EtOH	Ethanol
FADD	„Fas-associated death domain protein“
Fas-AB	„Fas-antibodies“
FCS	„fetal calf serum“
FLIP	„FLICE inhibitory protein“
FN	Fibronektin
G	Guanin
Gal 1-12	Galectin 1-12
Gal-3	Galectin-3
GAP	„GTPase-activating proteins“
GBM	„glioblastoma multiforme“
GEF	„guanin nucleotide exchange factor“
Gy	Gray
h	„human“
HDM2	„human double minute 2“
hyg	Hygromycin
IAP	„inhibitors of apoptosis proteins“
IGF	„insulin-like growth factor“
IgG	Immunglobulin der Klasse G
JG	Jones-Gal-3
JNK	„cJun-N-terminal kinase“
JTO	Jones-Tet-On
kb	„kilobase“
kD	kiloDalton
LB	Luria Broth
Ligase	T4-DNA-Ligase
LN	Laminin
m	milli
MAPK	„mitogen activated protein kinase“

MCS	„multiple cloning site“
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
Midipräp	DNA-Präparation in mittlerem-Format
Minipräp	DNA-Präparation in Mini-Format
MK	„MAPK activated kinase“
MLCK	„myosin light chain kinase“
MMP	„matrixmetalloproteinase“
MP	Milchpulver
mRNA	„messenger RNA“
n	nano
NGF	„nerve growth factor“
OV	Orthovanadat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	„phosphate buffered saline“
PCG	PC12-Gal-3
PCR	„polymerase chain reaction“
PDGF	„platelet-derived growth factor“
PEG	Polyethylenglycol
pERK	phosphoryliertes ERK
Pfu	Pfu-Polymerase
PI-3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	Peripheres Nervensystem
POD	Peroxidase
pRB	Retinoblastom-Protein
PtdIns(3,4,5)P₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PtdIns(4,5)P₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
r	Ratten
RNA	„ribonucleic acid“
RNAsin	Ribonukleaseinhibitor
rpm	„revolutions per minute“
RPMI	„Rosewell Memorial Park Institute“
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
rtTA	reverser tetracyclinabhängiger Transkriptionsaktivator
SBTI	Sojabohnen-Trypsininhibitor
SDS	„sodium dodecyl sulfate“
Sos	„son of sevenless“
SSP	Staurosporin
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Taq-Polymerase
Tet	Tetracyclin
TNF	„tumor necrosis factor“
TRAIL	„TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor“
TRE	„tet-responsive element“
u	„unit“
USB	„urea solubilisation buffer“
UTR	„untranslated region“
UV	Ultraviolett
v	Volumen
w	Masse
WHO	„world health organisation“
ZNS	Zentralnervensystem
β-ME	β-Mercaptoethanol
β-NGF	„nerve growth factor β“
μ	mikro

1 Einleitung

1.1 Charakteristika von Tumorzellen

1.1.1 Zelluläre Veränderungen von Tumorzellen

1.1.1.1 Zellwachstum

Das Zellwachstum metazoischer Organismen wird bestimmt durch eine sensible Regulation von Differenzierungsprozessen, Zellproliferation und programmiertem Zelltod (Apoptose). Im ausgewachsenen Organismus stehen Bildung und Absterben von Zellen im Gleichgewicht. Tumorzellen hingegen zeichnen sich durch ein unbegrenztes Wachstum aus, hervorgerufen durch Störungen oben genannter Regulationsmechanismen:

Differenzierung

Tumorzellen befinden sich, im Gegensatz zu den Zellen aus denen sie hervorgegangen sind, oft in einem undifferenzierten Zustand und durchlaufen permanent den Zellzyklus. Bislang ist wenig über die Prozesse bekannt, die eine Differenzierung von Tumorzellen verhindern. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass der Verlust der Zellzykluskontrolle zu einer Blockierung von Differenzierungsprozessen führt. Denkbar ist aber auch der umgekehrte Fall, dass Tumorzellen erst aufgrund blockierter Differenzierung in den Zellzyklus eintreten. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass bei der akuten myeloischen Leukämie die Mutation eines Transkriptionsfaktors für das Ausbleiben von Differenzierungsprozessen verantwortlich ist, wodurch die Entstehung maligner Zellen gefördert wird (Tenen, 2003). Darüber hinaus scheint es tatsächlich Schlüsselmechanismen zu geben, mithilfe der entschieden wird, ob Differenzierungs- oder Proliferationsprozesse eingeleitet werden (s. 1.1.2.1 c-myc).

Proliferation

Ursachen für die unkontrollierte Proliferation von Tumorzellen sind, neben dem Ausbleiben von Differenzierungsprozessen, Abnormalitäten mitogener Signalkaskaden (s. 1.1.2.2) und ein Verlust der Zellzykluskontrolle. Die Progression einer Zelle durch die Phasen des Zellzyklus (G(Gap)1, S(Synthese), G2 und M(Mitose)) wird durch ein kompliziertes Zusammenspiel von Zyklinen, Zyklin-abhängigen Kinasen (CDK: cyclin dependent kinase) und CDK-Inhibitoren reguliert. In Tumorzellen ist diese Regulation häufig durch einen oder mehrere Defekte dieser Regulatorproteine gestört, was dazu führt, dass die Zellen ununterbrochen den Zellzyklus durchlaufen (Dirks et al., 1997).

Apoptose

Eine weitere Ursache für das Zellwachstum von Tumoren ist das Ausbleiben von programmiertem Zelltod, der Apoptose. Die Apoptose dient unter anderem als Schutzmaßnahme gegen abnormale, genetisch defekte, nicht funktionierende oder schädliche Zellen (Jacobson et al., 1997). Da in einem Hauptteil dieser Arbeit der Einfluss von Gal-3 auf das apoptotische Absterben von Tumorzellen untersucht wurde, sollen die Signalwege der Apoptose hier ausführlicher dargestellt werden:

Initiatoren der Apoptose können intrinsischer oder extrinsischer Natur sein. Unabhängig vom Ursprung des auslösenden Signals folgt jedoch in der Regel die Aktivierung von spezifischen Apoptose-Enzymen, den Kaspasen.

Kaspasen sind Cysteinproteasen, die ausschließlich hinter bestimmten Aspartat-Resten spalten. Sie liegen in jeder Zelle als Zymogene (30 bis 50 kD) vor und bestehen aus drei Domänen: einer N-terminalen, nur in Prokaspasen vorkommenden Prodomäne und zwei weiteren Domänen, einer so genannten großen und einer so genannten kleinen Untereinheit. Bei Aktivierung werden die drei Domänen durch proteolytische Spaltung voneinander getrennt und es kommt zur Assoziation der großen und kleinen Untereinheit. Die so entstehenden Heterodimere bilden das aktive Enzym. Die Prozessierungsbereiche zwischen den Domänen repräsentieren Kaspase-Konsensussequenzen, eine Aktivierung von Kaspasen erfolgt demnach autokatalytisch oder durch Enzyme mit ähnlicher Spezifität (Thornberry und Lazebnik, 1998).

Man unterscheidet zwei Gruppen von Kaspasen: Initiator-kaspasen (Kaspase-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10 und -14) und Effektor-kaspasen (Kaspase-3, -6 und -7). Nach apoptotischen Stimuli kommt es zur Aktivierung der Proenzyme wobei die Aktivierung der Initiator-kaspasen durch Autoprozessierung erfolgt, die der Effektor-kaspasen hingegen durch andere Enzyme, einschließlich Initiator-kaspasen. Verlauf und Eigenschaften des apoptotischen Zelltods werden maßgeblich dadurch beeinflusst, welche der Initiator- und Effektor-kaspasen aktiviert werden und welche zellulären Substrate nachfolgend gespalten werden (Adams, 2003). Dies wiederum hängt vom jeweiligen Apoptose-Signalweg ab:

Rezeptorvermittelte Apoptose

Bei der rezeptorvermittelten Apoptose binden Liganden an sogenannte Todesrezeptoren der TNF- (tumor necrosis factor) Familie, wie z.B. CD95 (auch Fas genannt) und TRAIL-R (TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor). Die Bindung des Liganden auf der extrazellulären Seite dieser Transmembranproteine bewirkt intrazellulär die Bindung des Adapterproteins FADD (Fas-associated death domain protein). Der Komplex aus Ligand,

Rezeptor und FADD wird auch DISC (death inducing signalling komplex) genannt. DISC rekrutiert die Prokaspase-8 zum Rezeptor, wo sie durch Spaltung aktiviert wird. In sogenannten Typ-I-Zellen reicht die Kaspase-8-Aktivität aus, genügend Kaspase-3 zu aktivieren und so den Zelltod einzuleiten. In Typ-II-Zellen wird das Signal zusätzlich über den mitochondrialen Weg verstärkt: Kaspase-8 spaltet das proapoptotische Protein Bid, was dessen Translokation zum Mitochondrium bewirkt. Hier induziert Bid die Zytochrom-C-Freisetzung, was wiederum zur Aktivierung von Kaspase-3 führt. Anschließend werden weitere Effektorkaspasen aktiviert, die ihrerseits zelluläre Substrate spalten und so zum Tod der Zelle führen (Igney und Krammer, 2002).

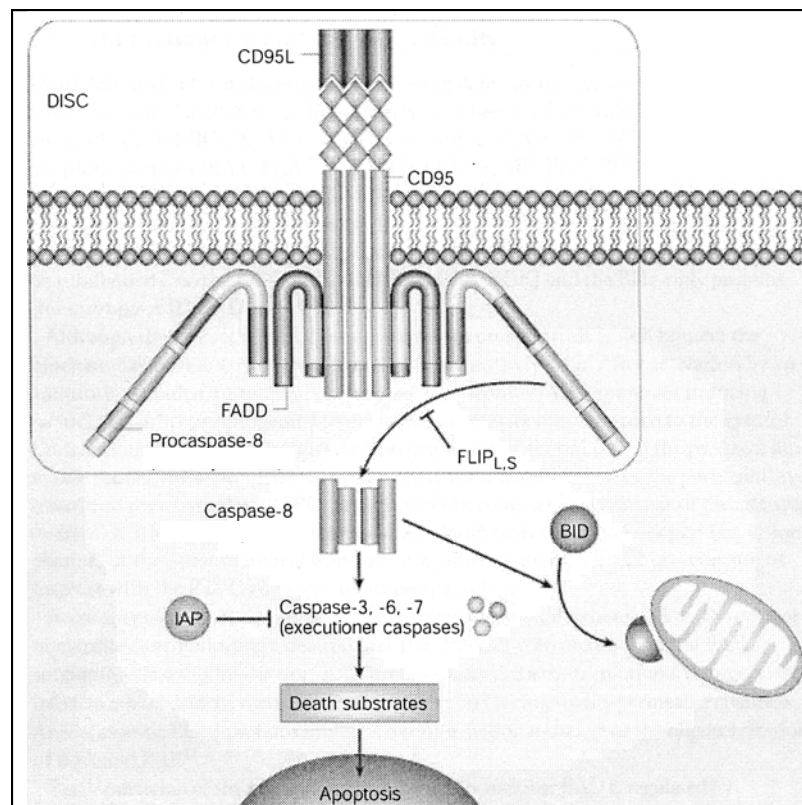


Abb. 1.1: Rezeptorvermittelte Apoptose

Bindung von Liganden an den Todesrezeptor (hier CD95/Fas) führt zur Bindung von FADD, Rekrutierung und Aktivierung von Prokaspase-8. Kaspase-8 aktiviert die Effektorkaspasen 3, 6 und 7, die zelluläre Substrate proteolytisch spalten und so die Apoptose einleiten. Kaspase-8 kann zusätzlich die Aktivierung der Mitochondrien durch Bid fördern. FLIPs (FLICE inhibitory proteins) können durch Bindung an DISC (death inducing signalling komplex) die Kaspase-8-Aktivierung verhindern, IAPs (inhibitors of apoptosis proteins) können Kaspasen inhibieren (nach Igney und Krammer, 2002).

Mitochondrialer Signalweg

Chemotherapie, Bestrahlung oder andere Stimuli können die Mitochondrien-vermittelte Apoptose einleiten. Proapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie (z.B. Bid, Bax, Bad, Bim) aktivieren Mitochondrien und bewirken so die Freisetzung von Zytochrom C. Zytochrom C

bindet an APAF1 (apoptosome activating factor 1), der so entstehende Komplex wird auch Apoptosom genannt. Das Apoptosom rekrutiert und aktiviert die Prokaspase-9, die ihrerseits wiederum Effektorkaspasen aktiviert (Igney und Krammer, 2002).

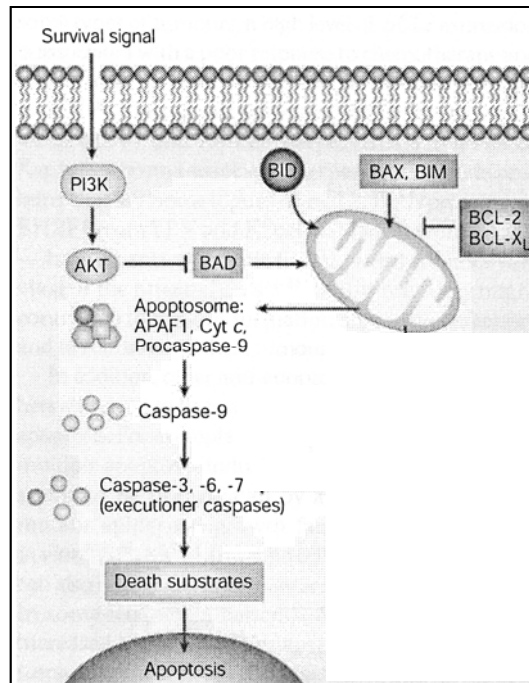


Abb. 1.2: Mitochondrienvermittelte Apoptose

Proapoptotische Mitglieder der Bcl2-Familie (Bad, Bid, Bax, Bim) aktivieren Mitochondrien. Freigesetztes Cytochrom-C bildet mit APAF1 das Apoptosom und aktiviert Kaspase-9. Kaspase-9 aktiviert Kaspase-3, -6 und -7, die zelluläre Substrate proteolytisch spalten und so die Apoptose einleiten. Mitochondrien-vermittelte Apoptose kann durch antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie (Bcl-2, Bcl-X_L) inhibiert werden. Auch durch Aktivierung der PI-3-K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) kann die Apoptose verhindert werden. PI-3-K aktiviert Akt, Akt inhibiert wiederum proapoptotisches Bad (nach Igney und Krammer, 2002).

Tumorzellen können aufgrund verschiedener molekularer Defekte resistent gegenüber apoptotischer Stimuli werden. Auf der einen Seite kann es zu einer Überexpression antiapoptotischer Proteine, wie z.B. IAPs (inhibitors of apoptosis proteins), Bcl-2 oder FLIP (s. Abb.1.1 und 1.2) kommen, andererseits zu einer Repression proapoptotischer Proteine, wie Bax, APAF oder CD95 (s. Abb.1.1 und 1.2).

1.1.1.2 Zellmotilität

Zu den zentralen Merkmalen maligner Tumore zählen ein infiltrierendes Zellwachstum und die Ausbildung von Metastasen. Schon 1914 erkannte Theodor Boveri die Bedeutung eines veränderten Adhäsionsverhaltens von Tumorzellen für die Malignität eines Tumors. Die Beobachtung, dass einzelne Tumorzellen primäre Tumore verlassen und in andere Gewebe metastasieren und die veränderte Interaktion von Tumorzellen mit Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) führten ihn zu der Annahme, dass Tumorprogression mit einer Veränderung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion einhergeht. Tatsächlich findet man in Tumorzellen molekulare Veränderungen, die ihr Migrationsverhalten beeinflussen, so z.B. (i) veränderte Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMP), (ii) veränderte Integrinexpression und/oder (iii) veränderte Signaltransduktion.

- (i) Migrierende Tumorzellen müssen eine Vielzahl physikalischer Barrieren überwinden, wie z.B. Basallaminae von Geweben und Blutgefäßen. Hierzu sezernieren sie Proteasen, meist MMPs, die Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) proteolytisch abbauen und so die Invasion der Tumorzellen ermöglichen (Geho et al., 2005).
- (ii) Integrine sind integrale Membranproteine, die Proteine der ECM binden, wodurch im inneren der Zelle Signale ausgelöst werden, die unter anderem zu einer Reorganisation des Zytoskeletts führen und somit migratorische Prozesse regulieren. Invasive Tumorzellen weisen nicht nur ein verändertes Integrinexpressionsmuster auf, die einzelnen Integrine haben zudem eine veränderte Affinität zu ECM-Substraten (Hood und Cheresch, 2002).
- (iii) Wie in Kapitel 1.1.2.2 noch ausführlich dargestellt wird, liegen in Tumorzellen häufig Abnormalitäten bei der Signaltransduktion vor. Einige solcher Signalkaskaden beeinflussen auch Proteine, die an Migrationsprozessen beteiligt sind. So kann z.B. die aktivierte MAPK (mitogen activated protein) ERK (extracellular signal regulated kinase) (s. 1.2) die MLCK (myosin light chain kinase) aktivieren, die ihrerseits über Myosinphosphorylierung das Migrationspotential von Tumorzellen zu steigern scheint (Tohtong et al., 2003).

1.1.2 Molekulare Veränderungen von Tumorzellen

1.1.2.1 Proteinexpression

Die Entstehung von Tumoren ist durch eine Akkumulation von genetischen Veränderung gekennzeichnet, wodurch es zu einer Modifikation des Proteinrepertoires einer Zelle kommt. Die Ursachen, die zu einer Veränderung der genetischen Information einer Zelle führen, sind unterschiedlich. So stellt man bei hereditären Erkrankungen eine vererbte Mutation in bestimmten Genabschnitten fest, die die Entstehung von Neoplasien begünstigt. Darüber hinaus können durch Umwelteinflüsse hervorgerufene Mutationen ein unkontrolliertes Zellwachstum hervorrufen, oder aber Gene werden durch Methylierung der DNA innerhalb von Promotorregionen „stillgelegt“, wodurch z.B. wachstumshemmende Proteine nicht mehr exprimiert werden (Hahn et al., 2002). Jedoch erst die Akkumulation vieler genetischer Veränderungen führen beim Menschen zur Ausbildung eines karzinogenen Phänotyps (Stevenson et al., 1986). Es zeichnet sich dabei ab, dass es „anfällige“ Schlüsselproteine gibt, bestimmte Proteine, die bei einer Vielzahl unterschiedlicher Krebserkrankungen mutiert sind und die Etablierung maligner Tumore begünstigen. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. Bei den Onkogenen handelt es sich um Gene, die für zellteilungsfördernde Proteine, bei den Tumorsuppressorgenen um solche, die für negative Regulatoren des Zellzyklus kodieren (Gibbs, 2003). Konsequenz der durch

Mutationen hervorgerufenen konstitutiven Expression der einen, bzw. reprimierten Expression der anderen ist demnach ein unkontrolliertes Zellwachstum. Die meisten Onkogene und Tumorsuppressorgene kodieren für Proteine, die man entweder den (I) Wachstumsfaktoren, (II) den Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, (III) intrazellulären Signalüberträgern oder den (IV) nukleären Transkriptionsfaktoren bzw. Proteinen, die die Transkription beeinflussen, zuordnen kann. Während Onkogene der Gruppen I-III in Kapitel 1.1.2.2 vorgestellt werden, soll hier auf einige, die Transkription beeinflussende Proteine, näher eingegangen werden:

Retinoblastoma-Protein (pRB)

Das Tumorsuppressorgen pRB ist ein zentrales Regulatorprotein im Zellzyklus. In seiner unphosphorylierten Form verhindert es den Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus, vermutlich durch Bindung an den Transkriptionsfaktor E2F, welcher die Aktivierung verschiedener Zellzyklusgene bewirkt (Knudson, 1993). Es sind verschiedene genetische und biochemische Veränderungen bekannt, die die pRB-Funktion beeinflussen; so wird das Protein (i) aufgrund von Mutationen nicht exprimiert, (ii) aufgrund von Mutationen in anderen Genen verstärkt abgebaut oder (iii) durch Störung der Phosphorylierungsreaktionen funktionsunfähig. Man nimmt an, dass bei der Mehrzahl menschlicher Krebserkrankungen die wachstumshemmende Wirkung von pRB gestört ist (Hahn et al., 2002).

p53

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein Schlüsselprotein, welches im Falle molekularer oder biochemischer Zellschäden einen Zellzyklusarrest bewirkt und, wenn es sich um irreparable Schäden handelt, Apoptose einleiten kann. Das TP53-Gen ist bei der Hälfte aller bekannten menschlichen Tumore mutiert, bislang sind 15000 Mutationen dieses Gens bekannt (Hahn et al., 2002). Ist das TP53-Gen nicht direkt betroffen, findet man häufig eine Überexpression von HDM2 (human double minute 2), einem p53-Antagonisten, oder wiederum eine Deletion oder Suppression des HDM2-Antagonisten p19ARF (Hahn et al., 2002).

c-myc

Das Onkogen c-myc codiert für einen Transkriptionsfaktor, welcher durch Bindung an den Transkriptionsfaktor Max die Zellproliferation fördert. Max kann alternativ an Transkriptionsfaktoren der Mad-Familie binden, wodurch die Differenzierung der Zelle ausgelöst wird. Bei Überexpression von Myc wird das Gleichgewicht zugunsten des Myc-Max-Komplexes verschoben, wodurch Differenzierungsprozesse unterbunden und die Zellteilung gefördert wird (Hanahan und Weinberg, 2000).

Neben klassischen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen gibt es viele weitere Proteine, die in Tumorzellen, im Vergleich zu deren „gesunden“ Gegenstücken, ein verändertes Expressionsniveau aufweisen. Eine Proteinklasse, die im Rahmen der Tumorgenese häufig Expressionsänderungen unterliegt, ist die der Galectine. Galectine gehören zur Familie der tierischen Lektine, sie binden β -Galaktosidische Zucker und ihnen werden multiple Funktionen zugesprochen. In Tumorzellen wird die Expression spezifischer Galectine häufig nach oben reguliert oder es kommt zu deren de novo Expression. Es ist allerdings auch der umgekehrte Fall, i.e. die Repression im Rahmen der Tumorentstehung bekannt. Oft korreliert die Änderung der Galectinexpression mit der Aggressivität eines Tumors und der Etablierung eines metastasierenden Phänotyps (Liu und Rabinovich, 2005). Ein in diesem Zusammenhang gut untersuchtes Galectin ist Galectin-3 (Gal-3) und wird, da zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit, in einem gesonderten Kapitel ausführlich beschrieben (s. 1.3).

1.1.2.2 Signalwege

In höheren Organismen werden zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Migration oder Apoptose über komplexe Netzwerke von Signaltransduktionswegen reguliert. Ausgehend von Initiator-molekülen, wie Hormonen oder Wachstumsfaktoren, werden über spezifische Rezeptoren intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, die unter anderem zur Aktivierung einer selektiven Genexpression führen und so das Zellverhalten kontrollieren. Sind Schlüsselproteine solcher Signalkaskaden defekt, kommt es zum Zusammenbruch der normalen Wachstumskontrolle und zur Entstehung eines Tumors. Exemplarisch soll hier die Störung von Signalwegen aufgrund (i) einer Disregulation der Expression von Rezeptoren und/oder deren Liganden und (ii) von Mutationen im Ras-Gen dargestellt werden.

(i) Rezeptoren/ Liganden:

Die Folgen einer Disregulation von Rezeptoren und deren Liganden soll am Beispiel der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) erläutert werden. RTKs, wie der NGF- (nerve growthfactor), der PDGF- (platelet-derived growth factor), der EGF- (epidermal growthfactor) und der IGF-I- (insulin like growth factor I) Rezeptor sind integrale Membranproteine. Sie können auf der extrazellulären Seite Wachstumsfaktoren binden, wodurch es zu einer Dimerisierung der Rezeptoren und daraus resultierend zu einer Aktivierung der Tyrosinkinase der intrazellulären Domäne kommt. Die Tyrosinkinase phosphoryliert den Rezeptor an spezifischen Tyrosinresten, die als Anheftungsstellen für bestimmte Effektormoleküle dienen, oder aber auch für Adaptermoleküle, die ihrerseits das Signal weiterleiten. Auf diese Weise wird ein Repertoire verschiedener, das Zellwachstum kontrollierender Kinasen aktiviert (Zwick et al., 2001). Bei vielen Tumoren konnten Mutationen unterschiedlicher RTK-Gene festgestellt

werden, was in Konsequenz zur konstitutiven, ligandenunabhängigen Aktivierung der Rezeptoren führt (Robertson et al., 2000; Ulrich et al., 1984). Ein weiterer Mechanismus ist die autokrine Aktivierung der Rezeptoren: Rezeptorliganden werden von der Tumorzelle selbst exprimiert und sezerniert, so gezeigt für den EGF- und den IGF-I-Rezeptor (Derynck et al., 1987; Kaleko et al., 1990). Resultat beider Abnormalitäten ist eine konstitutive Aktivierung mitogener Signalkaskaden.

(ii) Ras-Proteine

Ras-Proteine sind Schlüsselproteine der rezeptorvermittelten Signaltransduktion. Sie werden posttranslational farnesyliert, wodurch sie mit der Zellmembran assoziieren. Mitglieder der Ras-Superfamilie repräsentieren GTP-asen, Moleküle, die das Nukleotid Guanosintriphosphat zu Guanosindiphosphat hydrolysieren. Ras-Proteine sind nur im GTP-gebundenen Zustand aktiv und leiten keine Signale weiter, wenn GDP gebunden ist. Die Intensität eines Reizes hängt demnach von der Geschwindigkeit ab, mit der GTP hydrolysiert wird. Da Ras nur über eine sehr langsame GTPase-Aktivität verfügt und außerdem der Ras-GDP-Komplex sehr stabil ist, bedarf es weiterer regulatorischer Proteine, um eine effiziente Signalübertragung zu gewährleisten: GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) und Guanin-Nukleotid-Austauschproteine (GEFs). GAPs regulieren die Intensität der Signalübertragung negativ, indem sie GTP hydrolysieren und so die Zeitdauer der Aktivität und die Anzahl der aktiven Ras-Proteine vermindern. GEFs katalysieren den Austausch von Ras-gebundenem GDP gegen GTP, sind also Aktivatoren von Ras. Ein Beispiel für ein GEF ist das sogenannte mSos-Protein (Sos: son of sevenless), so benannt aufgrund seiner Homologien zum Sos-Austauschfaktor von *Drosophila* (Downward, 2003).

Nach Aktivierung von RTKs, wie z.B. dem EGF-Rezeptor, bindet das Adapterprotein GRB2 mit seiner SH2-Domäne an den autophosphorylierten Rezeptor. Mittels seiner SH3-Domäne rekrutiert es den GEF mSOS zur Zellmembran, wodurch dessen Reaktion mit Ras, i.e. der Austausch von Ras-gebundenem GDP mit GTP, ermöglicht wird (Downward, 2003).

So aktivierte Ras-Proteine haben viele mögliche Effektoren, die ihrerseits wieder unterschiedliche Signalkaskaden auslösen können. Einer dieser Signalwege ist der zellteilungsfördernde Ras/MAPK-Signalweg, der in Kapitel 1.2 ausführlich beschrieben wird. Ein weiteres Effektorprotein von Ras ist die PI-3-K. Durch Ras aktivierte PI-3-K katalysiert durch Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) die Bildung des Second-Messengers Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃). PtdIns(3,4,5)P₃ wiederum aktiviert eine große Zahl weiterer Proteine, so z.B. das antiapoptotisch wirksame Protein Akt (s. 1.1.1.1) (Downward, 2003). Seine regulatorische

Funktion im Rahmen von Proliferations- und Apoptoseprozessen macht Ras zu einem Protein mit hohem Transformationspotential. Tatsächlich findet man in ca. 20% aller menschlicher Tumore Mutationen im Ras-Gen, die sich alle im Verlust der GTPase-Aktivität des Ras-Proteins manifestieren und so die Akkumulation von konstitutiv aktivem Ras bewirken (Downward, 2003).

1.1.3 Charakteristika neuraler Tumore

Die meisten neuralen Tumore beim Erwachsenen sind glialen Ursprungs, das heißt sie gehen hervor aus den glialen Zellen des peripheren und des Zentralnervensystems (PNS, ZNS) und werden dementsprechend unter dem Begriff „Gliome“ zusammengefasst. Tumore des PNS sind überwiegend Neurofibrome und Schwannome, die des ZNS Astrozytome, Oligodendrogliome oder Oligoastrozytome. Gliome werden anhand histopathologischer Merkmale in WHO (world health organisation) Grad I-IV eingeteilt. Das WHO-Grad IV-Astrozytom - auch Glioblastom Multiform (GBM) genannt - ist einer der bösartigsten menschlichen Tumore mit einer mittleren Überlebensrate von weniger als einem Jahr. Die Charakteristika von Astrozytomen sollen im Kontext dieser Arbeit näher erläutert werden:

Astrozytome haben die Eigenschaft, das Gehirn zu infiltrieren und sind äußerst resistent gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie. Man unterscheidet zwei Formen von Glioblastomen, das primäre, spontan auftretende Glioblastom und das sekundäre, sich über einen Zeitraum von 5-10 Jahren aus einem niedriggradigen Astrozytom entwickelnde Glioblastom. Beiden gemeinsam ist eine zu 60% auftretende Mutation des TP53-Gens (Zhu und Parada, 2002).

Im Gegensatz zu vielen anderen Tumoren findet man bei Astrozytomen keine Mutationen im Ras-Gen. Allerdings scheinen hier andere Mechanismen zu einer Verstärkung mitogener Signalkaskaden zu führen. So findet man bei allen Klassen von Astrozytomen eine Hochregulierung des PDGF-Rezeptors und seines Liganden, was für eine permanente, autokrine Aktivierung spricht (Guha et al., 1995; Hermanson et al., 1992).

Des Weiteren findet man in Astrozytomen meist eine Funktionsstörung des pRB: in über 50% der Tumore erfolgt aufgrund verschiedener Defekte eine verstärkte Phosphorylierung des RB-Proteins, wodurch das Fortschreiten des Zellzyklus gefördert wird. Zu 14-33% beobachtet man einen totalen Verlust von pRB. Insgesamt weisen über 80% der Glioblastome eine Mutation in einem der pRB-kontrollierenden Gene auf (Zhu und Parada, 2002).

Zusätzlich zu den aufgeführten Veränderungen, die alle GBMs betreffen, findet man fast exklusiv für primäre GBMs eine Hochregulation von EGF und EGF-Rezeptor (40% der untersuchten Fälle) und einen Verlust des PTEN-Gens (30% der untersuchten Fälle) (Zhu und

Parada, 2002). Das PTEN-Gen kodiert für eine Protein-/Lipidphosphatase und scheint ein Tumorsuppressorgen zu sein, wobei der genaue Wirkmechanismus allerdings noch nicht geklärt ist.

Darüber hinaus findet man in Glioblastomen eine konstitutive Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen ERK1/2 und eine Neo-Expression von Gal-3. Auf diese Eigenschaften wird in den Kapitel 1.2 und 1.3 näher eingegangen.

1.2 ERK1/2 bzw. der Ras/MAPK-Signalweg

1.2.1 Der Ras/MAPK-Signalweg

Wie schon unter 1.1.2.2 beschrieben, kommt es bei Bindung von Liganden an RTKs zur Dimerisierung und Autophosphorylierung der Rezeptoren, Bindung von GRB2-mSOS-Komplex und Aktivierung von Ras durch Nukleotidaustausch.

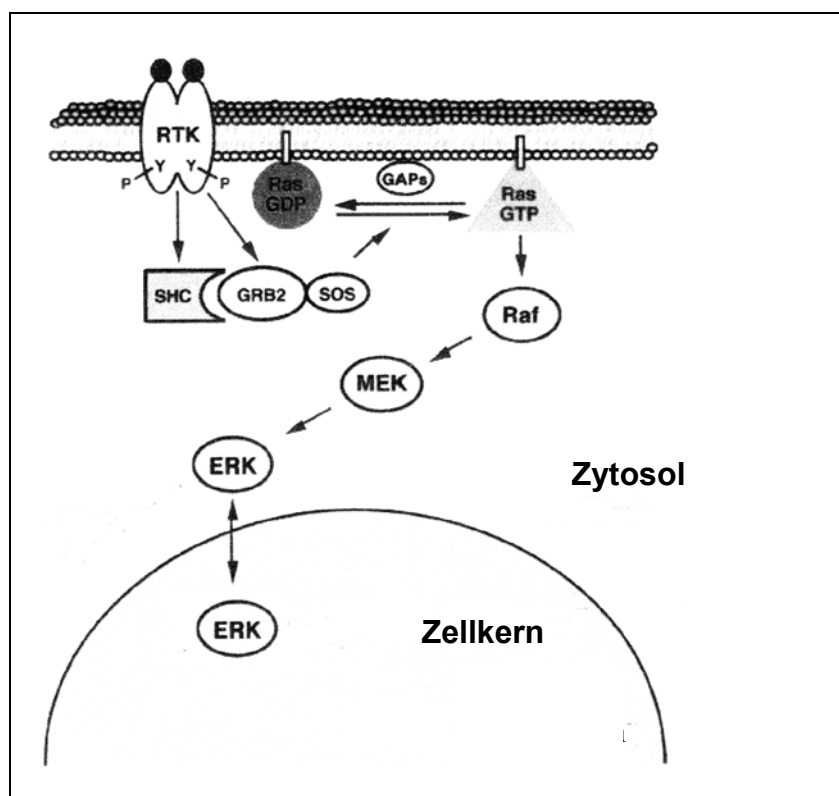


Abb. 1.3: Der Ras/MAPK-Weg

Durch Bindung des Grb2-mSos-Komplexes an dimerisierte und autophosphorylierte Rezeptortyrosinkinasen wird der Nukleotidaustausch am Ras-Protein ermöglicht. So aktiviertes Ras aktiviert die Kinase Raf. Diese aktiviert die MAPKK MEK, welche ihrerseits die MAPK ERK1/2 aktiviert. Aktiviertes ERK1/2 kann in den Zellkern translozieren.

Eine Proteinkinase, die durch Ras aktiviert wird, ist die Serin/Threonin-spezifische MAPKKK der Raf-Familie. Raf-Kinasen haben ihrerseits wieder viele Substrate. Ein Signaltransduktionsweg, der von NGF-, PDGF- und EGF-Rezeptoren ausgeht und über Ras- und Raf-Aktivierung verläuft, resultiert in einer Stimulierung der MAPK ERK1 und ERK2. In diesem Fall aktiviert die MAPKKK der Raf-Familie durch Phosphorylierung an zwei Serin-Resten die MAPKK MEK1/2, welche schlussendlich durch Phosphorylierung an Tyrosin- und Threoninresten die MAPK ERK1/2 aktiviert (Roux und Blenis, 2004). Zwar gibt es einige Differenzen in der Substratspezifität von ERK1 und ERK2, jedoch nimmt man an, dass sie funktionell redundant sind. Diese These wird auch durch die hohe Homologie in der Aminosäuresequenz dieser beiden Kinasen (83%) (Roux und Blenis, 2004) verstärkt.

1.2.2 Molekulare und zelluläre Effekte der ERK1/2-Aktivierung

Aktiviertes ERK1/2 kann durch Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten eine Vielzahl von Substraten in allen Zellkompartimenten aktivieren. Unter den ERK1/2-Substraten findet man Membranproteine (CD120a, Syk, Calnexin), Kernproteine (z.B. Elk-1, c-Fos, c-Myc, p53), Proteine des Zytoskeletts (Neurofilamente, Paxillin) und diverse MAPK-aktivierte Proteinkinasen (MKs) (Roux und Blenis, 2004). Dementsprechend beeinflusst aktiviertes ERK1/2 so vielfältige zelluläre Prozesse wie (i) Differenzierung, (ii) Proliferation, (iii) Apoptose und (iv) Zellmotilität.

(i) An verschiedenen Zellsystemen konnte gezeigt werden, dass Differenzierungsprozesse mit einer ERK1/2-Aktivierung einhergehen: In PC12-Zellen ist das NGF-induzierte Neuritenauswachsen ERK1/2-abhängig (Kuklinski et al., 2003). Das gleiche gilt für die Erythropoetin-induzierte Differenzierung von neuronalen Stammzellen in Astrozyten (Lee et al., 2004).

(ii) Ihren Namen, i.e. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen verdanken die Kinasen des Ras/MAPK-Signalwegs der Beobachtung, dass eine Stimulation von Zellen mit proliferationsfördernden Substanzen meist mit ihrer Aktivierung einhergeht. Es gibt Hinweise, dass ERK1/2 in verschiedenen Phasen des Zellzyklus aktiviert wird (Tamemoto et al., 1992) und möglicherweise den Übergang der Zelle von der G0-/G1- in die S-Phase fördert. Ein molekularer Erklärungsansatz ist die Aktivierung der Kinasen RSK1 und 2 durch ERK1/2. RSK1/2 wiederum inhibiert durch Phosphorylierung den CDK- (cyclin-dependent kinase) inhibitor p27kip1.

(iii) Neben der Proliferation scheint ERK1/2 auch das Überleben von Zellen zu fördern. Der ERK-Effektor RSK2 phosphoryliert, i.e. inaktiviert das proapoptotische Protein Bad und schützt so kortikale Neurone vor dem Zelltod (Bonni et al., 1999). Zwei weitere Studien

lassen vermuten, dass ERK1/2 über die Aktivierung von NF- κ -B antiapoptotische Signale aktiviert (Ghoda et al., 1997; Schouten et al., 1997).

(iv) Evidenzen für eine Beteiligung von ERK1/2 an Migrationsprozessen gibt es viele. So konnten z.B. Matsubayashi und Mitarbeiter (2004) zeigen, dass für die Epithelzellmigration während des Wundheilungsprozesses die Aktivierung von ERK1/2 erforderlich ist. Auch für viele Tumorzellen (Mammakarzinom-, Pankreaskarzinom-, Fibrosarkomzellen) wurde eine migrationsfördernde Wirkung von ERK1/2 gezeigt (Klemke et al., 1997; Krueger et al., 2001; Webb et al., 2000).

Ein so breites Wirkungsspektrum der MAPK ERK1/2 wirft die Frage auf, wie die Signale in die eine oder andere Richtung moduliert werden. Einen ersten Hinweis hierauf lieferten Qui und Mitarbeiter (1992), die zeigen konnten, dass die Dauer der ERK-Aktivierung ausschlaggebend dafür ist, ob PC12-Zellen proliferieren oder differenzieren. Diesbezüglich besteht jedoch noch Klärungsbedarf.

1.2.3 Konstitutiv aktiviertes ERK1/2 in Tumorzellen

In einer Vielzahl menschlicher Tumore, so z.B. in Kolon-, Lungen-, Nieren-, und Pankreastumoren, wurde die Präsenz von konstitutiv aktiviertem ERK1/2 nachgewiesen. (Hoshino et al., 1999). Meist erfolgt die Aktivierung der ERK-Kinasen durch MEK1/2, jedoch sind auch Fälle bekannt, wo es zu einer MEK-unabhängigen ERK-Phosphorylierung kommt (Barry et al., 2001). Zwar konnte aktiviertes ERK1/2 auch in Gewebeproben glialer Tumore nachgewiesen werden (Bhaskara et al., 2005; Marwin et al., 2003; Mandell et al., 1998), jedoch fehlen detaillierte Untersuchungen zur ERK1/2-Aktivierung und -Regulation in Gliomzellen. Erste Hinweise für eine konstitutive ERK-Aktivierung in Gliomzellen lieferten eigene Untersuchungen an U87MG- und A172-Glioblastomzellen, die unter normalen Kulturbedingungen ein hohes Expressionsniveau an phosphoryliertem ERK1/2 aufweisen (Mocigemba, 2001). Ob diese beiden Zelllinien repräsentativ für Gliomzellen sind und welche Mechanismen hier zu einer ERK1/2-Aktivierung führen, bleibt noch zu klären.

1.3 *Galectin-3*

Galectin-3 (Gal-3) gehört zur Familie der Galectine, einer Gruppe von Proteinen, die β -Galaktosidische Zucker erkennen, was durch eine evolutionär hoch konservierte Kohlenhydratbindungsdomäne (CRD; „carbohydrate recognition domain“) vermittelt wird, die aus etwa 130 Aminosäuren besteht (Barondes et al., 1984).

Man unterscheidet drei Typen von Galectinen: Prototyp-Galectine, Tandemtyp-Galectine und Chimärentyp-Galectine.

Prototyp-Galectine bestehen nur aus einer einzelnen CRD, haben ein Molekulargewicht (MG) von etwa 15 kD und liegen unter physiologischen Bedingungen entweder als Monomere oder als nicht-kovalent verbundene Homodimere vor.

Tandemtyp-Galectine bestehen aus zwei CRDs, die kovalent miteinander verknüpft sind. Ihr MG ist ungefähr doppelt so groß wie das von Prototyp-Galectinen.

Chimärentyp-Galectine bestehen aus zwei verschiedenen Domänen, der C-terminalen CRD und einer N-terminalen Domäne, die reich an Prolin-, Glycin- und Tyrosinresten ist (Kasai und Hirabayashi; 1996, Rabinovich 1999).

Von den 13 bislang im Menschen identifizierten Galectinen (Leffler et al., 2004) ist Gal-3 das einzige Chimärentyp-Galectin.

1.3.1 **Protein-/ Genstruktur:**

Gal-3 besteht aus einer C-terminalen, 135 Aminosäuren umfassenden CRD, einer kurzen N-terminalen Domäne, bestehend aus 20 Aminosäureresten und einer verbindenden Domäne, die wiederkehrende, jeweils aus neun Aminosäuren bestehende Sequenzen aufweist, die reich an Prolin, Glycin und Tyrosin sind. Die Anzahl dieser Sequenzen variiert von Spezies zu Spezies und so findet man Gal-3 mit MG von 26,2 kD beim Mensch bis zu 30,3 kD beim Hund (Barondes et al., 1994; Hughes, 1997). Die N-terminale Domäne enthält verschiedene Phosphorylierungsstellen (Ser⁶, Ser¹²) (Huflejt et al., 1993; Mazurek et al., 2000). Ein NWGR-Motiv (Asn-Trp-Gly-Arg) (s. 1.3.3) ist im humanen Gal-3 an Position 180-184 innerhalb der CRD lokalisiert.

Das Gal-3-Gen besteht aus 6 Exons und 5 Introns. Exon I enthält den grössten Teil der 5'-UTR (untranslated region), Exon II enthält den verbleibenden Teil der 5'-UTR, den Translationsstart sowie die kodierende Sequenz für die ersten 6 Aminosäuren des Proteins. Die repetitive N-terminale Domäne wird von Exon III kodiert, Exon IV, V und VI kodieren für die CRD (Hughes, 1994; Hughes et al., 1997).

1.3.2 Subzelluläres Expressionsmuster

Gal-3 zeigt wie alle Galectine die typischen Charakteristika eines zytosolischen Proteins. Es wird an freien Ribosomen synthetisiert und weist weder Transmembransequenzen, noch Signalsequenzen für einen Transfer in das endoplasmatische Retikulum (ER) auf. Dennoch findet man Gal-3 auch extrazellulär, was darauf hinweist, dass Gal-3 mittels Ektozytose – einem kürzlich entdeckten, noch nicht völlig verstandenen Sekretionsweg – freigesetzt wird. Immunzytochemische Untersuchungen haben ergeben, dass Gal-3 vor der Sekretion auf der zytosolischen Seite der Membran akkumuliert. Der nächste Schritt scheint eine Art umgekehrte Pinozytose zu sein, wobei die akkumulierten Proteine durch Membranausstülpungen umschlossen und extrazellulär als Vesikel abgeschnürt werden. Vermutlich ist die N-terminale Domäne des Gal-3-Moleküls essentiell für diesen Prozess: bei transfizierten Cos-Zellen, die nur die CRD von Gal-3 exprimieren, akkumuliert das Protein zwar an der Zellmembran, wird jedoch nicht sekretiert, während andere zytosolische Proteine, die mit der N-terminalen Domäne von Gal-3 fusioniert wurden, gut externalisiert werden. Noch nicht geklärt ist, ob die Freisetzung von Gal-3 aus den extrazellulären Membranvesikeln spontan erfolgt, oder ob hieran zusätzliche Moleküle beteiligt sind (Hughes, 1997; Nickel, 2003). Intrazellulär findet man Gal-3 sowohl im Zytoplasma als auch im Kern (Colnot et al., 1999; Craig et al., 1995; Kukliniski et al., 2000; Moutsatsos et al., 1986) und in Mitochondrienmembranen (Yu et al., 2002). Darüber hinaus scheint es im Kontext von Zellstatusveränderungen zu einer Translokation von Gal-3 zwischen den einzelnen Kompartimenten zu kommen (Agrwal et al., 1989; Yu, et al. 2002). Die Mechanismen, die zu solch einer Translokation führen, sind ungeklärt. Eine Beteiligung von N- und C-Terminus werden kontrovers diskutiert (Gaudin et al., 2000; Gong et al. 1999). Möglicherweise sind auch andere, mit Gal-3 interagierende Proteine an dessen „Shuttling“ beteiligt (Yu, et al., 2002).

1.3.3 Zelltypspezifische Expression und Expressionsregulation

Gal-3 wird in vielen Organen und Geweben, wie in Darm, Herz, Leber, Lunge, Milz, Muskel und Niere (Barondes et al., 1994; Kasai und Hirabayashi, 1996) von verschiedenen Zelltypen exprimiert. So findet man Gal-3 in aktivierten Makrophagen, Basophilen, Mastzellen, Osteoblasten, sowie auch in verschiedenen Epithelzellen (Chiariotti et al., 1999; Stock et al., 2003). Über die Regulationsmechanismen der Gal-3-Expression ist noch nicht viel bekannt. In neueren Studien konnten einige Signaltransduktionsmechanismen bzw. Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die an der Regulation der Gal-3-Expression

beteiligt sind: (i) In verschiedenen Zelltypen führt eine Stimulation mit Zytokinen zur Gal-3-Expression (Joo et al., 2001). Zytokine binden an Transmembranrezeptoren und aktivieren so Signalkaskaden im Zellinneren. (ii) In PC12-Zellen und Makrophagen ist der Ras/MAPK-Signaltransduktionsweg (s.o.) an der Gal-3-Regulation beteiligt (Kim, et al., 2003; Kuklinski et al., 2003). (iii) In Osteoblasten und in Gliomzelllinien wird die Gal-3-Genaktivität über den Transkriptionsfaktor Runx reguliert (Stock, et al., 2003; Vladimirova et al., zur Veröffentlichung eingereicht), (iv) es gibt Evidenzen für eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ -B an der Gal-3-Regulation (Dumic et al., 2000; Liu et al., 2004). Allerdings zeichnet sich ab, dass es keine allgemeingültigen Regulationsmechanismen gibt, sondern dass vielmehr eine zelltyp- und zellstatusspezifische Regulation der Gal-3-Expression erfolgt. So wird z.B. in Gliomzelllinien Gal-3 nicht über den Ras/MAPK-Weg reguliert (Mocigemba et al., 2001).

In verschiedenen Zelltypen wurde eine Änderung des Gal-3-Expressionsniveaus im Zusammenhang mit Zellstatusveränderungen beobachtet. So gibt es Evidenzen für eine Expressionsänderung dieses Proteins in Abhängigkeit von Änderungen des

(i) Proliferationsstatus:

3T3-Fibroblasten, die bei Serumentzug einem Proliferationsstopp unterliegen, weisen kein, bzw. nur geringe Mengen an Gal-3 auf. Nach Zellzyklusaktivierung durch Serumstimulation wird die Gal-3-Expression induziert (Agrwal et al., 1989);

(ii) Aktivierungsstatus:

Ruhende Mikroglia exprimieren kein Gal-3, aktivierte Mikroglia weisen ein hohes Gal-3-Niveau auf (Pesheva et al., 1998);

(iii) Differenzierungsstatus:

Stimuliert man PC12-Zellen mit NGF, was deren neuronale Differenzierung bewirkt, so kommt es zu einer Hochregulation der Gal-3-Expression (Kuklinski et al., 2003).

Darüber hinaus gehen viele Neoplasien einher mit einer veränderten Gal-3-Expression: Analysen von Tumorzelllinien ergaben erhöhte Gal-3-Level in Koloncarcinom-, Melanom- oder Sarkom-Zellen im Vergleich zu „normalen“ Kontrollzelllinien. Untersuchungen von Tumorgewebe ergaben erhöhte Expressionsraten in Kolon-, Magen- und Schilddrüsen-Karzinomen. Erniedrigte Gal-3-Konzentrationen wurden z.B. für bestimmte Tumoren von Ovarien, Prostata und Uterus nachgewiesen. Differenzierte Gal-3-Expressionsmuster findet man bei verschiedenen Formen des Lungenkrebses; so wird in Zellen und Gewebe von nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom Gal-3 exprimiert. Im Gegensatz dazu wurde in Proben der

aggressiveren Form, dem kleinzelligen Bronchialkarzinom, kein Gal-3 gefunden (Califice et al., 2004a).

Für die vorliegende Arbeit in besonderem Maße von Interesse ist das Expressionsmuster in Zellen und Tumoren des ZNS. Während man in „normalen“ Astrozyten und Oligodendrozyten bislang kein Gal-3 nachweisen konnte, findet man erhöhte Konzentrationen dieses Lectins in vielen Tumoren astrozytären oder oligodendrozytären Ursprungs. Besonders hohe Konzentrationen findet man in hochgradigen Gliomen und eine Korrelation von Malignität und Gal-3-Expression wird diskutiert (Bresalier et al., 1997). Übereinstimmend hiermit findet man auch in über 90% etablierter Glioblastomzelllinien konstitutiv exprimiertes Gal-3 (Kuklinski et al., 2000).

1.3.4 Biologische Funktionen von Gal-3

Gal-3 ist ein multifunktionelles Protein, das je nach Lokalisation und Bindungspartner unterschiedliche, teilweise sogar kontroverse Funktionen besitzt.

Gal-3 kann sowohl im monomeren Zustand vorliegen, als auch nicht-kovalent verknüpfte Multimere ausbilden. Vermutlich gibt es zwei unterschiedliche Arten von homophilen Bindungen, zum einen kommen sie durch Interaktionen von N-Termini (Hsu et al., 1992; Massa et al., 1993), zum anderen durch Interaktion von N-Terminus und CRD (Kuklinski und Probstmeier, 1998) zustande. Wie bei allen Galectinen ist die CRD von Gal-3 spezifisch für N-Acetyllaktosamine. Zwar erfolgt die Bindung hauptsächlich über den Galaktoserest solcher Moleküle, jedoch scheinen Wechselwirkungen mit anderen Molekülabschnitten die Affinität von Gal-3 zu beeinflussen. So zeigt Gal-3 eine hundertmal höhere Affinität zum Disaccharid Laktose ($\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$) als zu Galaktose (Barondes et al., 1994) und gesteigerte Affinität zu Zuckern, die bestimmte Modifikationen am nicht-reduzierenden Ende tragen (Hughes, 1997). Liganden von Gal-3 sind z.B. die ECM-Proteine Laminin, Fibronectin und Tenascin sowie die Membranproteine N-CAM und L1 (Probstmeier et al., 1995; Sato et al., 1992). Während die Bindung an diese extrazellulären Liganden CRD-vermittelt ist, vertreten einige Autoren die Ansicht, dass die meisten intrazellulären Funktionen von Gal-3 über Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelt werden (Liu et al., 2002). Für wichtige Funktionen wäre demnach nicht der Lektin-Charakter dieses Proteins ausschlaggebend. Hierfür stehen eindeutige Beweise jedoch noch aus.

Auf zellulärem Niveau ist primär zwischen (i) extra und (ii) intrazellulären Funktionen zu unterscheiden. (i) Extrazelluläres Gal-3 ist einerseits beteiligt an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen und weist andererseits Charakteristika eines Signalmoleküls auf, das

molekulare Änderungen im Inneren der Zelle auslöst. So bindet Gal-3 z.B. an IgE-Rezeptoren von Basophilen, was unter anderem die Freisetzung von Serotonin zur Folge hat (Truong et al., 1993; Zuberi, et al., 1994). Beispielhaft für seine teilweise sogar gegensätzlichen Funktionen ist die proliferationsteigernde Wirkung von extrazellulärem Gal-3 auf Fibroblasten einerseits (Inohara et al., 1998) und die Induktion apoptotischen Absterbens von T-Zellen andererseits (Fukumori et al., 2003). (ii) Intrazellulär ist Gal-3 beteiligt am Spleißen unreifer mRNA, hat Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus, der Zellproliferation und des apoptotischen Zelltods und scheint darüber hinaus in Differenzierungsprozessen involviert zu sein.

Entstehung und Ausdehnung maligner Tumore ist bestimmt durch Entdifferenzierung, verminderte Apoptosebereitschaft und unkontrolliertes Wachstum der entarteten Zellen. Für die im vorangegangenen Kapitel vorgestellte Veränderung der Gal-3-Expression im Zusammenhang mit Neoplasien ist demnach möglicherweise die Beeinflussung dieser Parameter durch Gal-3 von Bedeutung und soll im folgenden näher erläutert werden (zur Veranschaulichung s. Abb. 1.4):

Gal-3 und Proliferation

Mehrere Arbeiten zeigen eine positive Korrelation der Gal-3-Expression und erhöhten Proliferationsraten. So stimuliert Gal-3 die Proliferation von Fibroblasten (Agrwal et al., 1989; Inohara et al., 1998), während ein vermindertes Gal-3-Niveau in T-Lymphozyten mit verminderten Proliferationsraten einhergeht, und sogar zu einem Proliferationsstopp führen kann (Joo et al., 2001). Möglicherweise entfaltet Gal-3 seine proliferationsfördernden Eigenschaften im Zellkern, denn proliferierende 3T3-Fibroblasten weisen verstärkt nukleäres Gal-3 auf (Cowells et al., 1989; Harmann, et al. 1991; Hubert et al., 1995).

Gal-3 und Apoptose

Gal-3 gilt gemeinhin als antiapoptotisches Protein. Tatsächlich weisen verschiedene Zellen (i.e. Mammakarzinomzellen, Immunzellen, Blasenkarzinomzellen) die mit Gal-3-cDNA transfiziert wurden und dieses Protein konstitutiv exprimieren, eine verminderte Sensitivität gegenüber verschiedenen apoptoseinduzierenden Stimuli auf (i.e. Staurosporin, Fas-Antikörper, TRAIL, Cisplatin, Genistein, „Anchorage“-Verlust) (Akahani et al., 1997; Hoyer et al., 2004; Kim et al., 1999; Lin et al., 2000; Oka et al., 2005; Yang et al., 1998). Hsu und Mitarbeiter (2000) konnten zeigen, dass Makrophagen von Gal-3-defizienten Mäusen bei Gabe apoptosestimulierender Substanzen schneller absterben, als Makrophagen von Kontrolltieren.

Die Mechanismen, über die Gal-3 seine antiapoptotische Wirksamkeit entfaltet, sind noch nicht geklärt. Verschiedene Möglichkeiten werden diskutiert:

Interaktion mit Bcl-2

Gal-3 weist signifikante Sequenzhomologien zu Bcl-2, einem antiapoptotischem Protein auf. Es handelt sich hierbei um das NWGR-Motiv, welches in beiden Proteinen hochkonserviert ist. Mutationen innerhalb dieser Sequenz führen bei beiden zum Verlust der antiapoptotischen Wirksamkeit (Choi et al., 2004). Ob Gal-3 mit Bcl-2 interagiert, ist unbekannt. Bcl-2 transloziert in die Mitochondrienmembran, verhindert dort die Zytochrom C-Freisetzung und somit die Initiation intrazellulärer Apoptosesignalwege (s. Abschnitt 1.1.1.1). Auch für Gal-3 wurde eine Translokation in die Mitochondrienmembran und eine verminderte Zytochrom C-Freisetzung nach Inkubation mit verschiedenen Apoptosestimuli beobachtet (Yu et al., 2002). Inwieweit eine Interaktion dieser beiden Proteine dabei von Bedeutung ist oder sich beide nur ähnlicher Wirkmechanismen bedienen, bleibt noch zu klären. Erwähnenswert ist, dass die Translokation von Gal-3 in die Mitochondrienmembran scheinbar die Bindung an Synnexin erfordert (Yu et al., 2002).

Interaktion mit Alix1

In Jurkat-Zellen konnte eine Interaktion von Gal-3 mit Alix1, oder auch AIP1 (ALG2 interacting Protein 1) genannt, nachgewiesen werden (Liu et al., 2002). Dieses Protein bindet an ALG2 und scheint so dessen proapoptotische Funktion zu beeinflussen (Vito et al., 1999). Alix/AIP1 weist C-terminal Prolin-, Glycin-, Alanin und Tyrosin-reiche Sequenzen auf, die Sequenzhomologien zum N-Terminus des Gal-3-Moleküls aufweisen (Liu et al., 2002).

Interaktion mit CD95

Gal-3 scheint nicht nur den intrazellulären Apoptsesignalweg über die Zytochrom C Freisetzung aus Mitochondrien, sondern auch rezeptorvermittelte Apoptosesignale zu beeinflussen: Fukumori und Mitarbeiter (2004) zeigten, dass Gal-3 mit CD95 (s. 1.1.1.1) aus Extrakten einer Lymphoblastoidzelllinie koimmunpräzipitiert werden kann. Gal-3 wirkt hier nicht antiapoptotisch, scheint aber mitbestimmend dafür zu sein, welcher der möglichen nachgeschalteten Apoptosesignalwege aktiviert wird.

Beeinflussung „klassischer“ Signaltransduktionsmechanismen

Elad-Sfadia und Mitarbeiter (2004) fanden heraus, dass Gal-3 an K-Ras bindet und dessen Aktivierungszustand verlängert. Daraus resultierend kommt es zu einer verstärkten ERK1/2-Aktivierung, was wiederum antiapoptotisch wirken könnte (s. 1.2).

Darüber hinaus wurde in früher erwähnten Makrophagen Gal-3 defizienter Mäuse ebenfalls ein „knock down“ von JNK (cJun-N-terminal-Kinase) gezeigt, die erwiesenermaßen bei der

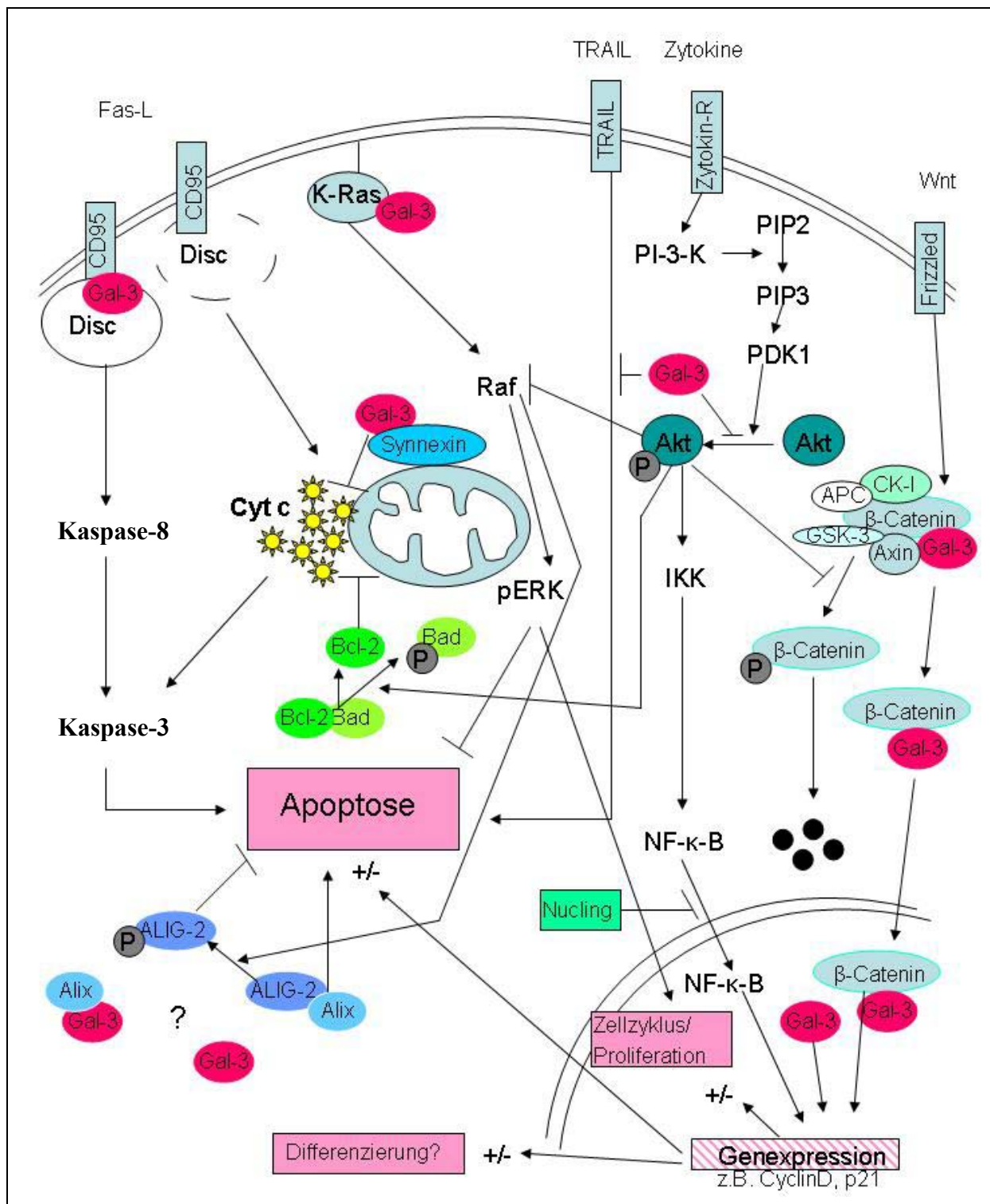


Abb. 1.4 Intrazelluläre Funktionen von Gal-3

Gal-3 beeinflusst zentrale, zelluläre Prozesse wie Apoptose, Proliferation/Zellzyklus und möglicherweise Differenzierung: Gal-3 beeinflusst die Apoptose durch Bindung an CD95, Schutz der Mitochondrienintegrität, Interaktion mit Alix, Inhibierung der Akt-Phosphorylierung, Bindung an K-Ras und Beeinflussung des TRAIL-Signalwegs. Gal-3 beeinflusst die Proliferation durch Bindung an K-Ras. Gal-3 wirkt auf den Zellzyklus durch Beeinflussung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und Änderungen der Genexpression.

Apoptoseregulation eine Rolle spielt. Möglicherweise kann Gal-3 den programmierten Zelltod über die Regulation dieses Signalwegs verhindern. Dies kann jedoch kein universeller Mechanismus sein, da andere Zelltypen der knock-out Mäuse sehr wohl JNK exprimieren (Liu et al., 2002).

Beeinflussung von Redoxsystemen

Aktuelle Studien lassen vermuten, dass Gal-3 intrazelluläre Redoxsysteme beeinflusst und so möglicherweise zur schnelleren Neutralisation freier Radikale führt. Dies wiederum stellt einer Schutzfunktion für das Transmembranpotential von Mitochondrien und für die Integrität von Nukleinsäuren dar (Lee et al., 2003; Matarrese et al., 2000).

Dass Gal-3 nicht weiterhin als - zumindest intrazellulär – rein antiapoptotisch wirksames Protein betrachtet werden kann, zeigten Lee und Mitarbeiter (2003): Die Gal-3-exprimierende Mammakarzinomzelllinie BT549 wies im Vergleich zur Mutterzelllinie eine eindeutig erhöhte Sensitivität gegenüber rezeptorvermittelter, TRAIL-induzierten Apoptose auf. Der zugrunde liegende Mechanismus ist möglicherweise eine Dephosphorylierung und somit Inaktivierung von Akt (s. Abschnitt 1.1.1.1 Abb. 1.2).

Gal-3 und Differenzierung

Einen direkten Beweis für eine Beteiligung von Gal-3 an Differenzierungsprozessen gibt es nicht, jedoch geht in verschiedenen Zellsystemen eine Differenzierung mit einer veränderten Gal-3-Expression einher: (i) Bei der Differenzierung humaner Monozyten zu Makrophagen kommt es zu einem Anstieg der Gal-3-Expression (Liu et al., 1995), (ii) Signale, die verhindern dass B-Zellen in Plasmazellen differenzieren, bewirken gleichzeitig eine de novo Gal-3-Expression (Acosta-Rodríguez et al., 2004), (iii) bei der NGF-vermittelten neuronalen Differenzierung von PC12-Zellen steigt die Gal-3-Expression signifikant an (Kuklinski et al., 2003) und (iv) bei der Differenzierung von HS-Zellen (HSC: „hepatic stellate cells“) in Myofibroblasten kommt es zu einer Gal-3-Neoexpression (Maeda et al., 2003). Einen weiteren Hinweis dafür, dass Gal-3 die Differenzierung von Zellen beeinflussen könnte, findet man in neueren Arbeiten von Shimura et al. (2004, 2005), in denen gezeigt wurde, dass Gal-3 als Bindungspartner von β -Catenin in den Wnt-Signalweg involviert ist, welcher wiederum eine wichtige Rolle bei Differenzierungsprozessen spielt.

Gal-3 und Zellzyklus

Bedeutsam für die drei bisher diskutierten Funktionsfelder Proliferation, Apoptose und Differenzierung ist sicherlich der kürzlich nachgewiesene Einfluss von Gal-3 auf den Zellzyklus bzw. auf die Expression zellzyklusspezifischer Gene: in Gal-3-exprimierenden BT549-Zellen sind die Proteinlevel von p21WAF1/CIP1, einem CDK-Inhibitor, und von

Zyklin D im Vergleich zu Kontrollzellen erhöht (Yoshii et al., 2002). „Anchorage“-Verlust (bzw. Inkubation mit Genistein) lassen Kontrollzellen apoptotisch absterben, während Gal-3-exprimierende Zellen unter weiterer Hochregulation von p21WAF1/CIP1 und Zyklin D (bzw. p21WAF1/CIP1) einen Zellzyklusarrest in der G1- (bzw. G2/M-) Phase erfahren, ohne jedoch apoptotisch abzusterben (Kim et al., 1999; Lin et al., 2000). Möglicherweise bewirkt Gal-3 durch direkten oder indirekten Einfluss auf zellzyklusspezifische Zykline und Inhibitoren die Überwindung apoptosesensitiver Punkte und so den Arrest in Zellzyklusphasen, in denen Zellen Apoptoseresistenz zeigen.

Lin et al. (2002) konnten weiterhin zeigen, dass Gal-3 in BT549-Zellen direkt die Promotoraktivität des Zyklin D1-Gens verstärkt, möglicherweise durch Stabilisation von DNA-Protein-Komplexen. Dies könnte ein Erklärungsansatz für die proliferationsfördernden Eigenschaften von Gal-3 darstellen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Gal-3 an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt ist, wobei die Lokalisation scheinbar eine wichtige Rolle bei der Modulation seiner Funktion spielt: (i) Gal-3 scheint im Zytoplasma Apoptose durch Beteiligung an verschiedenen Signalwegen zu verhindern (Alix1, K-Ras, JNK), zu modulieren (CD95) oder zu fördern (Akt), (ii) in Mitochondrienmembranen antiapoptisch zu wirken und (iii) im Zellkern die Proliferation und/oder den Zellzyklus zu beeinflussen.

1.4 Möglichkeiten zur Analyse von Proteinfunktionen

Nach der Entschlüsselung des Genoms steht heute die Aufklärung des funktionellen molekularen Netzwerks einer Zelle im Zentrum des wissenschaftlichen Interesses. Es gilt, die Funktion von Proteinen, die Bedeutung posttranslationaler Modifikationen, Auswirkungen von Protein-Protein-Interaktionen, sowie den komplexen Regelprozess des Proteinauf- und -abbaus aufzuklären. Mittels moderner Technologien ist es heute möglich, Proteome (Proteom = quantitative Gesamtheit der Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus) zu analysieren. Hierdurch ist es z.B. möglich, anhand von Referenz-Proteomen eine veränderte Proteinexpression im Rahmen verschiedener Krankheiten, oder nach Behandlung mit Medikamenten zu untersuchen. Ein wichtiges Instrument zur Analyse der Funktion von Proteinen in deren physiologischer oder pathophysiologischer Umgebung ist die lebende Zelle, i.e. die Zellkultur. Hier kann man, vor allem durch Manipulation des vorhandenen Proteinmusters, Rückschlüsse auf die zelluläre Bedeutung einzelner Proteine ziehen. Zwei Beispiele, die Überexpression von Proteinen und die Inhibierung von Signalwegen, sollen im folgenden Abschnitt beschrieben werden:

1.4.1 Beeinflussung der Proteinexpression

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, das Proteinmuster einer Zelle zu manipulieren: so kann man z.B. mittels Expressionsvektoren bestimmte Proteine von der Zelle de novo synthetisieren lassen (s.u.), oder umgekehrt mittels Antisensestrategien (Antisensevektoren oder siRNA (small interfering RNA)) die Expression eines zelleigenen Proteins reprimieren und hiernach die Auswirkungen auf das Zellverhalten oder die Expression anderer Proteine untersuchen. An dieser Stelle soll der besondere Fall einer regulierbaren Überexpression vorgestellt werden:

Das Tet-System

Um ein bestimmtes Protein von Säugetierzellen exprimieren zu lassen, bedient man sich sogenannter Expressionsvektoren. Es handelt sich hierbei um Plasmide, die über eine Promotorregion verfügen, die dem zu untersuchenden Gen vorgelagert ist. Expressionsvektoren können mittels verschiedener Methoden in die Zelle eingeschleust werden, wo sie im Idealfall ins Genom integriert werden. Aufgrund der vorgelagerten, starken Promotoren wird das zu untersuchende Gen konstitutiv von der Zelle transkribiert und translatiert. Solch eine Strategie ist jedoch kritisch, wenn z.B. zytotoxische Proteine untersucht werden sollen. Von Gossen und Bujard (1992, Gossen et al., 1995) wurde daher ein System entwickelt, bei dem eine Regulation der Genexpression möglich ist, das sogenannte Tet-Off- bzw. Tet-On-System:

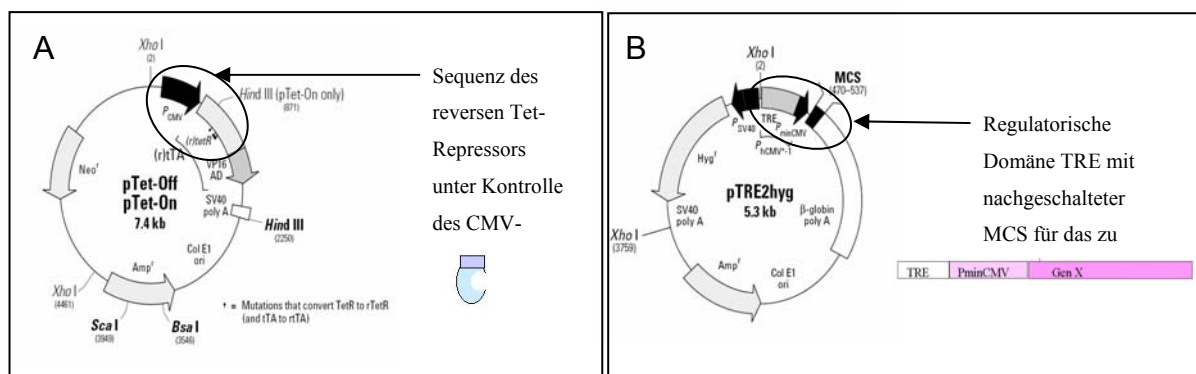


Abb 1.5: Die Plasmide des Tet-Systems

Das Plasmid pTet-On **(A)** enthält die cDNA für den reversen Tet-Repressor unter Kontrolle des CMV-Promotors. Das Plasmid pTRE2hyg-**(B)** enthält die regulatorische Domäne TRE und eine MCS (multiple cloning site) unter dem minimalen CMV-Promoter

Das Tet-Genexpressionssystem basiert auf dem *E. coli* Tetrazyklinresistenz-Operon. Es besteht aus zwei Komponenten, dem Regulator- und dem Antwort-Plasmid. Im Falle des in dieser Arbeit verwendeten Tet-On-Systems kodiert das Regulatorplasmid für einen reversen

Tet-Repressor, der unter Kontrolle eines CMV- (Zytomegalievirus) Promotors steht und somit konstitutiv exprimiert wird (s. Abb. 1.5 A). Das Antwort-Plasmid enthält die regulatorische Domäne TRE (tet-responsive Element), die den minimalen CMV-Promotor kontrolliert. Nachgeschaltet ist eine MCS, in die das zu untersuchende Gen kloniert wird (s. Abb. 1.5 B). In Anwesenheit von Tetrazyklin oder dessen Derivat Doxyzyklin (Dox) bindet der reverse Tet-Repressor an die regulatorische Domäne des Antwort-Plasmids (TRE), aktiviert den minimalen CMV-Promotor und initiiert so die Expression des zu untersuchenden Gens (s. Abb. 1.6).

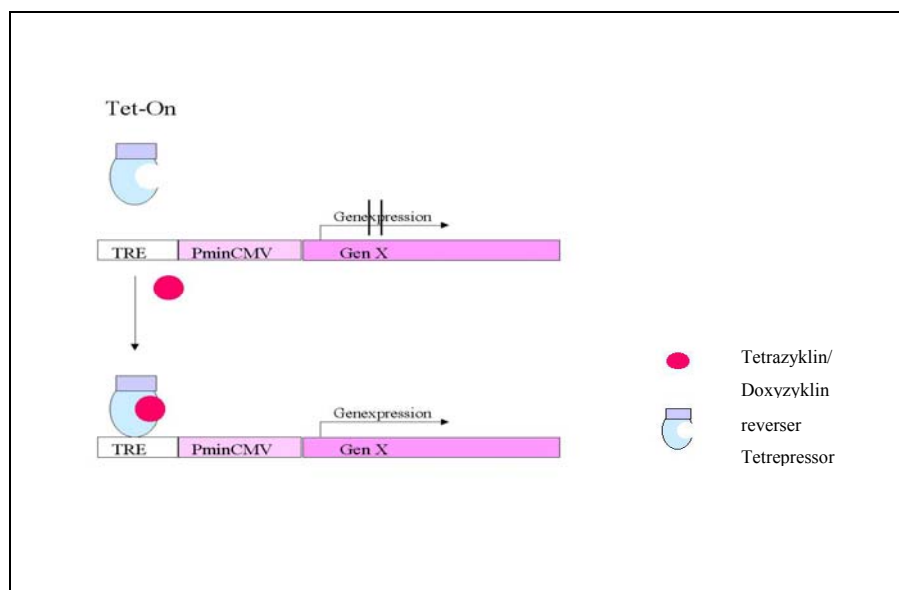


Abb. 1.6: Das Tet-On-System

In Anwesenheit von Tetrazyklin/ Doxyzyklin bindet der reverse Tet-Repressor an die regulatorische Domäne TRE (tet responsive element) und aktiviert so den minimalen CMV-Promotor. Das nachgeschaltete Gen wird transkribiert.

1.4.2 Beeinflussung von Signalwegen

Neben den Proteinexpressionsmustern bieten Proteinmodifikationen, i.e. Phosphorylierungen und somit Aktivierungszustände von Proteinen einen weiteren Ansatzpunkt zur Analyse des Zellverhaltens. So ist es z.B. möglich, mit Hilfe einer Reihe pharmakologischer Inhibitoren die Aktivierung verschiedener Proteine zu verhindern und somit nachgeschaltete Signalwege zu unterbrechen. Durch den zusätzlichen Einsatz phosphotyrosinspezifischer Antikörper können auf diese Weise die einzelnen Proteine eines Signalwegs immunochemisch identifiziert werden. Durch Untersuchung weiterer zellulärer Parameter können Aufschlüsse über die Wirkmechanismen solcher Signalkaskaden erhalten werden.

1.5 Aufgabenstellung

In vielen hochgradigen glialen Tumoren des ZNS findet man eine de novo Expression des tierischen Lectins Gal-3 und eine konstitutive Aktivierung der MAPK ERK1 und 2. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte analysiert werden, welche Relevanz diese beiden Proteine für den malignen Phänotyp neuraler Tumorzellen haben. Hierzu sollten in einem ersten Teil der Arbeit mittels Inhibierungsstudien der Einfluss von ERK1/2 auf Proliferation und Motilität von Gliomzelllinien analysiert werden. In einem zweiten Teil sollten Gal-3-überexprimierende neurale Zelllinien hergestellt werden, um die Funktionen von Gal-3 in diesem Kontext abzuklären. Hauptaugenmerk sollte hierbei auf der Beeinflussung apoptotischer Prozesse liegen, da Gal-3 gemeinhin als antiapoptotisch wirksames Protein gilt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika, Inhibitoren, Wachstumsfaktoren

Substanz	Bezugsquelle
Ampicillin	ICN MP Biomedicals, Irvine, USA
G418	PAA, Pasching, Österreich
Hygromycin	PAA, Pasching, Österreich
MEK-Inhibitor U0126	Promega, Madison USA
humaner Nervenwachstumsfaktor (β-NGF)	Tebu, Offenbach, Deutschland

2.1.2 Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle/ Referenz
α-PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase	Kaninchen	1:5000	Roche, Basel Schweiz
α-pERK1/2	phosphoryliertes ERK1/2	Maus	1:2000	CellSignaling, Beverly, USA
α-ERK1/2	ERK1/2	Kaninchen	1:1000	CellSignaling, Beverly, USA
α-rabbit-POD	Kaninchen IgG	Ziege	1:5000	Promega, Madison USA
α-mouse-POD	Maus IgG	Ziege	1:5000	Promega, Madison USA
CBP-35	Gal-3	Kaninchen	1:1000	Probstmeier et al., 1995

2.1.3 Apoptoseinduktoren

Substanz	Abkürzung	Wirkmechanismus	Bezugsquelle	Referenz
Betulinsäure	BA	Induktion mitochondrien-vermittelter Apoptose	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	Fulda et al., 1998
Staurosporin	SSP	unbekannt	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	Weil et al., 1996
Fas-Antikörper	Fas-AB	Induktion rezeptorvermittelter Apoptose	upstate, New York, USA	Weller et al., 1994

Zusätzlich zur Behandlung mit oben genannten Apoptoseinduktoren wurde der Zelltod durch Applikation von hochenergetischen Röntgenstrahlen induziert. Hierzu wurden die Zellen an einem Linearbeschleuniger Mevatron KD (Siemens, Erlangen, Deutschland) einem Strahl von 6MV hochenergetischer Photonen ausgesetzt. Die Feldgröße betrug 35 x 35cm und die Proben wurden in einem gewebeäquivalenten Festkörperphantom (RW3, PTW, Freiburg, Deutschland) jeweils im Dosismaximum des Photonenstrahls positioniert. Der Fokus-Haut-Abstand betrug 100cm. Der Strahl wurde gemäß DIN-Protokoll 6800-1 und 6847-5 auf Wasser-Energiedosis kalibriert. Der RBW (relative biologische Wirksamkeit)-Faktor für 6MV-Bestrahlungen beträgt 1, demnach war die Energiedosis äquivalent zur biologischen Dosis. An die Zellen abgegebene Energiedosen von 15Gy unterlagen einer Schwankungsbreite von weniger als 2%, die Dosis betrug 2Gy/min.

2.1.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Sofern nicht anders aufgeführt, wurden Chemikalien und Lösungsmittel von den Firmen Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), MP Biomedicals (Irvine, USA), Merck (Darmstadt, Deutschland), oder Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Es wurden ausschließlich Produkte vom Reinheitsgrad p.A. oder höher verwendet. Nicht gesondert aufgeführte Produkte für die Molekularbiologie sowie Primer wurden von Invitrogen (Carlsbad, USA) bezogen.

Reaktionsgefäße, Kulturflaschen, Petrischalen, Pipetten und andere Plastikmaterialien wurden, wenn nicht anders aufgeführt, von den Firmen Sarstedt (Nymbrecht, Deutschland), und Greiner (Frickenhäusen, Deutschland) bezogen.

2.1.5 Enzyme, Proteine, Peptide

Bezeichnung	Abkürzung	Bezugsquelle
Collagen Typ I	C I	Serva, Heidelberg, Deutschland
Collagen Typ IV	C IV	isoliert aus humaner Placenta (Probstmeier, et al., 1989)
Desoxyribonuklease	DNase	Promega, Madison, USA
Fibronectin	FN	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Laminin	LN	Gibco, Grand Island, USA
Pfu-Polymerase	Pfu	Fermentas, Vilnius, Litauen
Restriktionsendonukleasen	EcoRV ScaI XhoI	Fermentas, Vilnius, Litauen
reverse Transkriptase (Superscript II)		Invitrogen, Carlsbad, USA

Bezeichnung	Abkürzung	Bezugsquelle
Ribonuklease-Inhibitor	RNAsin	Promega, Madison, USA
T4-DNA-Ligase	Ligase	Fermentas, Vilnius, Litauen
Taq-Polymerase	Taq	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.6 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Bakterienschüttler	Certomat	B. Braun Biotech, Melsungen, Deutschland
Blotkammer		Feinmechanikerwerkstatt des Instituts für Physiologie, Biochemie und Hygiene der Tiere der Universität Bonn
Brutschrank	CB 150	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Digitalkamera	AxioCam	C. Zeiss, Jena, Deutschland
ELISA-Reader	Milenia KineticAnalyser	DPC, Bad Nauheim, Deutschland
Filmentwickler	X-Omat 5000RA	Kodak, Rochester, USA
Geldokumentationssystem	DigiGenius	Syngene, Cambridge, Gross Britannien
Gelelektrophoresekammer für die SDS-PAGE		Feinmechanikerwerkstatt des Instituts für Physiologie, Biochemie und Hygiene der Tiere der Universität Bonn
Gelelektrophoresekammer für die Nukleinsäure-Gelelektrophorese	GNA-100	Pharmacia Biotech, Uppsala Schweden
Heizblock	Uniteq HB 130	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Luminometer	Lumat LB9507	Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
Mikroskop	Axiovert 200	C. Zeiss, Jena, Deutschland
pH-Meter	MP 220	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
Photometer	GeneQuant	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Photometer	UV-2101 PC	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Power Supply	E844	Consort, Turnhout, Belgien
Power Supply	EPS 600	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Reinstwasseranlage	Milli-QBiocel	Millipore, Eschborn, Deutschland
Thermocycler	PTC-200	MJ Research, Watertown, USA
Wasserbad	006T	LAUDA, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zentrifuge	Labofuge 15R	Heraeus, Hanau, Deutschland

Gerät	Typ	Hersteller
Zentrifuge	MiniSpin Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.7 Häufig verwendete Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Anodenpuffer I für Western-Blot	300mM Tris, pH 10.4, 20% (v/v) MeOH
Anodenpuffer II für Western-Blot	25mM Tris, pH 10.4, 20% (v/v) MeOH
Kristallviolett-Färbelösung	PBS, 2% (w/v) Kristallviolett, 5% EtOH (v/v), 2% Formaldehyd (v/v)
Harnstoffprobenpuffer Komponente USBI	50mM Glucose, 25mM Tris-Hcl, pH 8, 10mM EDTA, 1mM PMSF
Harnstoffprobenpuffer Komponente USBII	50mM Tris-HCl, pH 6.8, 6M Harnstoff, 6% (v/v) β -ME, 3% (w/v) SDS, 0,003% (w/v) Bromphenolblau
Kathodenpuffer für Western-Blot	25mM Tris, pH 9.4, 40mM 6-Aminohexansäure, 20% (v/v) MeOH
Nukleinsäure-Probenpuffer	6% (v/v) Glycerin, 50mM EDTA, 0,001% (w/v) Bromphenolblau, 0,001% Xylenxanol (w/v)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	1,5mM KH ₂ PO ₄ , 2,5mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4, 150mM NaCl
SDS-PAGE-Laufpuffer	1,44% (w/v) Glycin, 0,303 (w/v) Tris, 0,1% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer	50mM Tris, pH 6.8, 6% (v/v) Glycerin, 1,5% (w/v) SDS, 0,2% (v/v) β -ME, 0,05% (w/v) Bromphenolblau
Solubilisierungspuffer	50mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ , pH 7.2, 100mM NaCl, 2mM EDTA, 4mM β -ME, 1% (v/v) Triton X-100, 1mM PMSF, 2 μ M SBTI, 1mM OV
TAE-Puffer	40mM Tris, 20mM Essigsäure, 1mM EDTA pH 8.0
TSS-Puffer	LB-broth, pH 6.1, 10% (w/v) PEG 8000, 5% (v/v) DMSO, 20mM MgSO ₄

2.1.8 Kits und Assays

Kit	Hersteller
ECL-Detection Kit	Pierce, Rockford, USA
EZNA Tissue DNA Kit	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Luciferase-Assay	Promega, Madison, USA
Maxipräp-Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
Minipräp-Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
PCR-Purification Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
Protein-Assay	BioRad, München, Deutschland
Superscript TM First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.9 Primer

Sequenzierungsprimer:

Zielgen	Sequenz
hGal-3	f: 5'-CTGATTGTGCCTTATAACCTGC-3' r: 5'-TGTTGTTCTCATTGAAGCGTGG-3'
rGal-3	f: 5'-ACTGGACCACTGACAGTGC-3' r: 5'-CTTCTGTTGTTCTCATTGAAGC-3'

PCR-primer:

Zielgen/ Name	Sequenz	Produktgröße
hGal-3	up: 5'-GCGGAAAATGGCAGACAAT-3' down: 5'-AATCTGCCCCCTTTCAGATTATA-3'	821bp
rGal-3	up: 5'-GCAGGAGGAGCACTAACCA-3' down: 5'-CACAGGGCAGTTCTGGTG-3'	948bp
rtTA	up: 5'-GTCGCTAAAGAAGAAAGGGAAACAC-3' down: 5'-TTCCAAGGGCATCGGTAAACATCTG-3'	530bp
hFas	up: 5'-TCCTACCTCTGGTTCTTACG-3' down: 5'-TTCATCCCCATTGACTGTGC-3'	215bp
rFas	up: 5'-CAAGTGCAGGTGCAAAGAAA-3' down: 5'-ATCTTGCTTCCGGGATCTT-3'	975bp

2.1.10 Vektoren und Plasmide

Bezeichnung	Zusammensetzung/ Vektorkarte	Bezugsquelle
E8pCD	s. 2.4.1.1	Albrandt et al., 1987
pOTB7-hGal-3	Sequenz GI 12654570 (hGal-3) kloniert in pOTB7	RZPD Deutsches Zentrum für Genomforschung GmbH, Berlin, Deutschland
pTRE2-hyg	s. 2.4.1.2	BD Biosciences, Palo Alto, USA
pTRE2-hyg-Luc	wie pTRE2-hyg mit 1649bp- Firefly Luciferase-Gen kloniert in MCS	BD Biosciences, Palo Alto, USA
pTet-On	s. 2.4.1.3	BD Biosciences, Palo Alto, USA
pTRE2-hGal-3	s. 2.4.1.4	PCR-Produkt hGal-3 aus p2ER- GFP-hGal-3 kloniert in pTRE2- hyg
pTRE2-rGal-3	s. 2.4.1.5	PCR-Produkt rGal-3 aus E8pCD kloniert in pTRE2-hyg

2.1.11 Zelllinien

Bezeichnung	Spezies/Typ	Bezugsquelle/ Referenz
A1207	Mensch/ Glioblastom	etabliert von Dr S.A. Aaronson Mount Sinai Medical Center, New York, USA
A172	Mensch/ Glioblastom	Giard et al., 1973
Bcl2	Ratte/ PC12-Tet-On mit induzierbarem Bcl2	Schwarz et al., 2001
C6	Ratte/ Glioblastom	Benda et al., 1968
JG11	Mensch/ Glioblastom-Tet-On mit induzierbarem Gal-3	JTO transfiziert mit pTRE2-hyg- hGal-3
JG7	Mensch/ Glioblastom-Tet-On mit induzierbarem Gal-3	JTO transfiziert mit pTRE2-hyg- hGal-3
JG9	Mensch/ Glioblastom-Tet-On mit induzierbarem Gal-3	JTO transfiziert mit pTRE2-hyg- hGal-3
JTO	Mensch/ Glioblastom mit Tet- On-Vektor	SK-MG-5 transfiziert mit pTet- On
Jurkat	Mensch/ T-Zellen	Schneider et al., 1977
PCG22	Ratte/ Phäochromozytom PC12-Tet-On mit induzierbarem Gal-3	PC12-Tet-On transfiziert mit pTRE2-hyg-rGal-3
PCG24	Ratte/ Phäochromozytom PC12-Tet-On mit induzierbarem Gal-3	PC12-Tet-On transfiziert mit pTRE2-hyg-rGal-3
SK-MG-15 (Harmon)	Mensch/ Glioblastom	Jennings et al., 1989
SK-MG-4 (Becker)	Mensch/ Glioblastom	Jennings et al., 1989
SK-MG-5 (Jones)	Mensch/ Glioblastom	Jennings et al., 1989
TC620	Mensch/ Oligodendrogliom	Jennings et al., 1989
PC12-Tet-On	Ratte/ Phäochromozytom PC12 mit Tet-On-Vektor	BD-Bioscience
U87MG	Mensch/ Glioblastom	Giard et al., 1973
U178MG	Mensch/ Glioblastom	erhalten von Dr. A. Waha, Institut für Neuropathologie der Uni Bonn, Bonn, Deutschland
U251MG	Mensch/ Glioblastom	Osborn et al., 1981
U373MG	Mensch/ Glioblastom	Ponten, et al., 1968

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Kulturbedingungen:

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO² in RPMI- (Jurkat-Zellen und PC12-Zelllinien) oder DMEM-Medium (Gliomzelllinien) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 1% L-Glutamin-Lösung und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung. Medien der Tet-On-Zelllinien enthielten zusätzlich 100 (PC12-Tet-On) bzw. 200 (JTO) µg/ml G418, Medien für

Tet-On-pTRE2-hyg-Gal-3-Doppeltransfektanten darüber hinaus 100µg/ml Hygromycin. PC12-Zellen wurden grundsätzlich auf Collagen Typ I (0.1mg/ml PBS) -beschichteten Oberflächen kultiviert. Alle in der Zellkultur verwendeten Medien, Seren, Antibiotika und Lösungen stammten von PAA (Pasching, Österreich).

Methoden:

Zum Passagieren wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen, mit 0,2% Trypsin/EDTA gelöst und 5min. bei 500 x g und 4°C pelletiert, die Pellets anschließend resuspendiert und neu ausplattiert. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen geerntet, in DMEM, 50% FCS, 1% L-Glutamin-Lösung, 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung, 10% DMSO resuspendiert und in Styropor langsam auf -80°C abgekühlt und hiernach in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2 Proteinanalytische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von Zellsolubilisaten

Zur Analyse der PARP- (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) Degradation wurden Zellkulturüberstände (die je nach experimentellem Ansatz abgelöste Zellen enthielten) sowie mit Trypsin/EDTA abgelöste Zellen vereinigt und für 5min. bei 4°C mit 500 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden nach Empfehlung des Antikörper-Herstellers mit einem harnstoffhaltigen Probenpuffer lysiert. Hierzu wurden die Komponenten USBI und USBII (s. 2.1.7) im Verhältnis 3:1 gemischt und direkt auf das Zellpellet gegeben. Das Lysat wurde bis zur Analyse bei -20°C gelagert und vor der Gelelektrophorese 15min. bei 65°C inkubiert.

Für alle anderen Analysen wurden die noch adhären Zellen 2x mit eiskaltem PBS gewaschen und danach mit Solubilisierungspuffer versehen. Anschließend wurden die partiell lysierten Zellen mit Hilfe eines Zellscrapers gesammelt und zur vollständigen Solubilisierung weitere 20min. auf Eis inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (15min., 4°C, 15000 x g) und das Solubilisat nach Entnahme eines Aliquots für die Proteinbestimmung mit fünffachem Probenpuffer versehen und bei -20°C gelagert. Vor der Gelelektrophorese wurden die Proben 5min. bei 95°C inkubiert.

2.2.2.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (1976) und beruht auf dem Prinzip, dass sich das Absorptionsmaximum von Coomassie brilliant blue bei Bindung an Proteine von 465 nach 595nm verschiebt. Die Proben wurden mit dem Farbstoff versehen und photometrisch gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden anhand eines parallel gemessenen Standards (mit bekannten BSA-Konzentrationen als Referenzwerten) ermittelt.

2.2.2.3 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE nach Laemmli (1970) werden die Eigenladungen der in Probenpuffer reduzierten Proteine mit dem anionischen Detergenz SDS überdeckt, so dass SDS-Protein-Komplexe mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen (1,4g SDS/g Protein). Auf diese Weise können Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrem MG aufgetrennt werden.

Bei der hier verwendeten Methode handelt es sich um eine diskontinuierliche SDS-PAGE, bei der die Proteine zuerst in einem Sammelgel fokussiert und anschließend in einem Trenngel aufgetrennt werden. Für die Experimente wurden 6 oder 12%ige Flachgele angefertigt. Es wurde eine Stromstärke von 3mA pro cm² angelegt. Zur Identifizierung der nachzuweisenden Proteine wurden Proteinmarker der Firma Fermentas mitgeführt.

2.2.2.4 Western-Blot-Analysen

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach der von Towbin et al. (1979) beschriebenen Methode auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde die Nitrocellulose mit 0,2% (w/v) PonceauS in 0,3% (w/v) Trichloressigsäure angefärbt und anschließend der Farbstoff durch Waschen mit PBS entfernt. Blockiert wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 3% (w/v) Milchpulver in 0,2% (v/v) Tween-20/PBS (MP/PBS/Tween). Die Inkubation mit primärem Antikörper, verdünnt in 3% MP/PBS/Tween, erfolgte bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/Tween wurde für eine Stunde mit Peroxidase-gekoppeltem, sekundärem Antikörper in 3% MP/PBS/Tween inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/Tween wurde die ECL-Peroxidase-Substratlösung nach Angaben des Herstellers angewendet. Die markierten Proteine wurden nach Auflegen eines Röntgenfilms (X-OMAT, XAR-5, Kodak, München) visualisiert.

2.2.3 Nukleinsäureanalytische Methoden

2.2.3.1 Alkoholfällung

Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 3M Natriumacetatlösung pH 5.2 (Endkonzentration vor Zugabe des Alkohols: 0,3M) und dem 2,5fachen Volumen EtOH (100%) bei -20°C gefällt und durch Zentrifugation (20min., 4°C, V_{max}) pelletiert. Nach Waschen des Pellets mit 70%igem EtOH und erneuter Zentrifugation (10min, 4°C, V_{max}) wurde die DNA getrocknet und in 10mM Tris pH 8.0 gelöst. Die Konzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt.

2.2.3.2 Isolierung von DNA

DNA-Isolierung aus Zellpellets erfolgte mit Hilfe des EZNA Tissue DNA Kits nach Angaben des Herstellers.

2.2.3.3 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus Zellen erfolgte mittels Trizol-Chloroform-Extraktion. Hierzu wurden 1×10^4 bis 1×10^6 Zellen durch Zugabe von 750µl Trizol homogenisiert. Zum Homogenat wurden 150µl Chloroform gegeben und sorgfältig geschüttelt. Nach Zentrifugation (15min., 4°C, 12000 x g) wurde die im wässrigen Überstand gelöste RNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt und gefällt. Das Pellet wurde in RNase-freiem DEPC-H₂O gelöst und vermeintliche DNA-Reste mit DNase verdaut. Zur Entfernung der DNase wurde eine zweite Trizol-Chloroform-Extraktion angeschlossen.

2.2.3.4 Reverse Transkription

Zur Herstellung von cDNA wurde der Kit SuperscriptTM verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte mit oligo-dT-Primern entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

2.2.3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von Zielgenen erfolgte mittels einer Standard- PCR (5 min. Denaturierung bei 95°C gefolgt von x Zyklen Denaturierung, Annealing und Elongation; Bedingungen werden an entsprechender Stelle angegeben) nach folgendem Schema:

Komponente	Endkonzentration
DNA	50pg-1µg
dNTP-Gemisch	0,2mM (je dNTP)
Primer forward	0,5pmol/µl
Primer revers	0,5pmol/µl
Puffer (10x)	5µl
MgCl ₂	2mM
Taq-Polymerase	1,25U
H ₂ O	x µl
Gesamtansatz:	50µl

2.2.3.6 DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese erfolgte in Agarosegelen (0,1µg/ml Ethidiumbromid, 0,7 bzw. 2% Agarose/TAE). Nukleinsäuren wurden in Nukleinsäureprobenpuffer aufgenommen, auf das Gel aufgetragen und bei 80mA getrennt.

2.2.3.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte durch die Firma MWG, Ebersberg, Deutschland. Die Sequenzanalyse wurde mit Hilfe der Online-Software BLAST durchgeführt.

2.2.3.8 DNA-Restriktion

Zum DNA-Verdau mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurden zwischen 0,2 und 1µg DNA, 1U Enzym und die dem Ansatz entsprechende Menge 10 x Verdaupuffer eingesetzt. Der Verdau erfolgte für 1h bei 37°C.

2.2.3.9 DNA-Ligation

Ligationen erfolgten für 2 h bei 22°C im Wasserbad nach folgendem Schema:

Komponente	Menge
Vektor	x µl
Insert	x µl
10 x Puffer	2µl
50% PEG 4000 Lösung	2µl
T4-DNA-Ligase	1µl (=1U)
DEPC-H ₂ O	x µl
Gesamtansatz:	20µl

Anschließend wurde die Ligase für 15min. bei 65°C inaktiviert.

2.2.3.10 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Gewinnung von Einzelkolonien wurden die E.coli Bakterien (JA774) auf einer Agarplatte (LB-Agar der Firma Sigma, Deisenhofen, Deutschland) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden 5ml LB-Medium (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) mit einer Kolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und 200rpm inkubiert. Mit 2ml dieser Vorkultur wurden 100ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben bei 37°C und 200rpm inkubiert, bis eine OD₅₉₅ von 0,4 – 0,6 erreicht war. Die Bakterien wurden dann zentrifugiert (25min., 4°C, V_{max}), in TSS-Puffer resuspendiert, auf Eis aliquotiert (je 100µl) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.3.11 Transformation

Kompetente Bakterien (E.coli JA774, 100µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit 0,1-10ng DNA gemischt und für 60min. auf Eis inkubiert. Hiernach wurden die Bakterien für 90sec. einem Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C ausgesetzt. Anschließend wurden zur Bakteriensuspension 900µl 20mM Glucose/ LB-Medium zugegeben und der Ansatz für

60min. bei 37°C und 200rpm inkubiert. Mit 150µl dieser Bakterienkultur wurde über Nacht eine Platte mit Selektionsagar (100µg/ml Ampicillin) beimpft.

2.2.3.12 Selektion von E.coli und Plasmidpräparationen

Ampicillinresistente Kolonien wurden gepickt und in 3ml ampicillinhaltigem (100µg/ml) LB-Medium für 8h (Midipräp) bzw. über Nacht (Minipräp) bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Minipräps erfolgten nach Angaben des Herstellers mit den Übernachtskulturen, für Midipräps wurden 25ml Selektionsmedium mit 25µl der Vorkultur beimpft und im Kolben bei 37°C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Mit dieser Kultur erfolgte die Midipräp nach Angaben des Herstellers.

2.2.4 Funktionsanalytische Methoden

2.2.4.1 Überexpression von Gal-3 in Gliomzellen und PC12-Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses von Gal-3 auf Differenzierungs-, Proliferations- und Apoptoseprozesse wurden mit Hilfe des Tet-On-Expressionssystems stabile Zelllinien hergestellt, in denen eine Gal-3-Überexpression induzierbar ist.

2.2.4.1.1 Herstellung stabiler Tet-On-Zelllinien

5 x 10⁵ SK-MG-5-Zellen wurden im 6-Well-Format mit Hilfe von LipofectamineTM 2000 (Invitrogen, Carlsbad, USA) mit 4µg pTet-On nach Angaben des Herstellers transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen eines Wells auf vier 4 10cm-Schalen aufgeteilt. Wiederum einen Tag später wurde das Medium gegen Selektionsmedium (400µg/ml G418) ersetzt. Nach ca. 18 Tagen erfolgte die Selektion einzelner Klone. Hierzu wurden die Schalen mit PBS gewaschen und Klonierungszyylinder mit Hilfe von Silicon über den zuvor markierten Klonen fixiert. Die Zellen innerhalb der Klonierungszyylinder wurden mit 200µl Trypsin gelöst, zentrifugiert, in ein Well einer 24-Well-Platte überführt und in Wachstumsmedium mit 200µg/ml G418 weiterkultiviert.

Um die Integration des Plasmid in das Genom nachzuweisen, wurde genomische DNA isoliert und eine PCR mit Primern zur Amplifikation des Transaktivators (rtTA) durchgeführt (Primer: rtTA f und r; Denaturierung: 1min.95°C, Annealing: 1min. 59°C, Elongation: 2min. 72°C; Zyklenzahl: 35). Positive Klone wurden mit Hilfe eines Luciferaseassay auf Induzierbarkeit hin getestet und derjenige Klon mit der höchsten Induzierbarkeit des Luciferasegens (JTO) wurde zur Herstellung der Doppeltransfektante (s. 2.2.4.1.2) verwendet.

2.2.4.1.2 Herstellung stabiler Doppeltransfektanten mit induzierbarer Gal-3-Expression

Klonierung:

Humanes Gal-3 und Ratten Gal-3 wurden mittels PCR aus den Plasmiden p2ER-GFP-hGal-3 und E8-pCD amplifiziert (Primer: hGal-3 up und down, rGal-3 up und down; Denaturierung: 1min.95°C, Annealing: 45sec. 54°C, Elongation: 2,45min. 72°C; Zyklenzahl: 35) und die PCR-Produkte mit dem PCR-Purification Kit aufgereinigt.

Der Vektor pTRE2-hyg wurde mit EcoRV verdaut und anschließend mit den PCR-Produkten ligiert. Hierzu wurden 50ng Vektor und 240ng hGal-3 bzw. 400ng rGal-3 eingesetzt. Dies entspricht einem Verhältnis von Vektor : Insert von 1:30 für hGal-3 bzw. 1:40 für rGal-3. Ausserdem wurde 1µl (2U) der Restriktionsendoniklease EcoRV zum Ligationsansatz zugegeben, um eine Religation des Vektors zu verhindern.

Der gesamte Ligationsansatz wurde für die Transformation von E.coli JA774 verwendet. Von 12 Kolonien wurden Minipräps hergestellt und zur Kontrolle der Orientierung der Inserts Kontrollverdaus mit ScaI (h-Gal3) und XhoI (r-Gal-3) durchgeführt.

Positive Plasmide wurden bei MWG mit den Primern seq-hGal-3 up und r und seq-rGal-3 down und r sequenziert und auf Sequenzgenauigkeit überprüft. Die korrekten Plasmide pTRE2-hyg-hGal3 und pTRE2-hyg-rGal-3 wurden mittels Midipräp angereichert und zur Transfektion der Tet-On-Zelllinien verwendet.

Transfektion:

5×10^5 JTO-Zellen bzw. 5×10^6 PC12-Tet-On-Zellen wurden im 6-Well-Format mit Hilfe von LipofectamineTM 2000 mit 4µg pTRE2-hyg-hGal-3 bzw. pTRE2-hyg-rGal-3 nach Angaben des Herstellers transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen der einzelnen Wells auf vier bzw. acht 10cm-Schalen aufgeteilt. Wiederum einen Tag später wurde das Medium gegen Selektionsmedium (entsprechendes Medium der Tet-On-Zelllinie + 200µg/ml Hyg) ersetzt. Nach ca. 18 Tagen erfolgte die Selektion einzelner Klone wie unter 2.2.4.1.1 beschrieben. Die Weiterkultivierung erfolgte in entsprechenden Medien mit 100µg/ml Hyg. Anschließend wurden die Klone für 2 Tage mit 2µg/ml Dox inkubiert und die Induzierbarkeit von Gal-3 im Westernblot analysiert. Für die weiteren Experimente wurden die 3 bzw. 2 Klone mit der geringsten Basisexpression („leakynes“) und der höchsten Induktion ausgewählt.

2.2.4.2 Luciferase-Assay

Der Vektor pTRE2-hyg-Luc enthält ein rtTA-abhängiges Luciferasegen. Zur Überprüfung der rtTA-Aktivität der Tet-On-Zelllinien wurden 4×10^5 Zellen in 3cm-Schalen mit 2µg pTRE2-

hyg Luc mit Hilfe von LipofectamineTM 2000 nach Angaben des Herstellers transient transfiziert und für weitere 48h in An- oder Abwesenheit von 2µg/ml Dox weiterkultiviert. Die Zellen wurden dann mit Hilfe des Lysepuffers des Luciferase-Assay-Kits nach Angaben des Herstellers lysiert, ein Teil der Proben zur Proteinbestimmung separiert und der Rest bei -80°C gelagert. Der Luciferase-Assay wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip des Assays basiert auf einer indirekten Enzymaktivitätsmessung: Luciferase setzt Luciferin zu Oxyluciferin um, die hierbei entstehenden Emissionen können im Luminometer gemessen werden. Die Messwerte wurden auf den Proteingehalt der Proben normiert und als Maß für die Induzierbarkeit, die Differenz zwischen Dox-behandelten und -unbehandelten Zellen berechnet.

2.2.4.3 Zellassays

2.2.4.3.1 Zellzahlbestimmung und Trypanblau-Färbung

Zur Bestimmung von Zellzahlen und Absterberaten wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA gelöst und inklusive aller Überstände (Wachstumsmedium, Waschmedium) pelletiert. Die Zellen wurden in Wachstumsmedium resuspendiert und mit einem gleichen Volumen an Trypanblaulösung versetzt. Trypanblau penetriert die Zellmembran, wird jedoch von lebenden Zellen wieder aktiv aus der Zelle ausgeschieden, blau gefärbte Zellen sind dementsprechend abgestorben. Gesamtzellzahl und die Zahl Trypanblau-gefärbter Zellen wurden mit Hilfe eines Hämacytometers bestimmt und daraus die Absterberate berechnet.

2.2.4.3.2 Proliferationsassay

Zur Bestimmung der Verdopplungszeiten wurden die Zellen (PC12-Zellen: 1×10^5 , andere: 5×10^4) in 6cm-Petrischalen ausgesät. Nach 72h erfolgte die erste Zellzahlbestimmung und gegebenenfalls Inkubation mit Dox bzw. U0126/DMSO. Nach weiteren 72h erfolgte die zweite Zellzahlbestimmung. Parallel zu den Zellzahlen wurde die Anzahl abgestorbener Zellen bestimmt und aus den ermittelten Werten die Verdopplungszeiten und Absterberaten berechnet.

2.2.4.3.3 Adhäsionsassay

Für die Analyse der Zelladhäsion wurden auf 6cm-Schalen der Firma Falcon, BD Bioscience, Palo Alto, USA je 3 4µl-Tropfen der ECM-Substrate CI, CIV, FN und LN (je 25µg/ml) aufgebracht und 30min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Substrattropfen abgesaugt und die Schalen sofort mit 5% (w/v) BSA/PBS (hitzeinaktiviert bei 70°C)

blockiert. 4h vor-inkubierte Zellen (1µg/ml DMSO bzw. 10µM U0126) wurden 1 x mit PBS gewaschen, mit 200µg/ml (w/v) EDTA/PBS geerntet, zentrifugiert und in DMSO- bzw. U0126-haltigem Medium resuspendiert. Pro Schale wurden 3 x 10⁵ Zellen ausplattiert. Nach 2 Stunden wurden nicht-adhärenente Zellen entfernt und adhärenente Zellen mit 4% (v/v) Formaldehyd/PBS fixiert. Je Substrat wurde die Zahl der adhärenenten Zellen nach photographischer Dokumentation auf einer Gesamtfläche von 1mm² ausgezählt.

2.2.4.3.4 Spreadingassay

Der Spreadingassay wurde auf die gleiche Weise wie der Adhäsionsassay durchgeführt. Nach Zellfixierung wurde nach photographischer Dokumentation die Fläche von mindestens 40 zufällig ausgewählten Zellen mit Hilfe der Software AxioVision ermittelt.

2.2.4.3.5 Migrationsassay

Die Zellmigration wurde anhand des Auswanderungsverhaltens aus zellulären Spheroïden analysiert. Hierzu wurden ca. 1 x 10⁶ Zellen in einer mit 0,7% Agarose beschichteten 6cm-Petrischale in Wachstumsmedium kultiviert. Nach 4 bis 6 Tagen entstanden hierdurch Spheroïde mit einem Durchmesser von 80 bis 150µm. Je ein Spheroïd wurde in ein Well einer 24-Well-Platte übertragen, die U0126-haltiges (10µM) oder Kontrollmedium (DMSO 1µl/ml) enthielten. DMSO und U0126 wurden alle 24h frisch zugegeben. Die Spheroïde wurden nach 5, 24, 48 und 72h photographiert. Mit Hilfe der Software AxioVision 3.1 (Zeiss, Jena, Deutschland) wurde auf den Aufnahmen ein Kreis um das Spheroïd und ausmigrierte Zellen eine Kreisfläche so orientiert, dass sie mindestens 95% der Zellen enthielt. Die Migrationsrate wurde definiert als Änderung des Kreisradius nach verschiedenen Inkubationszeiten.

2.2.4.3.6 Zytotoxizitätsassay (Kristallviolett-Färbung)

Hierzu wurden Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten ausplattiert (PC12: 2 x 10⁴ Zellen/ Well in 100µl, Medium, Gliomzellen: 5 x 10³ Zellen/ well in 100µl Medium). Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2% Formaldehyd/PBS (v/v) für 2min. fixiert und anschließend mit Kristallviolett-färbelösung 30min. gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde mit ddH₂O entfernt und die Mikrotiterplatten bei RT getrocknet. Der in den Zellen verbliebene Farbstoff wurde schließlich mit 50µl 50% EtOH eluiert und Extinktionen mittels eines ELISA-Readers bestimmt. Kristallviolett färbt lebende Zellen, die Extinktionswerte sind somit ein Maß für die Anzahl lebender Zellen pro Well.

3 Resultate

3.1 Bedeutung von aktiviertem ERK1/2 für neurale Tumorzellen

3.1.1 Expression von konstitutiv aktiviertem ERK1/2 in Gliomzelllinien

Die Gliomzelllinien A172, A1207, SKMG-4, SKMG-5, SKMG-15, U87MG, U178MG, U251MG, U373MG, die Oligodendrogliomzelllinie TC620, sowie die Rattengliomzelllinie C6 wurden mit Hilfe von Western-Blot-Analysen auf die Präsenz von phosphoryliertem ERK1/2 hin untersucht. In allen untersuchten Zelllinien konnte eine hohe Expression von pERK1/2 (phosphoryliertes ERK1/2) nachgewiesen werden, allerdings schien in den meisten Zelllinien ERK2 (untere Banden von 42kD) im Vergleich zu ERK1 (obere Banden von 44kD) verstärkt in phosphorylierter Form vorzuliegen (Abb. 3.1 A). Im Gegensatz zu den untersuchten Zelllinien wiesen aus postnatalen Mausgehirnen kultivierte Astrozyten kein aktiviertes ERK1/2 auf (Abb. 3.1 A, Spur 12).

Um Aufschluss darüber zu erhalten, welche vorgeschalteten Signalwege für die konstitutive Aktivierung von ERK1/2 verantwortlich sind, bzw. ob es sich um eine MEK1/2-abhängige Aktivierung handelt, wurden die Zelllinien für 24h mit dem Inhibitor U0126 (10 μ M) inkubiert, der die Aktivierung von MEK verhindert. In allen Zellen bewirkte dies einen drastischen Abfall der pERK1/2-Konzentrationen (gezeigt für A172, A1207 und SKMG-4 in Abb. 3.1 B), was auf eine MEK-abhängige ERK1/2-Phosphorylierung schließen lässt. Durch tägliche Zugabe von frischem U0126 konnte die ERK1/2-Phosphorylierung über längere Zeiträume inhibiert werden. Wie in Abb. 3.1. C am Beispiel von U251MG-Zellen zu erkennen ist, führte eine U0126-Inkubation für 24, 48 und 72h zu einer nahezu vollständigen Inaktivierung von ERK1/2. Eine zytotoxische Wirkung von U0126 unter den gewählten Bedingungen wurde durch Trypan-Blau-Färbung ausgeschlossen (s. Tabelle 1).

Da Änderungen im Milieu der Zelle eine Stressantwort und somit auch die Aktivierung von Signalwegen hervorrufen können, wurde die Wirkung von (i) DMSO (Lösungsmittel für U0126) und (ii) Mediumwechsel/ Waschschritten auf die ERK1/2-Aktivierung untersucht. Wie in Abb. 3.1. D gezeigt, bewirkte eine DMSO-Zugabe zum Wachstumsmedium einen leichten Anstieg der ERK1/2- Phosphorylierung (Spur 2 im Vergleich zu Spur 1). Sowohl dieser Anstieg, als auch die Basisexpression konnte mit U0126 vollständig inhibiert werden. Erfolgte die Zugabe von DMSO jedoch unter komplettem Mediumwechsel, unter Einbeziehung eines Waschschrattes mit PBS, kam es zu einer weiteren Hochregulierung der pERK1/2-Konzentration. Dieser Anstieg ist nur noch partiell durch U0126 inhibierbar. In

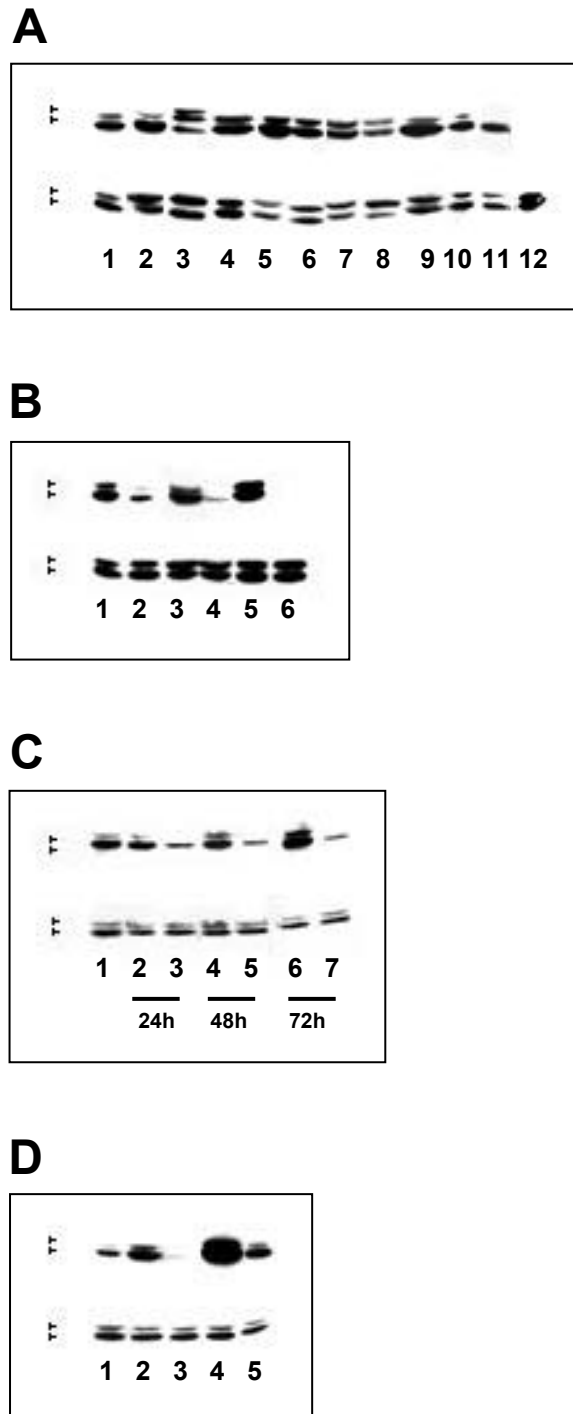


Abb. 3.1: Western-Blot-Analysen zur ERK1/2-Aktivierung in Gliomzelllinien

(A) A172 (Spur 1), A1207 (2), C6 (3), SKMG-4 (4), SKMG-5 (5), SKMG-15 (6), TC620 (7), U87MG (8), U178MG (9), U251MG (10), U373MG (11), primäre Astrozyten der Maus (12) wurden in normalem Kulturmedium inkubiert; (B) A172- (1, 2), A1207- (3, 4) und SKMG-4-Zellen (5, 6) wurden für 24h in Ab- (1, 3, 5) oder Anwesenheit (2, 4, 6) von 10 μ M U0126 kultiviert; (C) U251MG-Zellen wurden für 0 (1), 24 (2, 3), 48 (4, 5) und 72h (6, 7) in Ab- (1, 2, 4, 6) und Anwesenheit (3, 5, 7) von U0126 kultiviert. (D) U251MG-Zellen wurden für eine Stunde mit Wachstumsmedium (1), mit DMSO (2) und mit 10 μ M U0126 inkubiert; U251MG-Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend für eine Stunde in Ab- (4) oder Anwesenheit (5) von 10 μ M U0126 inkubiert.

Für jedes Experiment wurden Zelllysate mit monoklonalem Phospho-Thr/Thyr ERK1/2 und polyklonalem ERK1/2 auf die Präsenz von pERK1/2 (obere Doppelbande) oder gesamtem ERK1/2 (untere Doppelbande) untersucht. Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen (10 μ g) aufgetragen. Die Pfeile kennzeichnen die Position von ERK1 (44kD) und ERK2 (42kD).

allen weiteren Experimenten wurde daher kein Mediumwechsel vorgenommen. Der Inhibitor wurde - eine 24stündige Stabilität von U0126 zugrunde gelegt - täglich frisch zugegeben.

Nach Festlegung der Basisparameter für das Design der Experimente wurde die Bedeutung von ERK1/2 für den malignen Phänotyp von Gliomzellen analysiert, i.e. deren Auswirkung auf Adhäsions-, Spreading-, Migrations- und Proliferationsprozesse.

3.1.2 Bedeutung von konstitutiv aktiviertem ERK1/2 für die Proliferation neuraler Tumorzellen

Die verschiedenen Gliomzellen wurden für 72h in Wachstumsmedium kultiviert und anschließend für weitere 72h mit oder ohne U0126 inkubiert. Sowohl vor (i.e. nach 72h), als auch nach U0126-Inkubation (i.e. nach 144h) wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl mikroskopisch bestimmt. Anhand der ermittelten Werte wurde die Verdopplungszeit berechnet. Bei den untersuchten Glioblastomzelllinien lagen die Werte in einem Bereich von 27 (SKMG-4) bis 47h (U87MG) (s. Tabelle 3.1). Die humane Oligodendrogliomzelllinie wies eine Verdopplungszeit von 34h auf. Die höchste Teilungsrate, i.e. die kürzeste Verdopplungszeit wurde mit 20,6h für die Rattengliomzelllinie C6 ermittelt. In Anwesenheit von U0126 zeigten alle Zelllinien eine Erhöhung der Verdopplungszeit, wobei die geringste Steigerung bei Faktor 1,2 (SKMG-5), die höchste bei Faktor 3,3 (U87MG) lag. Es konnte keine Korrelation zwischen der Verdopplungszeit einer Zelllinie und ihrer Sensitivität gegenüber der U0126-Behandlung festgestellt werden: so zeigten z.B. die Zelllinien SKMG-5

Zelllinie	Verdopplungszeit			Zelltod in %	
	Kontrolle	U0126	Steigerungs-faktor	Kontrolle	U0126
A172	34,3 ± 3,2	64,4 ± 18,7	1,9	1,7 ± 0,5	4,5 ± 0,4
A1207	37,7 ± 3,4	58,7 ± 16,3	1,6	4,9 ± 0,3	3,9 ± 1,1
C6	20,6 ± 3,2	36,2 ± 10,5	1,8	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,8
SKMG-4	26,9 ± 3,0	37,8 ± 2,5	1,4	1,9 ± 0,9	2,0 ± 0,6
SKMG-5	40,9 ± 1,9	50,2 ± 4,7	1,2	4,1 ± 1,0	3,9 ± 1,0
SKMG-15	28,6 ± 4,7	48,4 ± 11,1	1,7	2,8 ± 1,3	3,8 ± 0,6
TC620	34,6 ± 3,2	62,2 ± 14,3	1,8	4,7 ± 0,9	4,3 ± 1,7
U87MG	43,5 ± 6,0	145,9 ± 39,3	3,4	2,5 ± 0,4	3,8 ± 2,4
U178MG	32,4 ± 1,5	59,5 ± 6,4	1,8	2,9 ± 1,3	2,7 ± 2,3
U251MG	37,5 ± 5,0	94,0 ± 35,5	2,5	2,4 ± 1,5	4,7 ± 1,5
U373MG	42,1 ± 10,0	76,0 ± 16,4	1,8	3,0 ± 3,1	2,8 ± 1,3

Tabelle 3.1: Verdopplungszeiten (h) von Gliomzelllinien In An- oder Abwesenheit des MEK-Inhibitors U0126

Gliomzelllinien wurden für 72h in Abwesenheit und anschließend für weitere 72h in Ab- oder Anwesenheit von U0126 kultiviert. Zur Berechnung der Verdopplungszeiten wurden die Zellzahlen nach 72 und 144h mikroskopisch ermittelt. Der Anteil toter Zellen wurde mit Hilfe von Trypan-Blau-Färbung bestimmt.

und U87MG in Abwesenheit von U0126 ähnliche Verdopplungszeiten (40 bzw. 47h; s. Tabelle 3.1). Während die Verdopplungszeit von SKMG-5-Zellen in Anwesenheit von U0126 nur geringfügig anstieg (um Faktor 1,3), erhöhte sich die von U87MG-Zellen um Faktor 3,3 (s. Tabelle 3.1). Im Mittel erhöhten sich die Verdopplungszeiten der untersuchten Zelllinien in Gegenwart von U0126 etwa auf das doppelte des Ausgangswertes (um Faktor 1,9).

3.1.3 Bedeutung von konstitutiv aktiviertem ERK1/2 für Zelladhäsion und –spreading

Zur Abklärung der Frage, ob aktiviertes ERK1/2 die Adhäsion glialer Tumorzellen auf ECM-Substraten beeinflusst, wurden die Gliomzellen in Ab- oder Anwesenheit von 10 μ M U0126 mit den Substraten Collagen I (CI), Collagen IV (CIV), Fibronectin (FN) und Laminin (LN) inkubiert. Alle Zellen adhärten in unterschiedlichem Maße an die verschiedenen Substrate, mit Ausnahme der Oligodendrogliomzelllinie TC620, die nicht an Fibronectin adhärte (Tabelle 3.2). Die Anzahl adhärenter Zellen pro Flächeneinheit in Anwesenheit von 10 μ M U0126 war in den meisten Fällen mit der unbehandelten Zellen vergleichbar. Die größten Abweichungen zeigten SKMG-4-Zellen, die in Gegenwart von U0126 auf den Substraten CI, CIV und LN eine um 43, 49 und 116% erhöhte Adhäsion zeigten, das Adhäsionsmuster

Zelllinie	C I		C IV		FN		LN	
	Kontrolle	U0126	Kontrolle	U0126	Kontrolle	U0126	Kontrolle	U0126
A172	26,9 $\pm$ 1,8	30,9 $\pm$ 4,0	22,3 $\pm$ 1,2	26,7 $\pm$ 3,7	18,7 $\pm$ 3,5	18,7 $\pm$ 2,9	31,2 $\pm$ 2,8	40,2 $\pm$ 1,9
A1207	33,7 $\pm$ 5,2	28,9 $\pm$ 4,8	18,9 $\pm$ 6,3	18,5 $\pm$ 4,3	31,4 $\pm$ 2,6	28,5 $\pm$ 3,7	33,9 $\pm$ 3,1	32,4 $\pm$ 3,4
C6	51,8 $\pm$ 6,8	60,6 $\pm$ 7,6	46,1 $\pm$ 7,7	57,4 $\pm$ 10,2	42,7 $\pm$ 4,2	46,3 $\pm$ 7,5	58,0 $\pm$ 11,2	63,2 $\pm$ 63,2
SKMG-4	46,9 $\pm$ 3,9	67,2 $\pm$ 10,2	32,6 $\pm$ 2,5	48,5 $\pm$ 4,4	25,4 $\pm$ 5,6	37,5 $\pm$ 17,9	35,7 $\pm$ 3,3	77,3 $\pm$ 15,9
SKMG-5	23,6 $\pm$ 5,1	27,0 $\pm$ 5,1	25,6 $\pm$ 1,6	23,3 $\pm$ 3,1	26,3 $\pm$ 2,6	31,8 $\pm$ 4,6	25,4 $\pm$ 3,6	23,4 $\pm$ 3,1
SKMG-15	26,1 $\pm$ 1,7	27,1 $\pm$ 2,5	27,4 $\pm$ 2,7	25,1 $\pm$ 2,5	19,0 $\pm$ 3,9	24,5 $\pm$ 2,5	25,5 $\pm$ 2,9	28,4 $\pm$ 2,6
TC620	14,5 $\pm$ 2,0	16,3 $\pm$ 2,2	15,8 $\pm$ 2,7	19,9 $\pm$ 3,0	no adhesion	no adhesion	15,1 $\pm$ 1,8	20,3 $\pm$ 3,1
U87MG	27,3 $\pm$ 5,1	26,5 $\pm$ 2,9	26,7 $\pm$ 2,9	24,8 $\pm$ 1,5	24,0 $\pm$ 1,9	20,7 $\pm$ 2,5	24,7 $\pm$ 1,3	26,2 $\pm$ 0,9
U178MG	31,9 $\pm$ 2,5	35,1 $\pm$ 7,6	29,7 $\pm$ 1,3	29,5 $\pm$ 5,4	24,7 $\pm$ 9,9	26,7 $\pm$ 6,3	24,7 $\pm$ 3,9	28,1 $\pm$ 3,4
U251MG	26,1 $\pm$ 3,5	25,9 $\pm$ 5,6	21,8 $\pm$ 3,7	19,4 $\pm$ 3,4	25,4 $\pm$ 1,7	24,7 $\pm$ 4,4	29,7 $\pm$ 2,7	28,6 $\pm$ 3,9
U373MG	28,4 $\pm$ 4,9	37,0 $\pm$ 5,5	16,8 $\pm$ 3,6	25,1 $\pm$ 4,7	24,4 $\pm$ 4,8	36,5 $\pm$ 5,7	28,4 $\pm$ 5,1	34,1 $\pm$ 6,8

Tabelle 3.2: Adhäsion von Gliomzelllinien auf angegebenen Substraten in Ab- oder Anwesenheit von 10 μ M U0126

ECM-Substrate wurden auf Zellkulturplattik immobilisiert und mit Einzelzellsuspensionen in Ab- oder Anwesenheit von 10 μ M U0126 inkubiert. Nach zwei Stunden wurden nicht adhärenente Zellen durch Waschen entfernt und die Zellzahl mikroskopisch ermittelt. Angegeben sind die Zellzahlen pro mm² $\pm$ Standardabweichung von Doppelansätzen zweier verschiedener Experimente.

auf FN blieb jedoch unverändert. Neben SKMG-4-Zellen zeigten auch U373MG-Zellen in Gegenwart von U0126 eine erhöhte Adhäsion auf CI und FN (s. Tabelle 3.2). Kleinere Unterschiede konnten für A172- und TC620-Zellen ermittelt werden, die nach U0126-Behandlung eine um 30% erhöhte Adhäsion auf LN zeigten.

Um die Bedeutung von pERK1/2 für das Spreading der Zellen zu beurteilen, wurden die nach zweistündiger Adhäsion von einzelnen Zellen eingenommenen Flächen vermessen. Keine der Zelllinien zeigte nach Inkubation mit U0126 ein signifikant verändertes Spreadingverhalten auf den verschiedenen ECM-Substraten (s. Tabelle 3.2).

Zusammenfassend kann man sagen, dass pERK1/2 keinen nennenswerten Einfluss auf das Adhäsions- und Spreadingverhalten der untersuchten Tumorzellen hat.

Zelllinie	C I		C IV		FN		LN	
	Kontrolle	U0126	Kontrolle	U0126	Kontrolle	U0126	Kontrolle	U0126
A172	884,3 ± 314,0	779,8 ± 228,2	881,7 ± 262,5	805,2 ± 257,9	681,6 ± 219,0	802,7 ± 274,9	726,7 ± 206,9	734,4 ± 232,3
A1207	1100,3 ± 352,9	1133,0 ± 386,6	949,5 ± 236,0	945,2 ± 284,1	1209,6 ± 388,1	1284,7 ± 453,3	1381,5 ± 592,1	1688,8 ± 625,4
C6	778,0 ± 202,9	971,9 ± 324,3	916,0 ± 291,0	1096,2 ± 360,8	600,4 ± 140,6	788,7 ± 285,8	920,4 ± 300,8	1202,3 ± 515,5
SKMG-4	1116,6 ± 344,2	801,4 ± 372,4	1081,1 ± 317,9	831,0 ± 378,9	664,8 ± 181,8	618,3 ± 209,8	771,8 ± 254,8	589,2 ± 203,3
SKMG-5	1701,5 ± 682,8	1236,3 ± 424,9	1278,8 ± 433,5	1389,0 ± 492,7	1588,3 ± 623,2	1932,2 ± 827,5	1694,0 ± 756,7	1296,2 ± 495,8
SKMG-15	2589,7 ± 1247,2	2184,9 ± 1108,9	2893,7 ± 977,9	2510,4 ± 877,8	1400,4 ± 764,2	1510,5 ± 958,1	2217,1 ± 1081,5	1993,7 ± 1046,5
TC620	925,3 ± 229,1	909,7 ± 256,9	873,5 ± 203,5	853,5 ± 203,5	keine Adhäsion	keine Adhäsion	979,7 ± 391,9	833,5 ± 289,1
U87MG	2649,8 ± 976,5	2591,4 ± 924,7	2038,7 ± 773,0	2303,7 ± 717,0	1755,0 ± 784,2	1711,4 ± 779,3	1854,0 ± 1046,5	2119,6 ± 1079,3
U178MG	1529,8 ± 789,6	996,5 ± 710,6	1654,8 ± 815,2	1325,7 ± 774,3	1479,3 ± 681,6	1436,0 ± 694,0	1428,1 ± 634,5	1442,3 ± 811,9
U251MG	1113,1 ± 323,9	1092,7 ± 251,4	1070,0 ± 311,6	958,9 ± 252,7	1170,4 ± 356,9	1218,5 ± 342,0	977,4 ± 274,9	1012,5 ± 336,2
U373MG	1453,1 ± 377,6	1511,1 ± 401,4	1289,5 ± 347,9	1340,7 ± 420,5	1325,1 ± 436,6	1405,9 ± 447,0	1113,1 ± 220,7	1182,0 ± 249,2

Tabelle 3.3: Spreading von Gliomzelllinien auf angegebenen Substraten in Ab- oder Anwesenheit von 10 μ M U0126

Für jede Zelllinie wurden je Experiment die Oberflächen von 40 zufällig ausgewählten Zellen pro angegebenem ECM-Substrat mikroskopisch bestimmt. Aufgeführt sind Mittelwerte von 80 verschiedenen Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten $\pm$ Standardabweichung.

3.1.4 Bedeutung von konstitutiv aktiviertem ERK1/2 für die Migration neuraler Tumorzellen

Als dritter Parameter zur Beurteilung des Einflusses von pERK1/2 auf die Zellmotilität wurde die Migration glialer Tumorzellen analysiert. Hierzu wurden multizelluläre Spheroide der einzelnen Zelllinien auf Zellkulturplastik ausplattiert und das nahezu kreisförmige Auswandern der Zellen aus den Spheroiden nach 24, 48 und 72h gemessen (s. Abb. 3.2 A). Alle untersuchten Zellen migrierten aus den Spheroiden, allerdings in unterschiedlichem

Ausmaß: Während die ausplattierten Spheroide einen Durchmesser von etwa 100µm aufwiesen, wurden nach 72h Radien von 400 (TC620) bis 1200µm (U87MG) gemessen. Mit

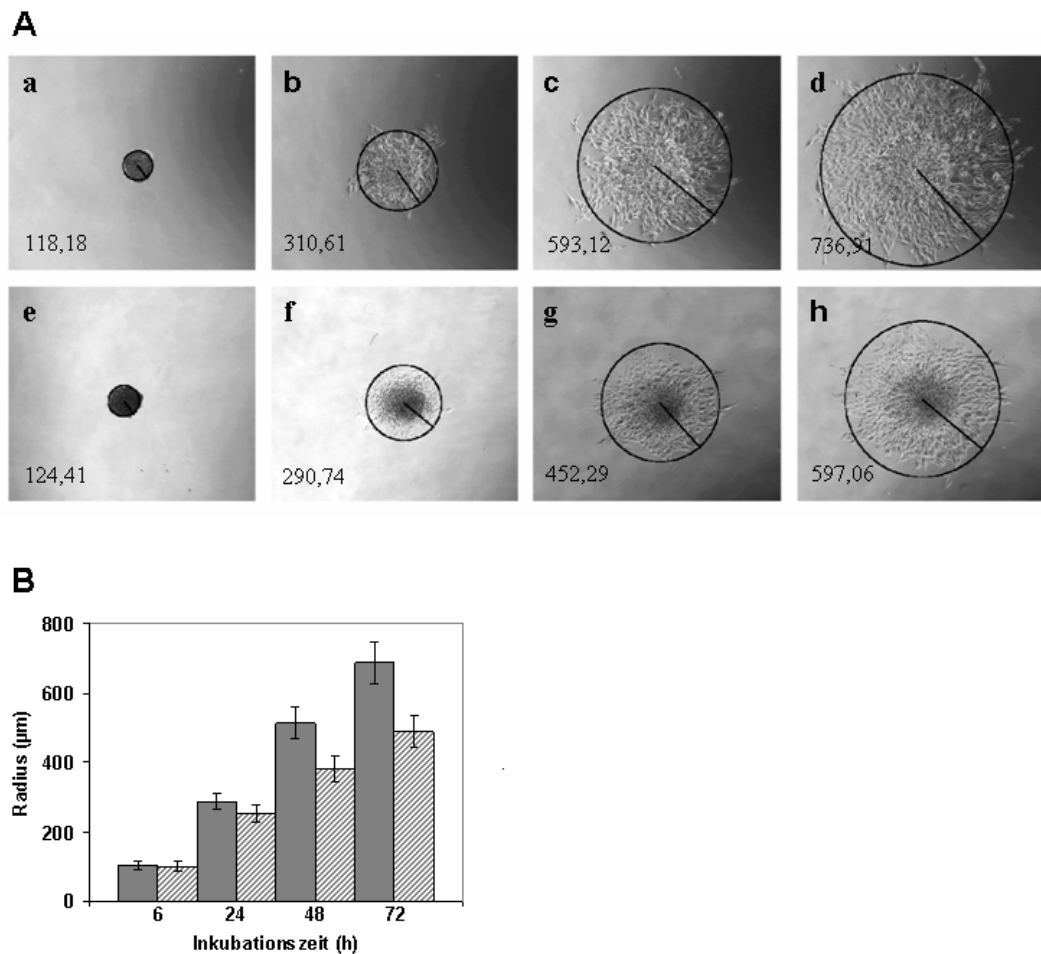


Abb. 3.2: Migrationspotential von Gliomzellen in Ab- oder Anwesenheit von 10µM U0126

(A) Mikroskopische Aufnahme von SKMG-4-Spheroiden nach 0, 24, 48 und 72h in Ab- (a, b, c, d) oder Anwesenheit (e, f, g, h) von 10µM U0126. Angegeben sind die Radien der Kreise, die so platziert wurden, dass ihre Fläche mindestens 95% der migrierenden Zellen umfasste. (B) Multizelluläre Spheroide wurden auf Zellkulturplastik aufgebracht und in Ab- (schwarze Balken) oder Anwesenheit (schraffierte Balken) von U0126 kultiviert. Nach 0, 24, 48, und 72 Stunden wurden die Radien der von den Zellen eingenommenen optimalisierten Kreise gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von 10 – 15 Spheroiden aus 2 verschiedenen Experimenten ± Standardabweichung.

Ausnahme von A1207-Zellen wiesen alle Zelllinien in Gegenwart von U0126 verminderte Migrationsraten auf. Diese Unterschiede waren schon nach 24h messbar und gewannen nach 48 und 72h an Deutlichkeit (s. Abb. 3.2. B). In 7 von 11 Zelllinien konnte eine signifikante (keine Überschneidung des Mittelwertes ± Standardabweichung) Verminderung der Migrationsdistanzen nach U0126-Behandlung gemessen werden, die mit einer ca. 20%igen Reduktion der Radien einherging.

Zelllinie	t=0h		t=24h		t=48h		t=72h		signifikante
	Kontrolle	U0126	Kontrolle	U0126	Kontrolle	U0126	Kontrolle I	U0126	Reduktion
A172	95,8 ± 13,9	95,2 ± 12,3	304,4 ± 38,8	282,4 ± 34,8	453,0 ± 44,2	394,9 ± 42,4	617,2 ± 41,3	492,7 ± 48,1	ja
A1207	95,4 ± 10,8	97,8 ± 9,0	212,6 ± 27,0	229,3 ± 27,2	335,4 ± 23,9	367,3 ± 27,5	496,9 ± 48,5	471,7 ± 29,0	nein
C6	129,2 ± 17,2	127,4 ± 14,5	341,8 ± 34,1	306,2 ± 25,2	587,6 ± 57,7	467,9 ± 36,5	900,8 ± 62,0	646,2 ± 45,2	ja
SKMG-4	101,3 ± 11,6	99,3 ± 12,8	287,0 ± 23,4	253,0 ± 24,6	514,4 ± 46,2	380,0 ± 38,7	686,3 ± 59,3	487,1 ± 45,3	ja
SKMG-5	118,3 ± 14,7	111,9 ± 8,9	245,3 ± 25,1	248,6 ± 30,5	388,6 ± 31,3	348,7 ± 66,9	523,1 ± 35,8	431,9 ± 78,5	nein
SKMG-15	85,1 ± 2	82,8 ± 9,8	218 ± 25,7	198,6 ± 33,1	446 ± 36,0	330,4 ± 36,9	589 ± 53,6	441,5 ± 49,1	ja
TC620	98 ± 9,5	100,3 ± 11,5	209,2 ± 18,4	188,2 ± 21,5	323,5 ± 35,0	258,1 ± 28,0	401,2 ± 28,8	303,5 ± 27,8	ja
U87MG	125,5 ± 15,4	120,9 ± 13,4	532,2 ± 83,0	455,9 ± 31,5	869,9 ± 64,7	690,6 ± 48,6	1161,1 ± 111,1	863,4 ± 75,8	ja
U178MG	94,6 ± 8,3	105,1 ± 15,1	414,1 ± 23,7	387,0 ± 28,0	752,9 ± 44,6	615,0 ± 45,8	956,4 ± 83,2	729,6 ± 66,7	ja
U251MG	112,4 ± 23,6	111,4 ± 17,3	397,8 ± 61,3	388,2 ± 33,1	633,3 ± 69,3	583,8 ± 57,8	809,7 ± 90,2	699,5 ± 64,7	nein
U373MG	91,8 ± 13,0	94,6 ± 19,6	359,7 ± 31,0	334,4 ± 27,6	533,2 ± 51,7	504,9 ± 46,3	656,8 ± 79	591,6 ± 56,2	nein

Tabelle 3.3: Radien von Zellsphroiden nach 0, 24, 48, 72h in Ab- oder Anwesenheit von U0126

Multizelluläre Spheroide wurden auf Zellkulturplastik aufgebracht und in Ab- (Kontrolle) oder Anwesenheit von 10µM U0126 kultiviert. Nach 0, 24, 48, und 72 Stunden wurden die Radien der optimierten Kreise gemessen, die mindestens 95% der Zellen beinhaltenden. Aufgeführt sind die Mittelwerte der Radien von 10 – 15 Sphroiden aus 2 verschiedenen Experimenten ± Standardabweichung. Eine Reduktion des Migrationspotentials wurde als signifikant betrachtet, wenn keine Überschneidung der Mittelwerte ± Standardabweichung in Ab- oder Anwesenheit von U0126 gegeben war.

3.2 Bedeutung von Gal-3 für neurale Tumorzellen

3.2.1 Herstellung und primäre Charakterisierung stabiler Zelllinien mit induzierbarer Gal-3-Expression

Die PC12-Tet-On-Zelllinie stammt von der Firma BD Bioscience und wurde uns freundlicherweise von Herrn Professor Wüllner, Institut für Neurobiologie des Universitätsklinikums Bonn, überlassen. Die stabile SKMG-5-Tet-On-Zelllinie „JTO“ wurde wie unter 2.2.4.1.1 beschrieben hergestellt. Aus den Tet-On-Zelllinien wurden durch Transfektion mit pTRE2-hGal-3 bzw. pTRE2-rGal-3 stabile, Gal-3-induzierbare Klone generiert (s. 2.2.4.1.2) und bezüglich optimaler Induktionsbedingungen analysiert.

3.2.1.1 Test stabiler Doppeltransfektanten auf Gal-3-Induktion

Zur Auswahl der Klone mit der höchsten Induzierbarkeit und der geringsten Basisexpression von Gal-3 („leakiness“) wurden die Zellen für zwei Tage mit 2 µg/ml Doxycyclin (Dox) inkubiert und anschließend in detergenshaltigem Puffer solubilisiert. Die Proteine wurden

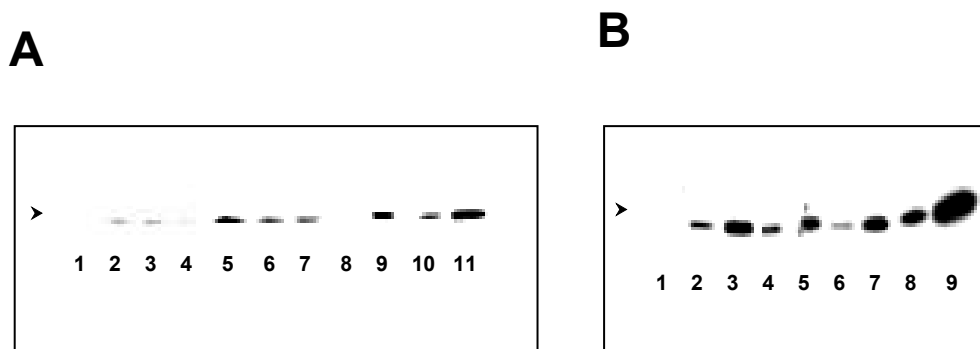


Abb. 3.3: Gal-3-Induktion in Doppeltransfektanten

(A) JTO-„Mutterzellen“ (Spur 1) und die SKMG-5-Zellklone JG2 (2, 3), JG7 (4, 5), JG8 (6, 7), JG9 (8, 9) und JG11 wurden ohne (1, 2, 4, 6, 8, 10) und mit 2 µg/ml Dox (3, 5, 7, 9 und 11) kultiviert. (B) PC12-Tet-On-Mutterzellen (1) und die PC12-Zellklone PCG22 (2, 3), PCG23 (4, 5), PCG24 (6, 7) und PCG25 (8, 9) wurden ohne (1, 2, 4, 6, 8) und mit 2 µg/ml Dox (3, 5, 7, 9) kultiviert.

Zum Nachweis von Gal-3 wurde der polyklonale Antikörper CBP35 verwendet. In jeder Spur wurden gleiche Proteinmengen (10 µg) aus Zelllysaten aufgetragen. Der Pfeil kennzeichnet die Position von Gal-3.

mittels SDS-Page aufgetrennt und Gal-3 nach Western-Blot mit dem polyklonalen Antikörper CBP35 nachgewiesen. In Abbildung 3.3 sind beispielhaft die Ergebnisse für die SKMG-5-Zellklone JG2, -7, -8, -9 und -11 (Abb. 3.3. A), sowie die PC12-Zellklone PCG22, -23, -24 und -25 (Abb. 3.3. B) dargestellt. Für alle weiteren Experimente wurden die Klone JG7, -9 und -11 (für SKMG-5) sowie PCG22 und -24 (für PC12-Zellen) ausgewählt.

3.2.1.2 Analyse der optimalen Induktionsbedingungen

Zur Analyse der optimalen Induktionsbedingungen wurde (i) die optimale, nicht-toxische Dox-Konzentration bestimmt, (ii) die Stabilität von Dox unter Kulturbedingungen analysiert, sowie (iii) die Konstanz des Gal-3-Expressionsniveaus über einen für die Experimente relevanten Zeitraum untersucht. (i) Zur Bestimmung der optimalen Dox-Konzentration wurden die SKMG-5- und PC12-Zellklone für 24 und 48h mit 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 und 3.0 $\mu\text{g/ml}$ Dox inkubiert und die Gal-3-Expression mittels Western-Blot analysiert. In Abbildung 3.4 sind exemplarisch die Ergebnisse für JG9- (Abb. 3.4 A) und PCG22-Zellen (Abb. 3.4 B) dargestellt. Bei SKMG-5-Zellklonen war das Gal-3-Expressionsniveau nach 48stündiger Dox-Inkubation für alle Konzentrationen vergleichbar (Abb. 3.4 A, Spuren 8, 9, 10, 11, 12). Die PC12-Zellklone zeigten bei einer Dox-Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ nach 48h die höchste Induktion (jeweils Spur 11). Mittels Trypanblau-Färbungen wurde nachgewiesen, dass Dox-Konzentrationen von 2 $\mu\text{g/ml}$ für die verwendeten Zellen nicht toxisch sind. Für alle weiteren Analysen wurden daher alle Klone 48h vor den Experimenten mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Dox inkubiert. Wie in Abbildung 3.4 B (Spuren 1 und 7) für PCG22-Zellen erkennbar ist, war Gal-3 auch im nicht-induzierten Zustand nachweisbar. Ein ähnlich hohes Basisexpressionslevel wurde für PCG24-Zellen nachgewiesen. Die SKMG-5-Zellklone waren zwar weniger

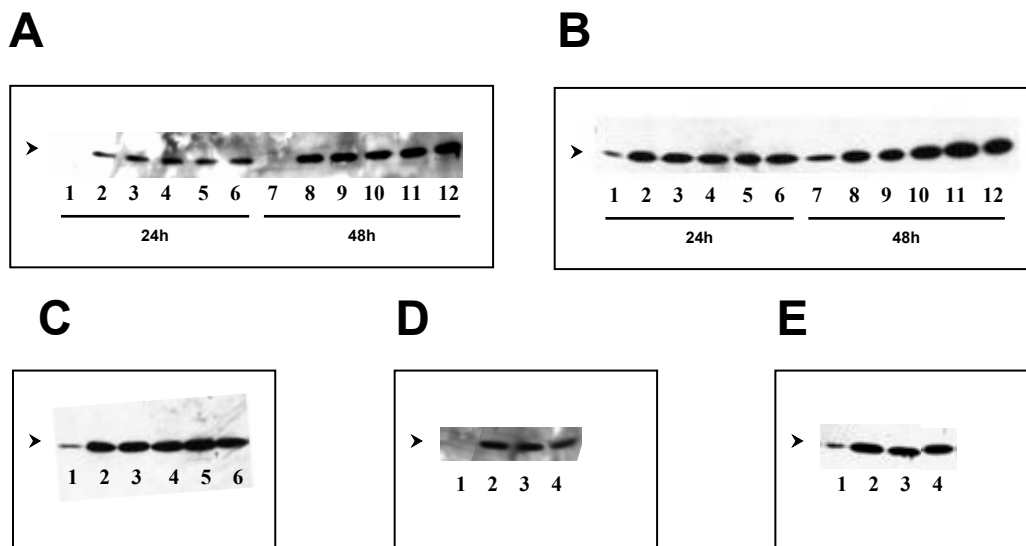


Abb. 3.4: Analyse der Bedingungen für eine optimale Gal-3-Expression

(A) und (B): JG9- (A) und PCG22-Zellen (B) wurden für 24 oder 48h mit 0 (je Spuren 1 und 7), 0.5 (je 2 und 8), 1.0 (je 3 und 9), 1.5 (je 4 und 10), 2.0 (je 5 und 11) und 3.0 $\mu\text{g/ml}$ Dox (je 6 und 12) inkubiert.: (C) PCG22-Zellen wurden mit Wachstumsmedium (Spur 1), mit 2 $\mu\text{g/ml}$ unbehandeltem (2), bzw. mit für 2 (3), 4 (4), 6 (5), 8 (6) und 10d (7) im Brutschrank inkubiertem Dox für 48h kultiviert. (D) und (E): JG9-Zellen (D) und PCG22-Zellen (je 2 bis 6) (E) wurden für 24h in Wachstumsmedium kultiviert (je 1) und hiernach mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Dox inkubiert und für weitere 2 (je 2), 4 (je 3) oder 6 Tage (je 4) kultiviert. Zum Nachweis von Gal-3 wurde der polyklonale Antikörper CBP35 verwendet. In jeder Spur sind gleiche Proteinmengen (10 μg) aus Zelllysaten aufgetragen. Der Pfeil kennzeichnet die Position von Gal-3

„leaky“, aber bei längeren Belichtungszeiten war Gal-3 auch in diesen Zellen nachweisbar.

(ii) Zur Überprüfung, ob während längerer Kulturbedingungen Aktivitätsverluste von Dox auftreten, wurde ein Wachstumssmedium mit 2µg/ml Dox hergestellt und im Brutschrank inkubiert. Exemplarisch für alle Zellklone wurde der PCG22-Klon für 48h in 2, 4, 6, 8 und 10 Tage im Brutschrank inkubiert, Dox-haltigem Medium kultiviert und auf Gal-3-Induktion untersucht. Abbildung 3.4. C belegt, dass auch bei längeren Inkubationszeiten kein Aktivitätsverlust von Dox auftritt. (iii) Zur Analyse, ob Gal-3 von den verwendeten Zellklonen über einen längeren Zeitraum hinweg konstant exprimiert wird, oder ob es möglicherweise zu einem Abfall des Gal-3-Expressionsniveaus kommt, wurden die Klone einmalig mit 2µg/ml Dox inkubiert und nach 2, 4 und 6 Tagen auf das Niveau der Gal-3-Expression hin untersucht. Bei allen Klonen konnte über mindestens 6 Tage hinweg ein konstantes Gal-3-Niveau nachgewiesen werden. Abbildungen 3.4 D und E zeigen dies am Beispiel der Klone JG9 (D) und PCG22 (E).

3.2.2 Einfluss von Gal-3 auf Differenzierungs-/ Proliferationsprozesse neuraler Tumorzellen

Abhängig vom Zelltyp korreliert das Expressionsniveau von Gal-3 mit Proliferations- oder mit Differenzierungsprozessen. Kuklinski und Mitarbeiter (2003) konnten zeigen, dass es bei der NGF-induzierten Differenzierung von PC12-Zellen zu einer Hochregulation von Gal-3 kommt. Auf einen Kausalzusammenhang auf molekularer Ebene zwischen Gal-3-Expression und Differenzierung gingen die Autoren in dieser Arbeit jedoch nicht ein. Unsere Beobachtung, dass auch längere Inkubationszeiten mit Dox nicht zu einer Differenzierung der PC12-Zellklone PCG22 und PCG24 führten, zeigen, dass eine Gal-3-Hochregulation alleine nicht zu einer Induktion von Zelldifferenzierungsprozessen führt. Zur Abklärung der Frage, ob Gal-3 Differenzierungsprozesse zumindest potenziert, wurde die PC12-Tet-On-Mutterzelllinie und die PC12-Zellklone PCG22 und -24 in Ab- oder Anwesenheit von 2µg/ml Dox für 14d mit 100ng/ml NGF kultiviert und das Neuritenwachstum lichtmikroskopisch untersucht. Es konnten keine Unterschiede im Auswuchsverhalten zwischen Dox-behandelten und unbehandelten Zellen festgestellt werden (Abb. 3.5).

Zur Beantwortung der Frage, ob Gal-3 andererseits die Proliferation neuraler Tumorzellen beeinflusst, wurden SKMG-5-Zellklone und PC12-Zellklone in Ab- oder Anwesenheit von 2µg/ml Dox kultiviert. Nach 72 und 144h wurden die Zellen geerntet und, mit Hilfe der anschließend mikroskopisch ermittelten Zellzahlen, die Verdopplungszeiten behandelter und unbehandelter Zellen berechnet. Die mittleren Verdopplungszeiten lagen sowohl für Gal-3-

exprimierende (i.e. Dox-behandelte) als auch für Kontrollzellen zwischen 38 und 42h. Die einzige Ausnahme bildete der SKMG-5-Zellklon JG9, der mit durchschnittlich 47h (bzw. 49h für Dox-behandelte Zellen) eine etwas höhere Verdopplungszeit aufwies. In keinem Fall gab es Evidenzen dafür, dass die erhöhte bzw. Neoexpression von Gal-3 die Proliferationsraten der Klone beeinflusst.

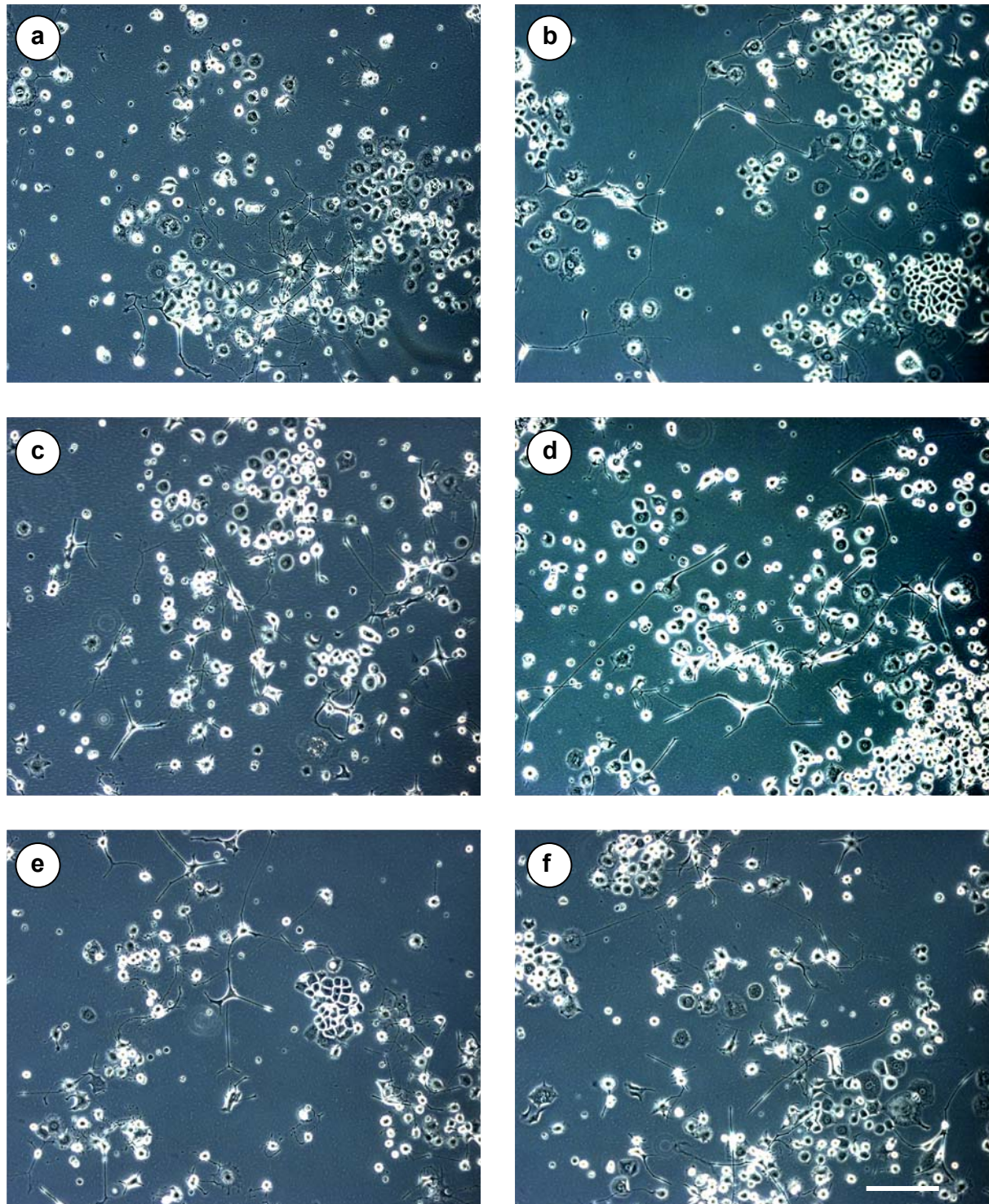


Abb. 3.5 NGF-abhängiges Neuritenauswachsen in PC12-Zellen in An- oder Abwesenheit einer Gal-3-Überexpression

PC12-TetON-Zellen (a, b), PCG22-Zellen (c, d) oder PCG24-Zellen (e, f) wurden in Ab- (a, c, e) oder Anwesenheit von 2 µg/ml Dox (b, d, f) für 14d mit 100ng/ml NGF inkubiert. Der Balken in f entspricht 100 µm.

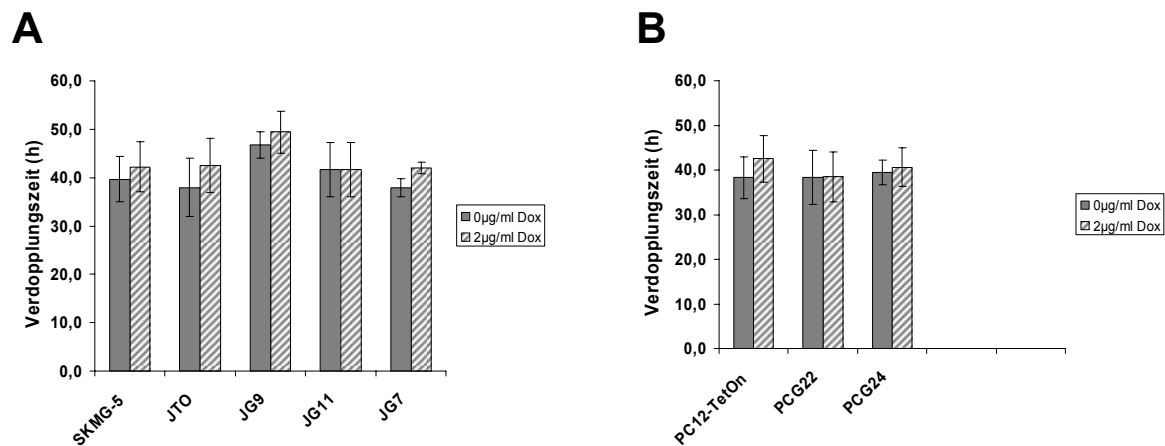


Abb. 3.6 Einfluss von Gal-3 auf die Proliferation neuraler Tumorzellen

Zellen wurden nach 72 und 144h Kultivierung in Ab- (graue Balken) oder Anwesenheit (schraffierte Balken) von 2 µg/ml Dox geerntet, die Zellzahlen mikroskopisch bestimmt und aus den ermittelten Werten die Verdopplungsraten berechnet. Angegeben sind die mittleren Verdopplungszeiten von Doppelbestimmungen aus 3 verschiedenen Experimenten.

3.2.3 Einfluss von Gal-3 auf das Absterbeverhalten neuraler Tumorzellen

3.2.3.1 Einfluss von Gal-3 auf das Absterbeverhalten von Gliomzelllinien

Obwohl die SKMG-5-Zelllinie die einzige bisher bekannte Gliomzelllinie ist, die kein Gal-3 exprimiert (Kuklinski et al., 2000), ist sie in vielen Parametern (i.e. Proliferations-, Adhäsions-, Spreading- und Migrationsverhalten) mit konstitutiv Gal-3-exprimierenden Gliomzellen vergleichbar (s. Abschnitt 3.1).

Aufgrund der bei nicht-neuralen Tumoren nachgewiesenen Relevanz von Gal-3 bei antiapoptotischen Prozessen wurde in der nachfolgenden Versuchsreihe das Absterbeverhalten von SKMG-5-Zellklonen in Ab- oder Anwesenheit einer ektopischen Gal-3-Expression untersucht. In einer ersten Versuchsreihe wurde analysiert, ob das Absterbeverhalten von SKMG-5-Zellen mit dem anderer, schon konstitutiv Gal-3 exprimierender, Gliomzellen vergleichbar ist. Hierzu wurde in SKMG-5-Zellen und drei weiteren Gliomzelllinien (i.e. A172, U178MG und U373MG) Zelltod auf vier verschiedene Weisen induziert: (i) Staurosporin (SSP) wurde als universeller Induktor eingesetzt, der in fast allen Zelltypen Apoptose auf nur teilweise geklärtem Wege induziert (Weil, et al., 1996); (ii) Betulinsäure (BA: betulinic acid) wurde verwendet, um eine mitochondrienvermittelte Apoptose zu induzieren; (ii) Fas-Antikörper (Fas-AB) wurden zur Induktion einer rezeptorvermittelten Apoptose eingesetzt; (iv) die Applikation hochenergetischer

Röntgenstrahlen wurde gewählt, da solch ein Verfahren auch bei der Therapie von Hirntumoren Anwendung findet.

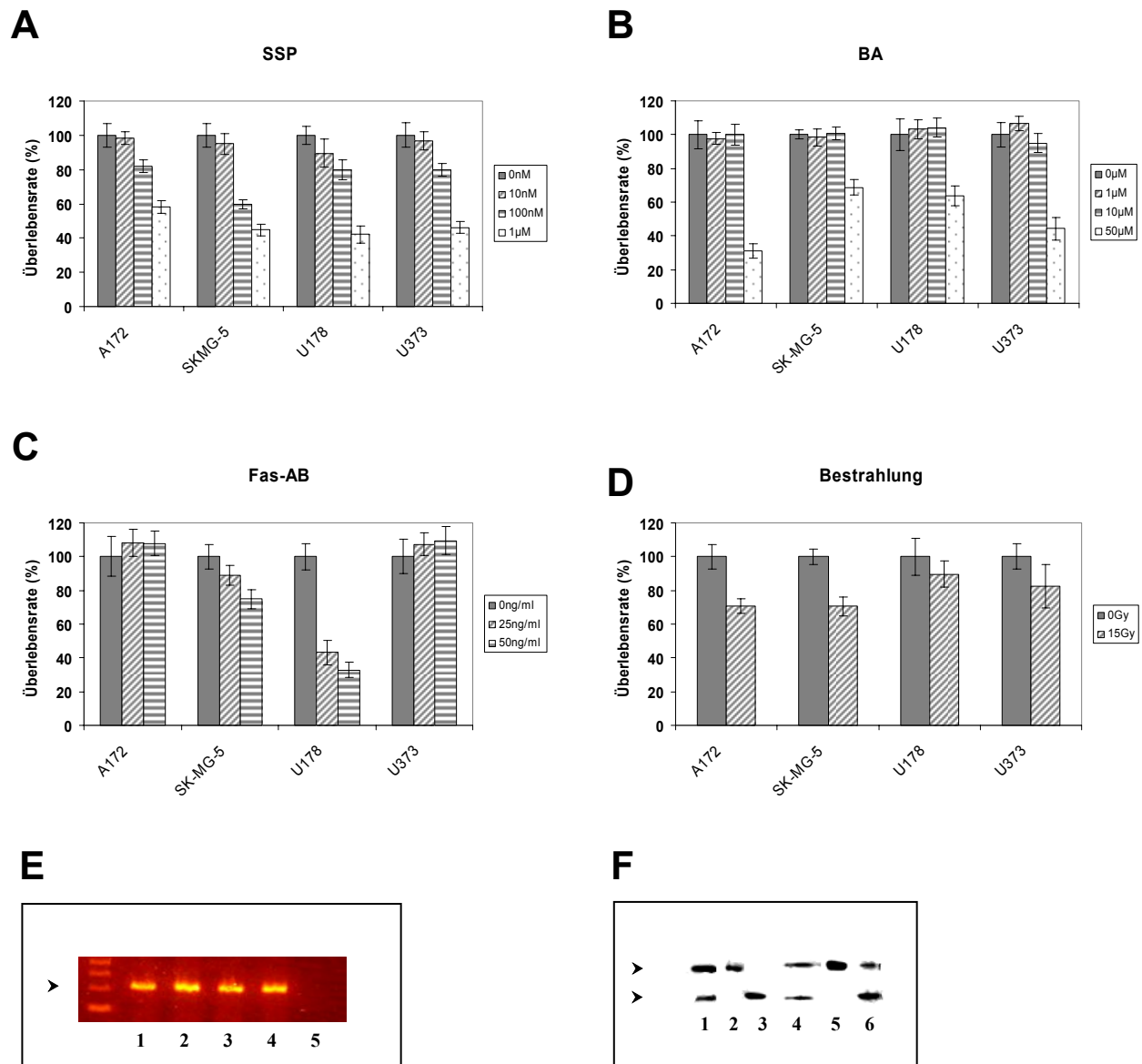


Abb. 3.7: Absterbeverhalten von SKMG-5 im Vergleich zu anderen Gliomzellen

(A) Gliomzellen wurden für 24h mit 0 (graue Balken), 0.01 (schraffierte Balken), 0.1 (gestreifte Balken) oder 1.0μM SSP (gepunktete Balken) inkubiert. (B) Die Gliomzellen wurden für 24h mit 0 (graue Balken), 1 (schraffierte Balken), 10 (gestreifte Balken) und 50μM BA (gepunktete Balken) inkubiert. (C) Die Gliomzellen wurden für 48h mit 0 (graue Balken), 25 (schraffierte Balken) oder 50ng/ml Fas-AB inkubiert. (D) Die Gliomzellen wurden 120h kultiviert (graue Balken), bzw. einer Strahlendosis von 15Gy ausgesetzt und anschliessend 120h kultiviert (schraffierte Balken). Die Überlebensraten/ Absterberaten in (A), (B), (C) und (D) wurden nach Färbung überlebender Zellen mit Kristall-Violett photometrisch ermittelt. Als Referenz (100%) dienten hierzu unbehandelte Zellen (graue Balken). Dargestellt sind die Mittelwerte von 8-fach-Bestimmungen ± Standardabweichung.

(E) RT-PCR-Analyse der Fas-Expression in A172- (1), SKMG-5- (2) U178MG- (3) und U373MG-Zellen (4); Spur 5: ddH₂O-Kontrolle; Der Pfeil kennzeichnet das 200bp-Fragment des Markers. Das PCR-Produkt hat eine Grösse von 215bp. (F) A172-Zellen wurden 24h mit Medium (1) oder SSP (2) inkubiert oder mit 15Gy bestrahlt (3) und 120h kultiviert. U373MG-Zellen wurden 24h mit Medium inkubiert (4) oder mit 15Gy bestrahlt und 120h kultiviert (5). Jurkat-Zellen wurden 24h mit 25ng/ml Fas-AB inkubiert (6). Zum Nachweis von PARP und PARP-Abbauprodukten wurde der Antikörper α-PARP verwendet. Die Pfeile kennzeichnen die Position von intaktem (113kD) und gespaltenem (89kD) PARP.

Da zur Analyse Rezeptorvermittelter Apoptose Fas-AB gewählt wurden, wurden die Zelllinien vorab auf mRNA-Niveau auf die Präsenz des Fas-Rezeptors hin untersucht. Hierbei konnte in allen verwendeten Zelllinien (A172, SKMG-5, U178MG und U373MG) der Fas-Rezeptor nachgewiesen werden (Abb. 3.7 E). Zur Analyse des Zelltodes wurden überlebende Zellen mit Kristall-Violett gefärbt und die Überlebensraten photometrisch ermittelt. In Abbildung. 3.7 sind die Graphen für diejenigen Inkubationszeiten dargestellt, bei denen die deutlichsten Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien auftraten (i.e. 24h für SSP und BA, 48h für Fas-AB, 120h für Bestrahlungsassays).

(i) Durch Inkubation mit SSP und BA konnte in allen untersuchten Zelllinien ein vehementer Zelltod induziert werden (Abb. 3.7 A und B). Eine 24stündige Behandlung mit $1\mu\text{M}$ SSP bewirkte bei SKMG-5-, U178MG- und U373MG eine Absterberate von ca. 60%. A172-Zellen waren mit einer Absterberate von 40% resistenter (Abb. 3.7 A). Auffällig ist, dass SKMG-5-Zellen im Gegensatz zu den anderen Zelllinien schon bei geringeren SSP-Konzentrationen ($0,1\mu\text{M}$) in hohem Maße absterben (53%) (Abb. 3.7).

(ii) Nach 24stündiger Inkubation mit BA lagen die Absterberaten der untersuchten Zelllinien zwischen 37 (U178MG) und 70% (A172). SKMG-5-Zellen lagen mit einer Absterberate von 45% im mittleren Bereich (Abb. 3.7 B).

(iii) Die Behandlung mit Fas-AB-Konzentrationen von 25 oder 50ng/ml bewirkte in U178MG-Zellen einen drastischen Zelltod (60-70%). A172- und U373MG-Zellen hingegen waren gegenüber dieser Art rezeptorvermittelter Apoptose resistent. SKMG-5-Zellen reagierten mit moderaten Absterberaten von durchschnittlich 20% (Abb. 3.7 C).

(iv) Nach Bestrahlung der Gliomzelllinien mit 15Gy bei einer Dosis von 2Gy/min war innerhalb der ersten 72h bei mikroskopischen Analysen kein Absterben der Zellen erkennbar und deutliche Anzeichen von Zelltod traten erst nach 120h auf. So wurden für A172- und SKMG-5-Zellen Absterberaten von 30 bzw. 40% gemessen. U178MG- und U373MG-Zellen hingegen waren unter den gewählten Bedingungen resistent gegenüber hochenergetischen Röntgenstrahlen (Abb. 3.7 D).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Absterbeverhalten unterschiedlicher Gliomzelllinien stark variiert (s. auch 3.1). In der Gliomzelllinie SKMG-5 lässt sich unter gewählten Bedingungen durch Inkubation mit SSP massiver, durch Inkubation mit BA und durch Bestrahlung moderater und durch Inkubation mit Fas-AB nur ein geringer Zelltod induzieren.

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob es sich bei dem gemessenen Zelltod um Apoptose handelt. Hierzu wurden Zelllysate unbehandelter, SSP-, BA- und Fas-

AB-behandelter und bestrahlter Zellen auf Abbauprodukte von Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase (PARP) hin analysiert. PARP wird durch bei apoptotischem Zelltod aktivierten Kaspasen gespalten, wobei unter anderem in ein 89kD-großes Fragment generiert wird.

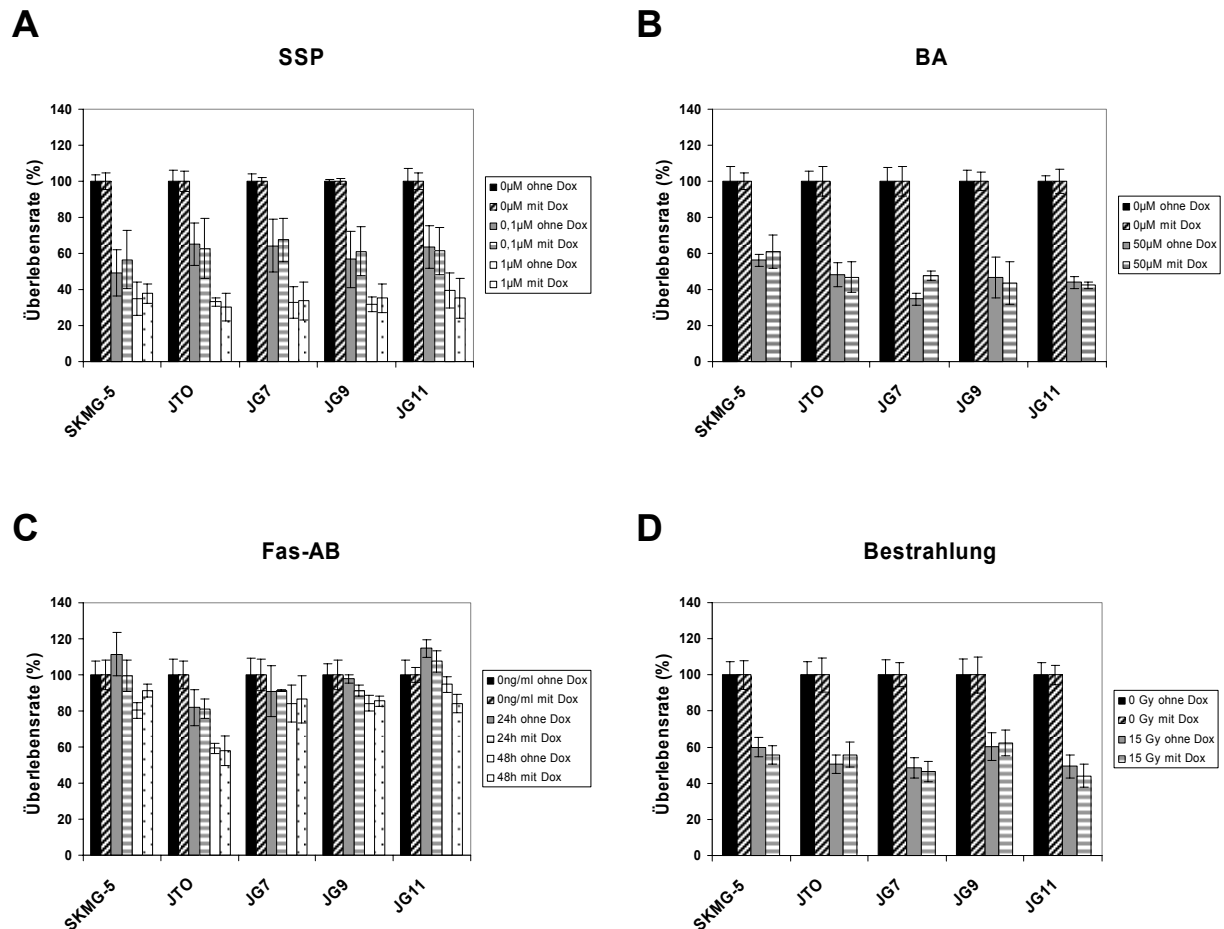


Abb. 3.8: Beeinflussung des Absterbeverhaltens von SKMG-5-Zellklonen durch Gal-3

(A) Die SKMG-5-Mutterzelllinie, die Tet-On-Zelllinie JTO sowie die drei Gal-3-induzierbaren Klone JG7, JG9 und JG11 wurden in Ab- oder Anwesenheit von 2µg/ml Dox für 24h mit 0 (schwarze/schraffierte Balken), 0.1 (graue/ gestreifte Balken), und 1.0µM SSP (weiße/ gepunktete Balken) inkubiert. (B) Die Zellen wurden in Ab- oder Anwesenheit von 2µg/ml Dox für 24h mit 0 (schwarze/schraffierte Balken) oder 50µM BA (graue/ gestreifte Balken) inkubiert. (C) Die Zellen wurden in Ab- oder Anwesenheit von 2µg/ml Dox für 0 (schwarze/schraffierte Balken), 24 (graue/ gestreifte Balken) oder 48h (weiße/ gepunktete Balken) mit 25ng/ml Fas-AB inkubiert. (D) Die Zellen wurden mit 2µg/ml Dox inkubiert und 168h kultiviert (schwarze/schraffierte Balken) bzw. mit 2µg/ml Dox inkubiert, nach 48h einer Strahlendosis von 15Gy ausgesetzt und für weitere 120h kultiviert (graue/ gestreifte Balken).

Die Überlebensraten/ Absterberaten wurden nach Färbung überlebender Zellen mit Kristall-Violett photometrisch ermittelt. Als Referenz (100%) dienten hierzu unbehandelte Zellen (schwarze Balken). Dargestellt sind die Mittelwerte von 8fach-Bestimmungen ± Standardabweichung aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten.

Intaktes (113 kD) PARP und das 89kD-Fragment können mittels α-PARP-Antikörper im Western-Blot visualisiert werden. Unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen konnte das 89kD-Fragment von PARP nur in Lysaten SSP-behandelter oder bestrahlter A172- (Abb. 3.6 E, Spur 3 und 4) bzw. U373MG-Zellen (Abb. 3.6 E, Spur 6) nachgewiesen werden.

Für alle anderen Analysen lässt sich somit keine Aussage darüber machen, ob die gemessenen Absterberaten auf apoptotischen und/oder nekrotischen Zelltod zurückzuführen sind.

Zur direkten Analyse des Einflusses von Gal-3 auf den Zelltod von Gliomzellen wurden die Klone JG7, JG9 und JG11 analog zu den oben beschriebenen Experimenten mit (i) SSP, (ii) BA und (iii) Fas-AB behandelt, bzw. (iv) hochenergetischen Röntgenstrahlen ausgesetzt. Aufgrund der erhaltenen Daten für die anderen Gliomzellen wurde SSP bei Konzentrationen von 0.1 und 1.0 μM , BA bei einer Konzentration von 50 μM eingesetzt. Da die Unterschiede der Absterberaten zwischen einer Behandlung mit 25 oder 50 ng Fas-AB nur gering waren, wurde für alle weiteren Experimente eine Konzentration von 25 ng/ml gewählt. Die Inkubationszeiten betrugen für SSP und BA 24 h, für Fas-AB 24 und 48 h. Die Analysen zur Beeinflussung des strahlungsinduzierten Zelltods durch Gal-3 erfolgten 120 h nach Gabe einer Dosis von 15 Gy. Alle Experimente erfolgten jeweils in Ab- oder Anwesenheit von 2 $\mu\text{g/ml}$ Dox. Als Kontrollen wurden sowohl die Mutterzelllinie SKMG-5 als auch die SKMG-5-Tet-On-Zelllinie JTO mitgeführt.

Unter diesen Versuchsbedingungen wurden folgende Ergebnisse erhalten: (i) SSP induziert bei einer Konzentration von 0.1 μM in den untersuchten Zellen eine Absterberate von durchschnittlich 40% (für die Mutterzelllinie SKMG-5 lag dieser Wert mit 50% etwas höher) (Abb. 3.8 A, graue Balken). Die Absterberate ließ sich durch Inkubation mit höheren Konzentrationen (1.0 μM) auf 65% steigern (Abb. 3.8 A, weiße Balken). Die Anwesenheit von Dox hatte bei keiner der untersuchten Zelllinien Einfluss auf den Zelltod (Abb. 3.8 A, schraffierte, gestreifte und gepunktete Balken im Vergleich zu schwarzen, grauen und weißen Balken).

(ii) Für BA lagen die Absterberaten für SKMG-5-Zellen bei 45, für JTO-, JG9- und JG11-Zellen bei 55 und für JG7-Zellen bei 65% (Abb. 3.8 B). Auch hier hatte Dox keinen Einfluss auf den Zelltod (Abb. 3.8 A, schraffierte, gestreifte und gepunktete Balken im Vergleich zu schwarzen, grauen und weißen Balken).

(iii) Abbildung 3.7 C zeigt, dass die JTO-Zelllinie im Vergleich zur SKMG-5-Mutterzelllinie eine erhöhte Sensitivität gegenüber Fas-AB-induziertem Zelltod aufweist. Die Inkubation mit Dox beeinflusst zwar das Absterbeverhalten der Klone nicht, jedoch ist auffällig, dass alle Gal-3-induzierbaren Klone wieder eine ähnliche Resistenz gegenüber Fas-AB wie die Mutterzelllinie zeigen. Berücksichtigt man, dass das Tet-System „leaky“ ist, wodurch eine geringe konstitutive Basisexpression von Gal-3 vorhanden ist, könnte dies tatsächlich eine protektive Wirkung von Gal-3 gegenüber Fas-AB-vermitteltem Zelltod andeuten. Zur

eindeutigen Beurteilung wären hier sicherlich noch weitere Experimente nötig (siehe Diskussion).

(iv) Der strahlungsvermittelte Zelltod wird nicht durch Gal-3 beeinflusst (Abbildung 3.7 D). Alle untersuchten Zellen weisen ähnliche Absterberaten auf (40-50%), die auch durch eine vorherige Inkubation mit Dox nicht verändert werden.

Zur Beurteilung, ob es sich bei dem untersuchten Zelltod um Apoptose handelt, wurden Lysate unbehandelter und behandelter Zellen mit Hilfe von Western-Blot-Analysen auf PARP-Spaltung hin untersucht. Weder in Lysaten SSP- noch BA- und Fas-AB-behandelter oder bestrahlter Zellen konnte das 89kD-Fragment nachgewiesen werden. Eine Aussage über die Art des Zelltods ist somit nicht möglich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Überexpression von Gal-3 keinen signifikanten Einfluss auf den durch verschiedene Stimuli induzierten Zelltod von SKMG-5-Gliomzellen hat.

3.2.3.2 Einfluss von Gal-3 auf das Absterbeverhalten von PC12-Zellen

Zur Analyse des Einflusses einer ektopischen Expression Gal-3 auf den Zelltod von PC12-Zellen wurden die Klone PCG22 und PCG24 analog zu den oben beschriebenen Experimenten für SKMG-5-Klone mit (i) SSP, (ii) BA und (iii) Fas-AB behandelt (wie für Gliomzelllinien konnte auch hier die Präsenz des Fas-Rezeptors mit Hilfe von RT-PCR-Analysen nachgewiesen werden (ohne Abbildung)), bzw. (iv) hochenergetischen Röntgenstrahlen ausgesetzt. SSP wurde bei Konzentrationen von 0.1 und 1.0 μM eingesetzt, BA bei einer Konzentration von 50 μM , Fas-AB bei 25 ng/ml. Die Inkubationszeiten betrugen für SSP und BA 24h, für Fas-AB 24 und 48h. Die Analysen zur Beeinflussung des strahlungsinduzierten Zelltods durch Gal-3 erfolgten 48, 92 und 120h nach Gabe einer Dosis von 15Gy. Alle Experimente erfolgten jeweils in Ab- oder Anwesenheit von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dox. Die Mutterzelllinie PC12-Tet-On wurde als Kontrolle mitgeführt. Als weitere Kontrolle diente die Zelllinie PC12-Bcl-2 (Schwarz et al., 2001). In dieser Zelllinie wird bei Inkubation mit 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dox die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 induziert (Schwarz et al., 2001).

(i) SSP induziert bei einer Konzentration von 0.1 μM in den PC12-Tet-On-Zellen sowie in dem Klon PCG24 eine 50%ige Absterberate. Die Absterberate des PCG22-Klons lag mit 30% deutlich niedriger (Abb. 3.9 A). In allen Fällen wurden nach vorheriger Inkubation mit Dox höhere Absterberaten erzielt (Abb. 3.9 A, schraffierte, gestreifte und gepunktete Balken im Vergleich zu schwarzen, grauen und weißen Balken). Da dieser Effekt auch bei den Gal-3-negativen Tet-On-Zellen auftrat, kann dies nicht als eine Konsequenz der Gal-3-Expression

gewertet werden. Bei einer Dosis von $1\mu\text{M}$ SSP wurden für Tet-On-, PCG22- und PCG24 offensichtlich die maximal nachweisbaren Absterberaten von 82% erreicht (Abb. 3.9 C, weiße und gepunktete Balken). Kontrollen mit Bcl-2-induzierbaren Zellen belegen, dass Unterschiede im Absterbeverhalten mit diesem Versuchssystem nachweisbar sind: bei einer Inkubation mit $0.1\mu\text{M}$ SSP weisen die Bcl-2-exprimierenden Zellen eine, im Gegensatz zu nicht-induzierten Kontrollzellen, um 20% geringere Absterberate auf. Bei einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ SSP betrug die Differenz sogar 60%.

(ii) Die Absterberaten nach BA-induziertem Zelltod variierten stark. Tet-On-Zellen wiesen mit fast 60% die höchsten Absterberaten auf. Geringer waren diese Werte für den PCG24-Klon

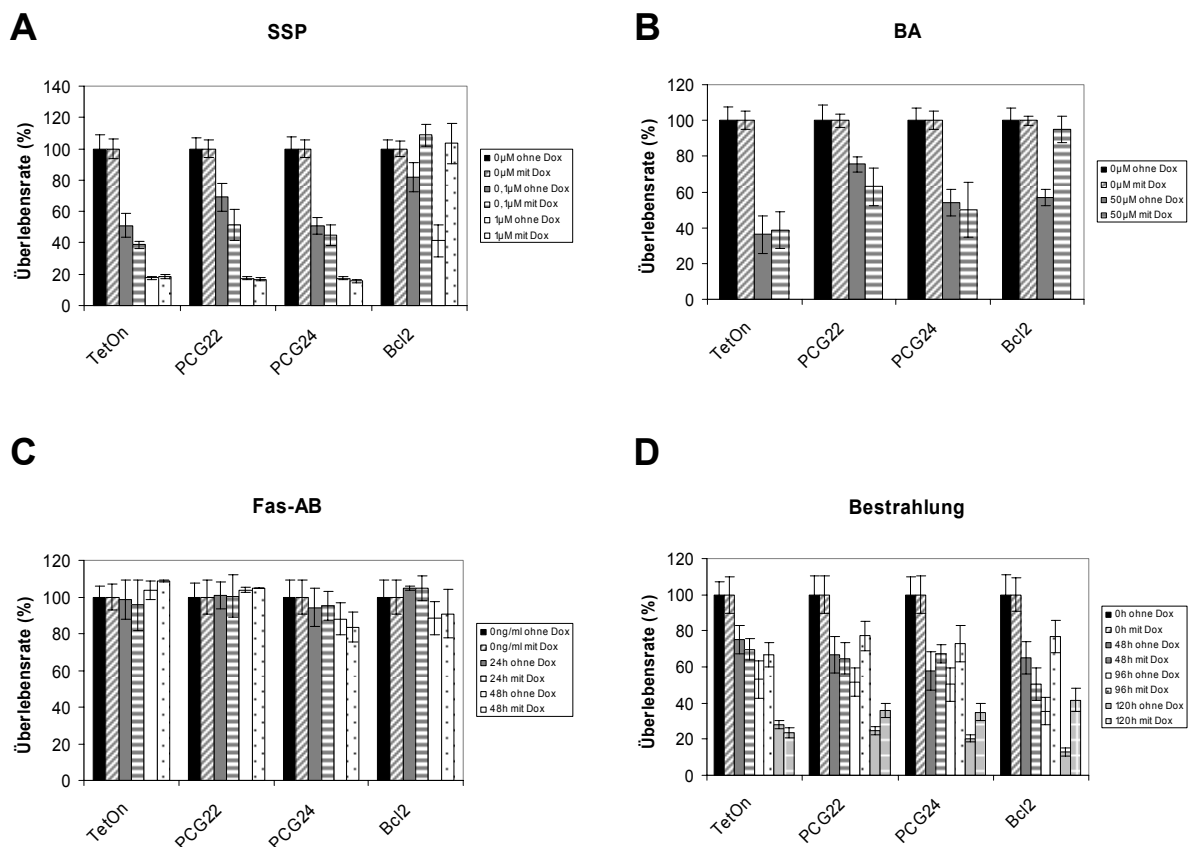


Abb. 3.9: Beeinflussung des Absterbeverhaltens von PC12-Zellklonen durch Gal-3

(A) Die PC12-Tet-On-Zelllinie, die Gal-3-induzierbaren Klone PCG22 und PCG24 und der Bcl-2 induzierbare PC12-Zellklon Bcl2 wurden in Ab- oder Anwesenheit von $2\mu\text{g/ml}$ Dox für 24h mit 0 (schwarze/schraffierte Balken), 0.1 (graue/ gestreifte Balken), und $1.0\mu\text{M}$ SSP (weiße/gepunktete Balken) inkubiert. (B) Die Zellen wurden in Ab- oder Anwesenheit von $2\mu\text{g/ml}$ Dox 24h mit 0 (schwarze/schraffierte Balken) oder $50\mu\text{M}$ BA (graue/ gestreifte Balken) inkubiert. (C) Die Zellen wurden in Ab- oder Anwesenheit von $2\mu\text{g/ml}$ Dox für 0 (schwarze/schraffierte Balken), 24 (graue/ gestreifte Balken) oder 48h (weiße/gepunktete Balken) mit 25ng/ml Fas-AB inkubiert. (D) Die Zellen wurden mit $2\mu\text{g/ml}$ Dox inkubiert und 168h kultiviert (schwarze/schraffierte Balken) bzw. mit $2\mu\text{g/ml}$ Dox inkubiert, nach 48h einer Strahlendosis von 15Gy ausgesetzt und für weitere 120h kultiviert (graue/ gestreifte Balken).

Die Überlebensraten/ Absterberaten wurden nach Färbung überlebender Zellen mit Kristall-Violett photometrisch ermittelt. Als Referenz (100%) dienten hierzu unbehandelte Zellen (schwarze Balken). Dargestellt sind die Mittelwerte von 8fach-Bestimmungen $\pm$ Standardabweichung aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten.

mit etwa 50% und bei PCG22-Zellen konnte nur eine Absterberate von ca. 30% ermittelt werden (Abb. 3.9 B). Dox hatte keinen nennenswerten Einfluss auf dieses Verhalten. Unter Berücksichtigung der „leakyness“ des Tet-Systems deutet sich, wie bei mit Fas-AB-behandelten Gliomzellen, auch hier die Möglichkeit eines protektiven Effekts von Gal-3 an, der jedoch mit Hilfe dieses Assays nicht eindeutig belegt werden kann. Die Rate BA-vermittelten Zelltods konnte durch Überexpression von Bcl-2 um 40% reduziert werden (Abb. 3.9 B, grauer im Vergleich zu gestreiftem Balken).

(iii) Analysen Fas-AB-behandelter Zellen ergaben, dass alle untersuchten PC12-Zellen resistent gegenüber Fas-vermitteltem Zelltod waren (Abb. 3.9 C).

(iv) In einem letzten Experiment wurde untersucht, ob Gal-3 einen Einfluss auf den strahlungsvermittelten Zelltod in PC12-Zellen hat. Die Gal-3-Expression wurde 48h vor Bestrahlung der Zellen durch Inkubation mit 2µg/ml Dox induziert. Absterberaten wurden 48, 96 und 120h nach einer Dosis von 15 Gy ermittelt. Abbildung 3.8. C zeigt, dass die Gal-3-Induktion durch Dox deutliche Auswirkungen auf die Absterberaten der PC12-Zellklone hat. Während 120h nach Bestrahlung nur noch 25% der Tet-On-Zellen und der nicht induzierten Klone lebten, waren dies bei Dox-behandelten Klonen ca. 10% mehr. Noch deutlicher war der Effekt nach 96h. Hier wiesen Dox-behandelte Klone eine um 15 (PCG22) bzw. 23% (PCG24) niedrigere Absterberate als unbehandelte Kontrollzellen auf.

Zur Beurteilung, ob es sich bei dem untersuchten Zelltod um Apoptose handelt, wurden auch hier die Lysate unbehandelter und behandelter Zellen mit Hilfe von Western-Blot-Analysen auf PARP-Degradation hin untersucht. Weder in Lysaten SSP- noch BA- und Fas-AB-behandelter oder bestrahlter Zellen konnte das apoptose-typische 89kD-Fragment nachgewiesen werden. Eine Aussage über die Art des Zelltods ist somit nicht möglich.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Gal-3 in PC12-Zellen keinen signifikanten Einfluss auf den durch SSP, BA oder Fas-AB vermittelten Zelltod hat. Demgegenüber vermindert Gal-3 signifikant die Absterberaten von PC12-Zellen nach Bestrahlung mit hochenergetischen Röntgenstrahlen.

4 Diskussion

In vielen nicht-neuralen Tumorzellen findet man eine konstitutive Aktivierung des Ras/MAPK-Signalwegs sowie eine Hochregulierung des tierischen Lektins Galectin-3. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von aktiviertem ERK1/2 (Kinasen des Ras/MAPK-Signalwegs), sowie Gal-3 für den malignen Phänotyp *neuraler* Tumorzellen untersucht, wobei primär solche Merkmale untersucht wurden, die in anderen Tumorzellen durch ERK1/2 und Gal-3 beeinflusst werden. Die Gliederung der folgenden Diskussion orientiert sich an der des Ergebnisteils.

4.1 Bedeutung von aktiviertem ERK1/2 für neurale Tumorzellen

4.1.1 Konstitutive Aktivierung von ERK1/2 in Gliomzelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass ERK1/2 in allen untersuchten Gliomzelllinien konstitutiv aktiviert und diese Aktivierung MEK1/2-abhängig ist. Hoshino und Mitarbeiter (1999, 2001) schlugen in ihren Arbeiten eine Klassifizierung von Gliomzelllinien gemäß des Grades ihrer ERK1/2-Aktivierung vor, wobei Typ-0-Zellen kein und Typ-III-Zellen sehr hohe pERK1/2-Expressionsniveaus aufwiesen. In Typ-II- und -III-Zellen führte die Inhibierung der ERK1/2-Aktivierung durch Inkubation mit U0126 (oder der vergleichbar wirkenden Substanz PD98059) zu einem partiellen oder vollständigen Proliferationsstopp. In Typ-III-Zellen wurde darüber hinaus durch pharmakologische Inhibierung der ERK1/2-Phosphorylierung Apoptose eingeleitet. In diesen Arbeiten wurden A172-Zellen den Typ-II und U251MG-Zellen den Typ-I-Zellen zugeordnet. Obwohl das experimentelle Design der hier vorliegenden Arbeit Abweichungen von dem von Hoshino und Mitarbeitern (1999, 2001) aufweist, entsprechen A172- und U251MG-Zellen, sowie alle anderen untersuchten Gliomzellen nach den von uns beobachteten Ergebnissen am ehesten Typ-II-Zellen: Konstitutive ERK1/2-Aktivierung in proliferierenden Zellen, partieller Proliferationsstopp aber kein apoptotischer Zelltod nach U0126-Behandlung.

Die Beobachtung, dass die ERK1/2-Phosphorylierung durch U0126 inhibierbar ist, belegt die Beteiligung von MEK1/2 an der konstitutiven ERK1/2-Aktivierung. Zwischen der jeweiligen Relevanz von MEK1 und MEK2 kann jedoch nicht unterschieden werden. USSAR und VOSS (2004) konnten an Kolonkarzinom-Zellen zeigen, dass das MEK1/ERK-Modul proliferationsfördernde Mechanismen aktiviert, während Signale über MEK2/ERK einen Zellzyklusstopp bewirken. Darüber hinaus kann auch das Expressionsniveau von pERK1/2 in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase und vom Zelltyp variieren: Während die pERK1/2-

Konzentrationen in NIH 3T3-Fibroblasten über den gesamten Zellzyklus hinweg konstant bleiben (Wright et al., 1999), beobachtet man bei HeLa- oder CHO-Zellen während der Mitosephase ein Absinken der ERK1/2-Konzentration, die jedoch in der G1-Phase schnell wieder ansteigt (Harding et al., 2003; Tamemoto et al., 1992). Da in der vorliegenden Arbeit nicht mit synchronisierten Zellen gearbeitet wurde, ist auch hier eine zellzyklusabhängige Regulation denkbar. Tatsächlich gibt es Evidenzen dafür, dass auch in Gliomzellen die Expression von pERK1/2 während der Mitosephase verhindert wird. So konnte durch immunhistochemische Analysen gezeigt werden, dass pERK1/2 zwar von der überwiegenden Zahl der Zellen in der Interphase exprimiert wird, Zellen in der Mitosephase jedoch nur wenig oder sogar überhaupt kein pERK1/2 aufwiesen (Mandell et al., 1998). Im Rahmen der zellulären Antwort auf eine ERK1/2-Aktivierung ist von Interesse, ob steigende pERK1/2-Konzentrationen nachfolgende Signale stetig verstärken, oder ob die Zellantwort eher nach dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ erfolgt. McKeigan und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Inkubation ruhender 3T3-Zellen mit PDGF zur ERK1/2-Aktivierung führt, wobei die Konzentration von PDGF positiv mit dem Expressionsniveau von pERK1/2 korreliert. Die zelluläre Antwort - der Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus – wurde jedoch nur dann ausgelöst, wenn die ERK1/2-Konzentration einen bestimmten Schwellenwert überschritt. Gleichzeitig kam es zu einem dramatischen Anstieg von nukleärem ERK1/2.

Die Tatsache, dass die konstitutive ERK1/2-Aktivierung durch U0126 inhibiert werden kann, unterstreicht die Bedeutung vorgeschalteter Signalkaskaden. Für Gliomzelllinien sind zwar bislang keine Mutationen des Ras-Gens selber bekannt, jedoch beobachtete man auch hier erhöhte Expressionslevel von aktiviertem Ras-GTP, was auf Mutationen im EGF-Rezeptor und dessen konstitutiver Aktivierung zurückzuführen sein könnte (Kapoor und O'Rourke, 2003, Lorimer und Lavictoire, 2001). Möglicherweise sind aber auch andere G-Proteine in erhöhtem Maße aktiviert und bewirken nachfolgend eine konstitutive ERK1/2-Phosphorylierung. Neben Störungen vorgeschalteter Signalwege müssen jedoch auch Abnormalitäten bei der ERK1/2-Inaktivierung, z.B. durch LGI1 und PTEN in Betracht gezogen werden. Der „Metastasierungssuppressor“ LGI1 inhibiert die ERK1/2-Phosphorylierung und die Zellproliferation glialer Tumore (Gu et al., 2005). Transfiziert man Zellen mit dem LGI1-Gen, die dieses Protein entweder endogen exprimieren (U87MG) oder nicht exprimieren (T98G und A172), reagieren nur die vormals LGI1-negativen Zellen mit einer Reduktion der Proliferationsraten. In T98G-Zellen führt die Expression von LGI1 zu einer Inhibierung der ERK1/2-Phosphorylierung. Fehlen von LGI1 kann jedoch nicht

alleinige Ursache für eine Hochregulierung von aktiviertem ERK1/2 sein, da auch Zelllinien mit endogener LGI1-Expression wie U87MG-Zellen hohe Mengen an pERK exprimieren. Auffällig ist jedoch, dass dies die Zelllinie mit der höchsten Verdopplungszeit, i.e. der niedrigsten Proliferationsrate ist.

In Glioblastomen, wie auch in vielen anderen Tumoren beobachtet man eine Deletion des PTEN-Gens (Simpson und Parsons, 2001). Auch in A172-, C6-, U87MG-, U178MG-, U251MG- und U373MG-Zellen fehlt diese Phosphatase. Analog zu LGI1 führt eine Reexpression von PTEN in Gliomzellen zu einer Inhibierung der ERK1/2-Phosphorylierung (Gu et al., 1998). Für U87MG-Zellen wurde sogar eine verminderte Malignität und ein Zellzyklusstopp nach Transfektion mit PTEN gezeigt (Li und Sun, 1998).

4.1.2 Aktiviertes ERK1/2 fördert die Zellproliferation glialer Tumorzellen

In allen untersuchten Gliomzelllinien führte eine Inhibierung der ERK1/2-Aktivierung zu gesteigerten Verdopplungszeiten, i.e. verminderten Proliferationsraten. Das Maß der Verminderung fiel allerdings für die verschiedenen Zelllinien sehr unterschiedlich aus, was auf eine sehr heterogene Feinregulation der Proliferationsprozesse in Tumorzellen schließen lässt. Diese Daten sind nicht sehr vielversprechend im Hinblick auf therapeutische Maßnahmen, die den Ras/MAPK-Signalweg angreifen. Solche Maßnahmen vermögen die Zellteilung nur zu verlangsamen, aber keinen Proliferationsstopp zu bewirken. Dennoch ist die Klärung der Frage von Interesse, welche molekularen Prozesse zu einer solchen partiellen Proliferationsinhibierung führen. Da alle Experimente mit nicht-synchronisierten Zellen durchgeführt wurden, sind zwei Szenarios denkbar:

(i) Es handelt sich um einen abgestuften Effekt, i.e. die Zellen reagieren unabhängig von der Zellzyklusphase auf eine abfallende pERK1/2-Konzentration mit einer Verlangsamung der Proliferation, oder aber (ii) es handelt sich um ein „Alles-oder Nichts-Prinzip“ und die Zellen sind nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus „anfällig“ für eine pERK1/2-Inhibierung. Zellen in nicht-sensitiven Phasen des Zellzyklus proliferieren nach U0126-Behandlung „normal“ weiter, während Zellen in sensitiven Zellzyklusphasen auf U0126-Behandlung mit einem Proliferationsstopp reagieren. In der Literatur findet man Hinweise für beide Mechanismen: In Fibroblasten scheint U0126 die Progression durch die G2/M-Phase zu verlangsamen (Ma et al., 2005), was für einen abgestuften Effekt spricht. Für Pankreas- oder Kolonkarzinomzellen konnte hingegen nach U0126-Behandlung ein Zellzyklusarrest in der G0/G1- bzw. der G1/S-Phase gezeigt werden (Gysin et al., 2005, Kobayashi et al., 2005), was die Existenz U0126-sensitiver Zellzyklusphasen belegt. Dieses zweite Erklärungsmodell würde aber auch bedeuten, dass Zelllinien mit niedrigeren Verdopplungszeiten mit einer

größeren Steigerung der Verdopplungszeiten nach Inhibierung der ERK1/2-Aktivierung reagieren müssten, da diese Zellen schneller in sensitive Zellzyklusphasen eintreten und einem Proliferationsstopp unterliegen würden. Da dies für die untersuchten Gliomzellen nicht der Fall ist (s. Tabelle 3.1), ist eher ein abgestufter Effekt anzunehmen. Eine mögliche Erklärung für eine nur partielle Inhibierung der Zellzyklusprogression könnte ein Zusammenwirken verschiedener Signalwege bei der Proliferationsregulation darstellen. So wurde z.B. die Vernetzung des Ras/MAPK- mit dem PI-3-K-Signalweg belegt (Mirza et al., 2004). Erwähnenswert ist, dass eine Inkubation mit U0126 in Gliomzelllinien nicht, wie in einigen anderen Tumorzellen (Cote et al., 2005), zum Zelltod führt.

4.1.3 Aktiviertes ERK1/2 erhöht das Migrationspotential glialer Tumorzellen

Für eine Reihe von Tumorzellen wie z.B. Mamma- (Krueger et al., 2001), Pankreaskarzinom- (Klemke et al., 1997) und Fibrosarkomzellen (Webb et al., 2000) konnte eine Beteiligung von pERK1/2 an Migrationsprozessen gezeigt werden. Zwar gibt es eine positive Korrelation zwischen ERK1/2-Aktivierung und Migrationspotential, jedoch bedeutet diese Beobachtung nicht gleichzeitig ein invasiveres Zellverhalten in vivo, wie Krueger und Mitarbeiter (2001) nachgewiesen haben.

Unter den Substraten von ERK1/2 findet man die Enzyme FAK (focal adhesion kinase) und MLCK. (Huang et al., 2004). Für eine Vielzahl von Tumorzellen wurde eine Korrelation der FAK-Aktivität mit dem Migrations- und Invasionspotential beobachtet (Parsons, 2003). Diesbezüglich findet man jedoch kontroverse Daten für Gliomzellen: in einigen Arbeiten ging die FAK-Aktivierung mit gesteigerten Proliferationsraten aber vermindertem Migrationspotential einher (Ding et al., 2005; Lipinski et al., 2003), während andere Studien eine MEK1/2/ERK1/2-unabhängige Migrationssteigerung durch FAK belegten (Giannone et al., 1999). In diesen Studien wurden jeweils unterschiedliche Gliomzelllinien verwendet. Möglicherweise belegen diese Resultate einmal mehr die genetische und molekulare Heterogenität von Tumorzellen.

Neben FAK aktiviert ERK1/2 die MLCK. Diese kontrolliert die Aktivität von Myosin II (Tan et al., 1992). Möglicherweise ist dies ein Mechanismus, über den ERK1/2 die Migration fördert. So konnten Gillespie und Mitarbeiter (1999) zeigen, dass die Migration von Gliomzellen durch Inhibitoren der Myosin II-Aktivierung vermindert wird.

Migratorisches Verhalten scheint gliale Tumore vor Apoptose zu schützen: migrierende Zellen aktivieren den PI-3-K-Signalweg und entgehen so der Camptothecin- und TRAIL-

induzierten Apoptose (Joy et al., 2003). Möglicherweise stellt eine konstitutive ERK1/2-Aktivierung einen ähnlichen Schutzmechanismus gegenüber verschiedenen Apoptoseinduktoren dar und eine Inhibierung mit U0126 könnte die Apoptoseresistenz glialer Tumore herabsetzen.

4.1.4 Aktiviertes ERK1/2 beeinflusst weder Zelladhäsion, noch Zellspreeding

Dieses Ergebnis liegt möglicherweise in der Wahl der experimentellen Rahmenbedingungen begründet. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen 4h vor Analyse des Adhäsions- und Spreadingverhaltens mit U0126 behandelt. Diese Zeitspanne ist für eine dramatische Änderung der Genexpression zu kurz. Im Gegensatz zu uns konnten Woods und Mitarbeiter (2001) zeigen, dass (i) eine Inhibierung der ERK1/2-Aktivierung in Melanom- und Pankreskarzinomzellen zu einer Herab- und (ii) die Aktivierung von Raf/ERK1/2 in 3T3-Fibroblasten zu einer Hochregulierung der $\alpha 6$ - und $\beta 3$ -Integrin-Expression führt, was mit einem veränderten Adhäsions- und Spreadingverhalten dieser Zellen einhergeht. Woods und Mitarbeiter zeigten die Induktion von $\alpha 6$ - und $\beta 3$ -Integrin nach 24stündiger Aktivierung von ERK1/2, die Repression dieser Integrine nach 48stündiger Inhibierung von ERK1/2. Möglicherweise könnte auch in Gliomzelllinien nach längeren Inkubationszeiten mit U0126 ein Verändertes Adhäsions- und Spreadingverhalten festgestellt werden.

Zusammenfassend zeigen die vorgestellten Daten, dass aktiviertes ERK1/2 den malignen Phänotyp glialer Tumorzellen durch Erhöhung des Proliferations- und Migrationspotentials manifestiert. Die Tatsache, dass durch U0126-Behandlung Proliferations- und Migrationsprozesse nur teilweise inhibiert, macht jedoch deutlich, dass neben dem Ras/MAPK-Signalweg zeitgleich weitere Signalwege unterbrochen werden müssten, um Proliferation und Migration dieser Zellen vollständig zu blockieren.

4.2 Funktionelle Relevanz von Gal-3 in neuronalen Tumorzellen

Eine Reihe von Studien haben Hinweise dafür geliefert, dass die Expression von Gal-3 funktionell an der Regulation proliferativer und apoptotischer Prozesse beteiligt ist. Untersuchungen, die unter anderem an PC12-Zellen durchgeführt wurden legten zudem die mögliche Beteiligung von Gal-3 an zellulären Differenzierungsprozessen nahe.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen, dass das proliferationsfördernde und antiapoptotische Potential von Gal-3 stark von den untersuchten Tumortypen abhängig ist und im Generellen für neurale Tumorzellen, wie gliale Tumorzellen und Phäochromozytomzellen nicht zutrifft (abgesehen von der protektiven Wirkung von Gal-3 für röntgenbestrahlte PC12-Zellen). Zudem ist eine differenzierungsfördernde Wirkung von Gal-3 nicht nachweisbar. Auf diese einzelnen Teilaspekte wird im nachfolgenden Diskussionsteil, insbesondere unter Berücksichtigung der vorhandenen Literatur, je separat eingegangen.

4.2.1 Ektopisches Gal-3 hat keinen Einfluss auf Differenzierungs- und Proliferationsprozesse neuraler Zelllinien

Die Expression von Gal-3 wird häufig im Rahmen verschiedener zellulärer Differenzierungsprozesse (z.B. Differenzierung von HS-Zellen, einigen Zellen des Immunsystems und PC12-Zellen) hochreguliert (Kuklinski et al., 2003; Liu et al., 1995; Maeda et al., 2003). Dies deutet darauf hin, dass die Expression von Gal-3 auch einen funktionellen Einfluss auf Differenzierungsprozesse hat. Eine Beteiligung von Gal-3 an Proliferationsprozessen wurde anhand verschiedener Zellsysteme belegt. In Abhängigkeit von seiner Lokalisation stimuliert Gal-3 die Zellproliferation über unterschiedliche Mechanismen. Extrazellulär kann das Lektin durch Bindung an Oberflächenglykoproteine als Mitogen wirken (Inohara et al., 1998), intrazellulär korreliert die zellteilungsfördernde Wirkung von Gal-3 mit seiner Lokalisation im Zellkern (Moutsatsos et al., 1987). Eine Repression von Gal-3 in Mammakarzinomzellen führt zu verminderter (Liu et al., 2002), eine Überexpression von Gal-3 in T-Zell-Leukämie-Zellen zu einer erhöhten Proliferation (Yang et al., 1996). Sowohl eine Beteiligung an Differenzierungs-, als auch an Proliferationsprozessen könnte zumindest partiell durch einen direkten oder indirekten Einfluss von Gal-3 auf die Expression von Zellzyklusgenen erklärt werden (siehe Kapitel 1.3.4); beispielsweise erhöht Gal-3 in Mammakarzinomzellen die Zyklin-D1-Promoteraktivität (Liu et al., 2002).

In unseren Experimenten konnten durch die ektopische Expression von Gal-3 weder Proliferations- noch Differenzierungsprozesse von PC12-Zellen beeinflusst werden. Im

Zusammenhang mit den mit PC12-Zellen durchgeführten Experimenten konnten wir wohl Aussagen darüber machen, dass (1) ektopisches Gal-3 alleinig weder die Proliferation noch die neuronale Differenzierung in undifferenzierten PC12-Zellen beeinflusst, (2) in neuronal differenzierten Zellen die Differenzierungskinetik und das Differenzierungsmaß (Bildung neuronaler Fortsätze) durch ektopisches Gal-3 nicht verändert wird.

Da die intrinsische Gal-3-Expression während NGF-abhängigen Differenzierungsprozessen in PC12-Zellen induziert wird, lassen sich keine Aussagen darüber machen, ob Gal-3 in diesem molekular veränderten Szenario von essentieller Bedeutung ist. Zur Klärung dieser Frage wäre die neuronale Differenzierung von PC12-Zellen in Abwesenheit von Gal-3 (z.B. über siRNA-Strategien) zu untersuchen.

Die funktionelle Einflussnahme von Gal-3 in Zellproliferations- und -differenzierungsprozesse, die mit Veränderungen der Genexpression einhergehen, setzt eine nukleäre Präsenz des Moleküls voraus (Shimura et al., 2004). Für PC12-, aber auch für Gliomzellen stehen hierzu detaillierte Untersuchungen noch aus. Die bisherigen Daten weisen auf ein heterogenes subzelluläres Expressionsmuster (Kern und/oder Zytoplasma) hin, das sowohl Zelltyp als auch von den Kulturbedingungen abhängig ist (Kuklinski et al., 2000; Kuklinski et al., 2003; Kuklinski und Probstmeier, unveröffentlichte Beobachtungen).

4.2.2 Ektopisches Gal-3 hat primär kein antiapoptotisches Potential in neuronalen Tumorzellen

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen überwiegend, dass ektopisches Gal-3 keinen protektiven Einfluss auf das apoptotische Absterben neuraler Tumorzellen hat. Eine Ausnahme bildet der strahlungsinduzierte Zelltod in PC12-Zellen.

Die fehlende protektive Wirkung von Gal-3 gegenüber apoptotischer Stimuli steht in deutlichem Kontrast zu bisherigen Literaturdaten im Rahmen antiapoptotischer Funktionen von Gal-3. So konnte eine antiapoptotische Wirkung dieses Lektins in Blasen- (Oka et al., 2005) Prostata- (Califice et al., 2004b) und Mammakarzinom- (Takenaka et al., 2004) sowie in B-Zell-Lymphom- (Hoyer et al., 2004) und T-Zell-Leukämie-Zellen (Yang et al., 1996) gezeigt werden. In diesen Studien wurde Apoptose auf verschiedene Weisen, wie über Antikörper-vermittelte Aktivierung von TRAIL- oder Fas-Rezeptoren, sowie durch Inkubation mit verschiedenen pharmakologischen Substanzen vermittelt.

Eine mögliche Erklärung für die fehlende protektive Wirkung von Gal-3 gegenüber apoptotischer Stimuli in neuronalen Tumorzellen liegt möglicherweise darin begründet, dass für

Gal-3 die zur Entfaltung seiner antiapoptotischen Funktionen relevanten Rahmenbedingungen nicht vorhanden sind:

- (i) Gal-3 muss intrazellulär exprimiert sein. Im Extrazellularraum entfaltet Gal-3 möglicherweise sogar proapoptotische Eigenschaften, wie Fukumori und Mitarbeiter (2003) an T-Zellen zeigen konnten.
- (ii) Gal-3 muss im Zytoplasma lokalisiert sein. Califice und Mitarbeiter (2004b) konnten zeigen, dass die Sensitivität gegenüber Apoptose durch zytoplasmatisches Gal-3 herabgesetzt, durch nukleäres Gal-3 jedoch erhöht wird.
- (iii) Gal-3 muss phosphoryliert sein. Yoshii und Mitarbeiter (2002) zeigten, dass Gal-3 in Mammakarzinomzellen nur dann Cisplatin-induzierte Apoptose verhindert, wenn es am Ser⁶-Rest phosphoryliert ist. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür findet man in einer Arbeit von Takenaka und Mitarbeitern (2004), die zeigen konnten, dass nur phosphoryliertes Gal-3 aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert wird. In Übereinstimmung mit Califice und Yoshii (2004b; 2002) belegten sie darüber hinaus, dass nur phosphoryliertes, i.e. zytoplasmatisches Gal-3, Mammakarzinomzellen vor Apoptose schützt.

Zusätzlich zu den aufgeführten Faktoren scheint die antiapoptotische Wirkung von Gal-3 von den jeweiligen apoptotischen Stimuli abzuhängen: Während Gal-3 BT-549-Mammakarzinomzellen sowohl vor Cisplatin-induzierter Apoptose und PARP-Abbau, als auch vor UV-B-induziertem PARP- Abbau schützt (Yoshii et al., 2002), erhöht das Lektin in diesen Zellen die Sensitivität gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose, PARP- Abbau und Kaspase- (-3, -8 und -9) Aktivierung (Lee et al., 2003). Gal-3 kann also nicht allgemeingültig als antiapoptotisch bezeichnet werden. Möglicherweise repräsentieren die vorliegenden Ergebnisse keinen Ausnahmefall und Gal-3 hat je abhängig von Zelltyp und Stimulus keinen, anti- oder proapoptotische Effekte im Kontext zellulären Absterbens.

Auch die im Ergebnisteil bezüglich des apoptotischen Zelltods nicht eindeutig interpretierbaren Daten, i.e. (i) Verringerte Absterberaten der SKMG-5-Klone im Vergleich zur Mutterzelllinie bei Fas-induzierter Apoptose (bei ausbleibendem Effekt von Dox) und (ii) verringerte Absterberaten der PC12-Zellklone im Vergleich zur Mutterzelllinie bei BA-induzierter Apoptose (bei ausbleibendem Effekt von Dox), deuten, wie nachfolgend begründet, nicht auf eine antiapoptotische Wirkung von Gal-3 hin:

Eine im Tet-On-System generell auftretende geringe Basisexpression der induzierbaren Gene auch in Abwesenheit von Dox hat in unserem Fall vermutlich keinen Einfluss auf das Absterbeverhalten der Zellen: Der unter (i) und (ii) beschriebene Effekt eines verminderten

Zelltods der Klone gegenüber den Mutterzelllinien wird durch eine Gal-3-Induktion nicht weiter verstärkt, und eine „Alles-oder-Nichts“-Wirkung von Gal-3 erscheint eher unwahrscheinlich. Überdies zeigen auch Bcl-2-induzierbare Zellen, die nachgewiesen „leaky“ sind (Dills, 2003), eine abgestufte Wirkung von Bcl-2: Der nicht-induzierte Klon weist gegenüber der Tet-On-Kontrollzelllinie eine um 20% verminderte Absterberate bei BA-vermittelter Apoptose auf. Bei Induktion mit Dox steigt diese Differenz weiter auf 40%.

Bekanntermaßen weisen verschiedene Klone einer Transfektion unterschiedliche zelluläre Phänotypen auf. So erhielten z.B. Nangia-Makka und Mitarbeiter (1995) durch Transfektion von Gal-3 in Mammakarzinomzellen Klone, deren Potential Tumore auszubilden und bei „Anchorage“-Versulst zu proliferieren stark variierte. Solche Unterschiede hängen meist mit dem Einbauort der Plasmide im Genom zusammen. Aufgrund eines fehlenden Effekts einer Dox-Inkubation ist dies wohl der plausibelste Erklärungsansatz für das abweichende Absterbeverhalten der Klone.

Die ektopische Expression von Gal-3 vermindert die Absterberate von PC12-Zellen nach Applikation hochenergetischer Röntgenstrahlen. Es werden verschieden Mechanismen diskutiert, über die Gal-3 seine oftmals antiapoptotische Wirkung entfaltet: Einige Autoren postulieren die Möglichkeit einer Interaktion mit Bcl-2 (Yang et al., 1996). Neurere Studien weisen überdies auf die Möglichkeit einer Interaktion von Gal-3 mit dem Fas-Rezeptor hin (Fukumori et al., 2004). Der für eine protektive Wirkung gegenüber ionisierender Strahlung wahrscheinlichste Mechanismus von Gal-3 scheint die potentielle Beeinflussung zellulärer Redoxsysteme zu sein (s.u.).

Nach dieser mehr allgemeinen Betrachtung soll im folgenden detailliert auf die einzelnen apoptosestimulierenden Substanzen (i) SSP, (ii) BA und (iii) Fas-AB, sowie (iv) hochenergetische Röntgenstrahlen eingegangen werden:

(i) SSP induziert in fast allen bislang untersuchten Zelltypen Apoptose, so auch in Gliomzellen und PC12-Zellen (Kruman et al., 1998; Stepczynska et al., 2001; Weil et al., 1996). Der Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Während viele Literaturdaten auf eine Aktivierung der mitochondrienvermittelten Apoptose mit Zytochrom C-Freisetzung und Kaspase-Aktivierung durch SSP hinweisen (Charlot et al., 2004; Victor et al., 2002), wurde in einer neueren Arbeit gezeigt, dass SSP in Melanomzellen, die resistent gegenüber mitochondrienvermittelter Apoptose sind, denn Zelltod über andere, kaspaseunabhängige

Mechanismen einleitet (Zhang et al., 2004). Eine ektoische Expression von Gal-3 in SKMG-5- und PC12-Zellen hatte keinen verhinderten SSP-vermittelten Zelltod zur Folge. Diese Ergebnisse stehen in auffälligen Kontrast zu Analysen in Mammakarzinom- und T-Zell-Leukämie-Zellen. In diesen Zellen bewirkte eine Überexpression von Gal-3 eindeutig eine Inhibierung der SSP-induzierten Apoptose (Yang et al., 1986; Yu et al., 2002). In den Mammakarzinomzellen konnte darüber hinaus eine Translokation von Gal-3 zur Mitochondrienmembran nach SSP-Gabe beobachtet werden (Yu et al., 2002). Legt man zu Grunde, dass Gal-3 seine antiapoptotische Wirkung an den Mitochondrien entfaltet (s.u.), sind für das Fehlen eines antiapoptotischen Effekts in SKMG-5- und PC12-Zellen zwei Erklärungen denkbar: (i) In diesen Zellen wird Apoptose über einen mitochondrienunabhängigen Weg eingeleitet oder (ii) Gal-3 ist nicht an den Mitochondrien lokalisiert. Zumindest für PC-12-Zellen wurde eine Beteiligung der Mitochondrien bei der SSP-induzierten Apoptose gezeigt, so dass wohl der zweite Erklärungsversuch naheliegender ist. Möglicherweise ist in den transfizierten Zellen die Translokation von Gal-3 gestört.

(ii) BA ist ein natürlich vorkommendes pentazyklisches Triterpenoid, das Apoptose sehr wahrscheinlich über einen mitochondrienvermittelten Signalweg induziert (Eiznahmer und Xu, 2004). In Gliomzellen kann die BA-induzierte Apoptose durch Bcl-2 inhibiert werden (Wick et al., 1999). Über eine Behandlung von PC12-Zellen mit BA gibt es noch keine Literaturdaten, jedoch weisen unsere Ergebnisse an Bcl-2-induzierbaren PC12-Zellen darauf hin, dass auch hier ein mitochondrialer Weg beteiligt sein könnte, da Bcl-2 die BA-vermittelte Apoptose inhibiert. Möglicherweise liegt die Erklärung für einen fehlenden Effekt von ektoischem Gal-3 auf BA-induzierte Apoptose auch hier, wie für SSP, in einer gestörten Translokation des Lektins in den transfizierten Zellen.

(iii) In Bezug auf Fas-vermittelte Apoptose können Tumorzellen in so genannte Typ-I- und Typ-II-Zellen eingeteilt werden: In Typ-I-Zellen werden vom Fas-Rezeptor ausgehende Apoptosesignale zu Kaspase-8 weitergeleitet, die ihrerseits Kaspase-3 aktiviert. In Typ-II Zellen reicht der Aktivierungsstatus von Kaspase-8 hierzu nicht aus und zur Kaspase-3-Aktivierung ist eine vorherige Aktivierung von Mitochondrien und damit einhergehende Freisetzung von Zytochrom C vonnöten (s. Kapitel 1.1.1.1). In Typ-II-Zellen ist zusätzlich neben einer verzögerten Kaspase-8- und -3-Aktivierung der PARP-Abbaus verzögert. Darüber hinaus gibt es Evidenzen für weitere molekulare Unterschiede zwischen Typ-I- und Typ-II-Zellen. So führt eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) nur in Typ-II-Zellen zu

einer Inhibierung Fas-vermittelter Apoptose und nur in Typ-II-Zellen führt Inkubation mit C₂-Ceramid zu Apoptose (Scaffidi et al., 1998). Das zelluläre Ergebnis der verschiedenen Signalwegen in Typ-I- oder Typ-II-Zellen, i.e. Kinetik und Ausmaß des Zelltodes, ist jedoch vergleichbar (Scaffidi et al., 1998).

In humanen Lymphoblastoid- und T-Zellen konnte eine Gal-3-Expression exklusiv für Typ-I-Zellen gezeigt werden. Eine ektopische Expression von Gal-3 in Typ-II-Zellen führte dazu, dass diese den Phänotyp von Typ-I-Zellen annahmen. In diesem Szenario entfaltet Gal-3 - möglicherweise durch Interaktion mit Fas - eine apoptosefördernde Wirkung und zwar unabhängig von einer Mitochondrienaktivierung (Fukumori et al., 2004).

In SKMG-5-Zellen ist sowohl Bcl-2 (Zwicker, 2004) als auch Fas exprimiert (s. Abb. 3.7 E), aber eine Neoexpression von Gal-3 hat keinen Einfluss auf das Absterbeverhalten dieser Zellen. Es ist nicht auszuschließen, dass Gal-3 den Phänotyp von SKMG-5-Zellen von einer Typ-II- in eine Typ-I-Zelle ändert. Da jedoch die Aktivierung der Kaspasen 8 und 3 nicht untersucht und ein PARP-Abbau nicht nachgewiesen werden konnte, sind Aussagen hierüber nicht möglich.

Im Gegensatz dazu wurde in anderen Arbeiten bei der SSP-induzierten Apoptose eine Translokation von Gal-3 zur Mitochondrienmembran beobachtet, wo das Lektin scheinbar die Zytochrom C-Freisetzung und nachfolgend die Kaspase-3-Aktivierung verhinderte (Yu et al., 2002). Betrachtet man, dass (i) die antiapoptotische Wirkung von Bcl-2 hauptsächlich auf einem Schutz der Mitochondrienmembran und einer Inhibierung der Zytochrom C-Freisetzung beruht (Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997), (ii) eine Bcl-2-Überexpression nur Typ-II-Zellen vor Fas-induzierter Apoptose schützt (Fukumori et al., 2004), (iii) Gal-3 auf Grund von Sequenzhomologien (beide besitzen ein NWGR-Motiv) ein möglicher Bindungspartner von Bcl-2 ist (Akahani et al., 1997; Yang et al., 1996) und (iv) Mutationen im NWGR-Motiv von Gal-3 seine antiapoptotischen Eigenschaften verändert (Akahani et al., 1997; Kim et al., 1999), liegt der Schluss nahe, dass Gal-3 seine antiapoptotische Wirkung auf Mitochondrienebene entfaltet. Es ist demnach denkbar, dass Gal-3 speziell bei der Fas-vermittelten Apoptose in ein und derselben Zelle proapoptotische und antiapoptotische Wirkungen entfaltet.

PC12-Zellen zeigen trotz Expression von Fas eine Resistenz gegenüber Fas-induzierter Apoptose. Dieses hier gezeigte Ergebnis steht im Widerspruch zu bisherigen Literaturdaten, bei denen in PC12-Zellen eine Apoptoseinduktion mittels Fas-AB erzielt werden konnte (Wu et al., 2004). PC12-Zellen ändern bekanntermaßen leicht ihren Geno- und Phänotyp, was Clementi und Mitarbeiter (1992) anhand 16 verschiedener PC12-Zellklone belegten.

Möglicherweise handelt es sich bei dem untersuchten Tet-On-Zellklon um eine PC12-Linie mit erworbener Resistenz gegenüber Fas-vermittelter Apoptose.

(iv) Man nimmt an, dass die biologische Wirkung ionisierender Strahlen hauptsächlich auf Schädigungen der DNA zurückzuführen ist. Die Strahlenwirkung erfolgt entweder direkt durch Energieabsorption vom Molekül selbst, oder indirekt über diffusible Radikale. Die intrinsische Strahlenempfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlen ist genetisch bestimmt und hängt unter anderem davon ab, wie das DNA-Reparatursystem einer Zelle funktioniert. Man spricht in diesem Zusammenhang von der „Erholung vom subletalen Strahlenschaden“ SLDR (sublethal damage repair) (Allalunis-Turner et al., 1995). Neben einer positiven Korrelation von SLDR und Strahlenresistenz führt auch die Expression von mutiertem p53 zu einer erhöhten Strahlenresistenz (Pekkola-Heino et al., 1998). Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit wieder: U373MG-Zellen, die mutiertes p53 exprimieren, sind resistent gegenüber hochenergetischen Röntgenstrahlen, wohingegen Wildtyp-p53-exprimierende A172-Zellen nach Applikation ionisierender Strahlen apoptotisch absterben. Für U178MG- und SKMG-5-Zellen liegen keine Daten bezüglich p53 vor. Anhand des Absterbeverhaltens nach Bestrahlung könnte man eine Expression von mutiertem p53 für U178MG-Zellen und eine Expression von Wildtyp-p53 für SKMG-5-Zellen annehmen.

Die Ergebnisse zur Wirkung von Gal-3 bei strahlungsinduziertem Zelltod sind für SKMG-5- und PC12-Zellen widersprüchlich: während das Lektin in PC12-Zellen antiapoptotisch wirkt, zeigt es in SKMG-5-Zellen keine Wirkung. Dies liegt möglicherweise darin begründet, dass Gal-3 in SKMG-5-Zellen schon durch Bestrahlung induziert wird. So konnten Miyakoshi und Yagi (2000) in Gliomzellen einen Anstieg von nukleärem NF- κ -B nach Applikation hochenergetischer Röntgenstrahlen feststellen. Es gibt Evidenzen, dass dieser Transkriptionsfaktor die Gal-3-Expression reguliert (Liu et al., 2004). Dunic und Mitarbeiter (2002) zeigten sogar eine NF- κ -B-abhängige Hochregulierung der Gal-3-Expression nach UV-Bestrahlung in Gliomzellen.

Möglicherweise inhibiert Gal-3 PC12-Zellen vor strahlungsinduziertem Zelltod durch einen indirekten Schutz vor freien Radikalen. Zwar gibt es keinen direkten Beweis für eine Beeinflussung von Redoxsystemen durch Gal-3, jedoch lassen verschiedene Untersuchungen Zusammenhänge vermuten: Lee und Mitarbeiter (2003) fanden heraus, dass (i) eine Überexpression von Gal-3 in Mammakarzinomzellen BT549 mit einer Erhöhung des Glutathiongehalts dieser Zellen einhergeht. Glutathion dient als Radikalfänger und könnte so DNA und Mitochondrien vor strahlungsinduzierten Schäden schützen. Darüber hinaus führt

(ii) eine Überexpression von Gal-3 in der Mammakarzinomzelllinie Evsa-T nach verschiedenen Apoptosestimuli zu einer verzögerten Erschöpfung des GSH-Gehalts der Zellen und dadurch zum Schutz des Transmembranpotentials von Mitochondrien (Matarese et al., 2000). (iii) In PC12-Zellen führte eine Inkubation mit SSP zu einer Akkumulation freier Radikale an den Mitochondrien und zum Verlust der Mitochondrienfunktion. Diese Effekte konnten durch NGF verhindert werden (Kruman et al., 1998), NGF bewirkt eine Hochregulierung von Gal-3 (Kuklinski et al., 2003). Dieses Erklärungsmodell stünde allerdings im Widerspruch zu dem Ergebnis, dass Gal-3 keinen protektiven Effekt gegenüber SSP-induzierter Apoptose hatte und macht deutlich, dass Studien zur Lokalisation von Gal-3 in den untersuchten Zellen zur Beantwortung solcher Fragen unerlässlich sind.

Die hier vorgestellten Arbeiten zeigen, dass eine Gal-3 Überexpression in neuronalen Tumorzellen weder (i) Einfluss auf Differenzierungs- noch (ii) auf Proliferationsprozesse hat und darüber hinaus (iii) nicht über ein primär antiapoptotisches Potential in diesen Tumorzellen verfügt. Die Arbeiten weisen aber auch auf zukünftige Forschungsfelder hin, die für eine weitere Abklärung des funktionellen Potentials von Gal-3 in Gliomzellen bearbeitet werden sollten:

- (1) Untersuchungen zum subzellulären Lokalisationsmuster von Gal-3 in einem großen Repertoire von Gliomzelllinien und dessen Abhängigkeit von den gewählten experimentellen Bedingungen (i.e. pro-/antiapoptotisch)
- (2) Manipulation der Gal-3-Lokalisation durch gentechnisch eingebrachte molekulare Mutanten, die entweder keine Phosphorylierungsstelle (Ser⁶) oder kein funktionelles NWGR-Motiv aufweisen
- (3) Repression der Gal-3-Expression in Gal-3 konstitutiv exprimierenden Gliomzellen über siRNA-Strategien und Analyse ihre Auswirkung auf das proliferative/apoptotische Potential dieser Tumorzellen.

5 Zusammenfassung

Wie bei vielen Tumorerkrankungen geht auch die Entstehung neuraler Tumore mit einer Vielzahl molekularer und zellulärer Veränderungen einher. Diese spiegelt sich auf molekularem Niveau beispielsweise durch veränderte Genexpressionsmuster wieder, die oftmals, aber nicht immer, auf die Aktivierung von Signaltransduktionsketten zurück zu führen sind. Auf zellulärer Ebene finden sich unter anderem Erhöhungen der Proliferationsrate und Zellmotilität, sowie Reduktionen des natürlichen Absterbepotentials.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Relevanz von (i) aktiviertem MEK1/2/ERK1/2 (Stellgliedern des Ras/MAPK Signalwegs) und (ii) Galectin-3 (einem oftmals in Tumoren exprimierten tierischen Lektins) für den malignen Phänotyp neuraler Tumorzellen untersucht. Sowohl eine Aktivierung des Ras/MAPK-Weges, als auch eine Expression von Galectin-3 beeinflussen bekanntermaßen positiv den malignen Phänotyp nicht-neuraler Tumorzellen (Erhöhung der Proliferations-/Migrationsrate, Erniedrigung der Absterberate bei verschiedenen auch therapeutisch genutzten Stimuli). Für neurale Tumorzellen standen vergleichbare Ergebnisse noch aus, jedoch waren folgende Befunde bekannt:

- (i) In PC12-Zellen wird die Galectin-3 Expression über den Ras/MAPK-Signalweg positiv reguliert. Eine Aktivierung dieses Signalwegs führt zur neuronalen Differenzierung der Zellen, und geht mit einem Proliferationsstopp einher
- (ii) In der überwiegenden Mehrzahl von Gliomzellen kommt es, im Gegensatz zu normalen glialen Zellen, in vivo und in vitro zu einer Neoexpression von Galectin-3. Zudem gab es Hinweise, dass in Gliomzellen in vivo eine Aktivierung des Ras/MAPK-Signalwegs präsent ist.

Folgende Fragen sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit geklärt werden, nachdem Vorstudien ergeben hatten, dass die Expression von Galectin-3 in glialen Tumorzellen nicht über den Ras/MAPK-Weg reguliert wird (Mocigemba, 2001):

- (i) In welchem Aktivierungszustand befinden sich Endglieder des Ras/MAPK-Weges in glialen Tumorzellen und welche Auswirkungen hat deren Expression auf den malignen Phänotyp dieser Zellen?
- (ii) Welche Auswirkungen auf den malignen Phänotyp von glialen Tumorzellen und Phaeochromocytomzellen hat die Überexpression von Galectin-3?

Zur Analyse des ersten Teilaspekts wurde der Ras/MAPK Signalweg auf der Ebene von MEK1/2 in Gliomzellen pharmakologisch inhibiert. Zur Analyse des zweiten Teilaspekts

wurde Galectin-3 in Gliom- (SKMG-5) und Phaeochromocytomzellen (PC12) mit Hilfe des Tet-On-Systems induzierbar überexprimiert. Zur generellen Analyse des malignen Phänotyps wurden primär solche Merkmale untersucht, die bei anderen Tumorzellen bekanntermaßen entweder über den Ras/MAPK-Weg oder die Expression von Galectin-3 beeinflusst werden.

Im Wesentlichen wurden durch diese Vorgehensweise folgende Ergebnisse erhalten:

(1) ERK1/2, terminale Stellglieder des Ras/MAPK-Signalwegs, lagen in allen der elf untersuchten Gliomzelllinien konstitutiv exprimiert vor. Inhibierung der vorgeschalteten MEK1/2-Kinasen in den gleichen Gliomzellen führte zu einer Reduktion der Proliferationsraten (durchschnittliche Erhöhung der Verdopplungszeit um 100%) und zu einer Verminderung des Migrationspotentials (eine um etwa 40% verringerte Flächenokkupation) in sieben der elf Zelllinien. In drei weiteren Zelllinien war zudem eine verminderte Migrationspotenz erkennbar, die jedoch nicht die Signifikanzkriterien erfüllte. Im Gegensatz hierzu blieb das Adhäsions- und Abflachungs- („Spreading“) Potential der glialen Tumorzellen bei Inhibierung der MEK1/2-Kinasen unbeeinflusst.

(2) Die induzierbare Überexpression von Galectin-3 in der Galectin-3-negativen glialen Tumorzelllinie SKMG-5 (die einzige bisher bekannte gliale Tumorzelllinie mit diesem molekularen Phänotyp) zeigte keinen Einfluss auf deren Proliferationsverhalten. Auch die Rate des apoptotischen Zelltods blieb bei Induktion durch Betulinsäure, Staurosporin, Gabe von Fas-Antikörpern oder Applikation hochenergetischer Röntgenstrahlung unverändert, was in deutlichem Unterschied zu nicht-neuralen Tumorzellen steht.

(3) Die induzierbare Überexpression von Galectin-3 in PC12-Zellen, die konstitutiv ein niedriges Basisniveau an Galectin-3 aufzeigen, zeigte keinen Einfluss auf das Proliferations- aber auch nicht auf das Differenzierungsverhalten dieser Zelllinie. Die Rate apoptotischen Zelltods blieb bei Induktion durch Betulinsäure, Staurosporin und Gabe von Fas-Antikörper unverändert. Bei Applikation von hochenergetischer Röntgenstrahlung hingegen, war eine um 20% verminderte Absterberate nachweisbar.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse dass ein aktivierter Ras/MAPK-Weg am malignen Phänotyp glialer Tumorzellen in signifikantem Maße beteiligt ist. Das in anderen Tumoren, wie beispielsweise in Mammakarzinomen, dominant antiapoptotisch wirkende Galectin-3 scheint hingegen in neuralen Tumoren solch eine Funktion primär nicht wahrzunehmen.

6 Literaturverzeichnis

- Acosta-Rodriguez EV, Montes CL, Motran CC, Zuniga EI, Liu FT, Rabinovich GA, Gruppi A. 2004
Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection.
J Immunol 172:493-502
- Adams JM. 2003
Ways of dying: multiple pathways to apoptosis.
Genes Dev 17:2481-2495
- Agrwal N, Wang JL, Voss PG. 1989
Carbohydrate-binding protein 35. Levels of transcription and mRNA accumulation in quiescent and proliferating cells.
J Biol Chem 264:17236-17242.
- Ahlemeyer B, Klumpp S, Krieglstein J. 2002
Release of cytochrome c into the extracellular space contributes to neuronal apoptosis induced by staurosporine.
Brain Res 934:107-116
- Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim HR, Raz A. 1997
Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family.
Cancer Res 57:5272-5276
- Albrandt K, Orida NK, Liu FT. 1987
An IgE-binding protein with a distinctive repetitive sequence and homology with an IgG receptor.
Proc Natl Acad Sci U S A 84, 6859-6863
- Allalunis-Turner MJ, Zia PK, Barron GM, Mirzayans R, Day RS 3rd. 1995
Radiation-induced DNA damage and repair in cells of a radiosensitive human malignant glioma cell line.
Radiat Res 144:288-293
- Barondes SH. 1984
Soluble lectins: a new class of extracellular proteins.
Science 223, 1259-1264
- Barondes SH, Cooper DNW, Gitt MA, Leffer H. 1994
Galectins: structure and function of a large family of animal lectins.
J.Biol.Chem **269**, 20807-20810
- Barry OP, Mullan B, Sheehan D, Kazanietz MG, Shanahan F, Collins JK, O'Sullivan GC. 2001
Constitutive ERK1/2 activation in esophagogastric rib bone marrow micrometastatic cells is MEK-independent.
J Biol Chem 276:15537-15546
- Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. 1968
Differentiated rat glial cell strain in tissue culture.
Science 161, 370-371
- Bhaskara VK, Panigrahi M, Challa S, Babu PP. 2005
Comparative status of activated ERK1/2 and PARP cleavage in human gliomas.
Neuropathology 25:48-53
- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. 1999
Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms.
Science 286:1358-62.
- Boveri, T. 1914
Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren.
(Gustav Fischer, Jena)

- Bradford MM. 1976
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem 72, 248-254
- Bredel M, Pollack IF. 1999
The p21-Ras signal transduction pathway and growth regulation in human high-grade gliomas.
Brain Res Brain Res Rev 29:232-349
- Bresalier RS, Yan PS, Byrd JC, Lotan R, Raz A. 1997
Expression of the endogenous galactose-binding protein galectin-3 correlates with the malignant potential of tumors in the central nervous system.
Cancer 80:776-787
- Califice S, Castronovo V, Van Den Brule F. 2004 (A)
Galectin-3 and cancer.
Int J Oncol 25:983-992
- Califice S, Castronovo V, Bracke M, van den Brule F. 2004 (B)
Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3.
Oncogene 23:7527-7536
- Ceruti S, Mazzola A, Abbracchio MP. 2005
Resistance of human astrocytoma cells to apoptosis induced by mitochondria-damaging agents: possible implications for anticancer therapy.
J Pharmacol Exp Ther 314, 825-837
- Charlot JF, Pretet JL, Haughey C, Mougin C. 2004
Mitochondrial translocation of p53 and mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) dissipation are early events in staurosporine-induced apoptosis of wild type and mutated p53 epithelial cells.
Apoptosis 9:333-343
- Chiariotti L, Salvatore P, Benvenuto G, Bruni CB. 1999
Control of galectin gene expression.
Biochimie 81, 381-388
- Choi JH, Chun KH, Raz A, Lotan R. 2004
Inhibition of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in breast cancer cells by galectin-3.
Cancer Biol Ther 3:447-452
- Clementi E, Racchetti G, Zacchetti D, Panzeri MC, Meldolesi J. 1992
Differential Expression of Markers and Activities in a Group of PC12 Nerve Cell Clones.
Eur J Neurosci 4:944-953
- Colnot C, Sidhu SS, Poirier F, Balmain N. 1999
Cellular and subcellular distribution of galectin-3 in the epiphyseal cartilage and bone of fetal and neonatal mice.
Cell Mol Biol 45, 1191-1202
- Cote S, Lemieux R, Simard C. 2005
The survival of IL-6-dependent myeloma cells critically relies on their capability to transit the G1 to S phase interval of the cell cycle.
Cell Signal 17:615-624
- Craig SS, Krishnaswamy P, Irani AM, Kepley CL, Liu FT, Schwartz LB. 1995
Immunoelectron microscopic localization of galectin-3, an IgE binding protein, in human mast cells and basophils.
Anat Rec. 242, 211-219

- Derynck R, Goeddel DV, Ullrich A, Gutterman JU, Williams RD, Bringman TS, Berger WH. 1987
Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors.
Cancer Res 47:707-712
- Dills, Y. 2003
Potentielle Interaktion von Gal-3 und Bcl-2 in PC12-Zellen.
Diplomarbeit an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Ding Q, Grammer JR, Nelson MA, Guan JL, Stewart JE Jr, Gladson CL. 2005
p27Kip1 and cyclin D1 are necessary for focal adhesion kinase regulation of cell cycle progression in glioblastoma cells propagated in vitro and in vivo in the scid mouse brain.
J Biol Chem 280:6802-6815
- Dirks PB, Rutka JT. 1997
Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle--a review.
Neurosurgery 40:1000-1013
- Downward J. 2003
Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy.
Nat Rev Cancer 3:11-22
- Dumic J, Lauc G, Flogel M. 2000
Expression of galectin-3 in cells exposed to stress-roles of jun and NF-kappaB.
Cell Physiol Biochem 10:149-158
- Eiznhamer DA, Xu ZQ. 2004
Betulinic acid: a promising anticancer candidate.
IDrugs 7:359-573
- Elad-Sfadia G, Haklai R, Balan E, Kloog Y. 2004
Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity.
J Biol Chem 279:34922-34930
- Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, Kim HR, Hogan V, Inohara H, Kagawa S, Raz A. 2003
CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis.
Cancer Res 63:8302-8311
- Fukumori T, Takenaka Y, Oka N, Yoshii T, Hogan V, Inohara H, Kanayama HO, Kim HR, Raz A. 2004
Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways.
Cancer Res 64:3376-3379
- Fulda S, Scaffidi C, Susin SA, Krammer PH, Kroemer G, Peter ME, Debatin KM. 1998
Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid.
J Biol Chem 273, 33942-33948
- Gaudin JC, Mehul B, Hughes RC. 2000
Nuclear localisation of wild type and mutant galectin-3 in transfected cells.
Biol Cell 92:49-58
- Geho DH, Bandle RW, Clair T, Liotta LA. 2005
Physiological mechanisms of tumor-cell invasion and migration.
Physiology (Bethesda) 20:194-200
- Ghoda L, Lin X, Greene WC. 1997
The 90-kDa ribosomal S6 kinase (pp90rsk) phosphorylates the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha and stimulates its degradation in vitro.
J Biol Chem 272:21281-21288

- Giannone G, Ronde P, Gaire M, Haiech J, Takeda K. 2002
Calcium oscillations trigger focal adhesion disassembly in human U87MG astrocytoma cells.
J Biol Chem 277:26364-26371
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. 1973
In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.
J Natl Cancer Inst 51, 1417-1423
- Gibbs WW. 2003
Untangling the roots of cancer.
Sci Am 289:56-65
- Gillespie GY, Soroceanu L, Manning TJ Jr, Gladson CL, Rosenfeld SS. 1999
Glioma migration can be blocked by nontoxic inhibitors of myosin II.
Cancer Res 59:2076-2082
- Gong HC, Honjo Y, Nangia-Makker P, Hogan V, Mazurak N, Bresalier RS, Raz A. 1999
The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells.
Cancer Res 59:6239-6245.
- Gossen M, Bujard H. 1992
Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters.
Proc Natl Acad Sci U S A 89:5547-5551
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H. 1995
Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells.
Science 268:1766-1769
- Greene LA, Tischler AS. 1976
Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor.
Proc Natl Acad Sci U S A 73, 2424-2428
- Gu J, Tamura M, Yamada KM. 1998
Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways.
J Cell Biol 143:1375-1383
- Gu W, Brodtkorb E, Piepoli T, Finocchiaro G, Steinlein OK. 2005
LGI1: a gene involved in epileptogenesis and glioma progression?
Neurogenetics 6:59-66
- Guha A, Dashner K, Black PM, Wagner JA, Stiles CD. 1995
Expression of PDGF and PDGF receptors in human astrocytoma operation specimens supports the existence of an autocrine loop.
Int J Cancer 60:168-173
- Gysin S, Lee SH, Dean NM, McMahon M. 2005
Pharmacologic inhibition of RAF-->MEK-->ERK signaling elicits pancreatic cancer cell cycle arrest through induced expression of p27Kip1.
Cancer Res 65:4870-1880
- Hahn WC, Weinberg RA. 2002
Rules for making human tumor cells.
N Engl J Med 347:1593-603
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000
The hallmarks of cancer.
Cell 100:57-70

- Harding A, Giles N, Burgess A, Hancock JF, Gabrielli BG. 2003
Mechanism of mitosis-specific activation of MEK1.
J Biol Chem 278:16747-16754
- Hermann T, Baumann M. 1997
Klinische Strahlenbiologie
Kapitel 4.5: Zelltod nach Bestrahlung, 43-48
- Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermark B, Nister M. 1992
Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops.
Cancer Res 52:3213-3219
- Hood JD, Cheresch DA. 2002
Role of integrins in cell invasion and migration.
Nat Rev Cancer 2:91-100
- Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-i S, Wada H, Fujimoto J, Kohno M. 1999
Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors.
Oncogene 18:813-822
- Hoshino R, Tanimura S, Watanabe K, Kataoka T, Kohno M. 2001
Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway induces marked G1 cell cycle arrest and apoptosis in tumor cells in which the pathway is constitutively activated: up-regulation of p27(Kip1).
J Biol Chem 276:2686-2692
- Hoyer KK, Pang M, Gui D, Shintaku IP, Kuwabara I, Liu FT, Said JW, Baum LG, Teitell MA. 2004
An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas.
Am J Pathol 164:893-902
- Hsu DK, Zuberi RI, Liu FT. 1992
Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin.
J.Biol.Chem. 267, 14167-14174
- Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, Liu FT. 2000
Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses.
Am J Pathol 156:1073-1083
- Hubert M, Wang SY, Wang JL, Seve AP, Hubert J. 1995
Intranuclear distribution of galectin-3 in mouse 3T3 fibroblasts: comparative analyses by immunofluorescence and immunoelectron microscopy.
Exp Cell Res 220:397-406
- Huflejt ME, Turck CW, Lindstedt R, Barondes SH, Leffler H. 1993
L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I.
J Biol Chem 268:26712-26718
- Hughes RC. 1994
Mac-2: a versatile galactose-binding protein of mammalian tissues.
Glycobiology 4:5-12
- Hughes RC 1997
The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules
Biochem Soc Trans. 25, 1194-1198
- Ignéy FH, Krammer PH. 2002
Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.
Nat Rev Cancer 2:277-288

- Inohara H, Akahani S, Raz A. 1998
Galectin-3 stimulates cell proliferation.
Exp Cell Res 245:294-302
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC. 1997
Programmed cell death in animal development.
Cell 88:347-354
- Jennings MT, Ebrahim SA, Thaler HT, Jennings VD, Asadourian LL, Shapiro JR. 1989
Immunophenotypic differences between normal glia, astrocytomas and malignant gliomas: correlations with karyotype, natural history and survival.
J Neuroimmunol 25, 7-28
- Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ. 2001
Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes.
J Leukoc Biol 69:555-564
- Joy AM, Beaudry CE, Tran NL, Ponce FA, Holz DR, Demuth T, Berens ME. 2003
Migrating glioma cells activate the PI3-K pathway and display decreased susceptibility to apoptosis.
J Cell Sci 116:4409-4417
- Kaleko M, Rutter WJ, Miller AD 1990
Overexpression of the human insulinlike growth factor I receptor promotes ligand-dependent neoplastic transformation.
Mol Cell Biol 10:464-473
- Kapoor GS, O'Rourke DM. 2003
Receptor tyrosine kinase signaling in gliomagenesis: pathobiology and therapeutic approaches.
Cancer Biol Ther 2:330-342
- Kasai, K.-I. und Hirabayashi, J. (1996)
Galectins: a familie of animal lectins that decipher glycocodes
J Biochem. 119, 1-8
- Kim HR, Lin HM, Biliran H, Raz A. 1999
Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells.
Cancer Res 59:4148-4154
- Kim K, Mayer EP, Nachtigal M. 2003
Galectin-3 expression in macrophages is signaled by Ras/MAP kinase pathway and up-regulated by modified lipoproteins.
Biochim Biophys Acta 1641:13-23
- Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, Cheresch DA. 1997
Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase.
J Cell Biol 137:481-492
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. 1997
The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis.
Science 275:1132-1136
- Knobbe CB, Reifenberger J, Reifenberger G. 2004
Mutation analysis of the Ras pathway genes NRAS, HRAS, KRAS and BRAF in glioblastomas.
Acta Neuropathol (Berl) 108:467-470
- Knudson AG. 1993
Antioncogenes and human cancer.
Proc Natl Acad Sci U S A 90:10914-10921

- Kobayashi S, Nantz R, Kitamura T, Higashikubo R, Horikoshi N. 2005
Combined inhibition of extracellular signal-regulated kinases and HSP90 sensitizes human colon carcinoma cells to ionizing radiation.
Oncogene 24:3011-3019
- Krueger JS, Keshamouni VG, Atanaskova N, Reddy KB. 2001
Temporal and quantitative regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) modulates cell motility and invasion.
Oncogene 20:4209-4218
- Kruman I, Guo Q, Mattson MP. 1998
Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells.
J Neurosci Res 51:293-308
- Kuklinski S, Probstmeier R. 1998
Homophilic Binding properties of Galectin-3: Involvement of the Carbohydrate recognition domain.
J. Neurochem. 70, 814-823
- Kuklinski S, Pesheva P, Heimann C, Urschel S, Gloor S, Graeber S, Herzog V, Pietsch T, Wiestler OD, Probstmeier R. 2000
Expression pattern of galectin-3 in neural tumor cell lines.
J Neurosci Res 60:45-57
- Kuklinski S, Vladimirova V, Waha A, Kamata H, Pesheva P, Probstmeier R. 2003
Expression of galectin-3 in neuronally differentiating PC12 cells is regulated both via Ras/MAPK-dependent and -independent signalling pathways.
J Neurochem 87:1112-1124
- Laemmli UK. 1970
Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685
- Lee SM, Nguyen TH, Park MH, Kim KS, Cho KJ, Moon DC, Kim HY, Yoon do Y, Hong JT. 2004
EPO receptor-mediated ERK kinase and NF-kappaB activation in erythropoietin-promoted differentiation of astrocytes.
Biochem Biophys Res Commun 320:1087-1095
- Lee YJ, Song YK, Song JJ, Siervo-Sassi RR, Kim HR, Li L, Spitz DR, Lokshin A, Kim JH. 2003
Reconstitution of galectin-3 alters glutathione content and potentiates TRAIL-induced cytotoxicity by dephosphorylation of Akt.
Exp Cell Res 288:21-34
- Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. 2004
Introduction to galectins.
Glycoconj. J 19, 433-440
- Li DM, Sun H. 1998
PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells.
Proc Natl Acad Sci U S A 95:15406-15411
- Lin HM, Moon BK, Yu F, Kim HR. 2000
Galectin-3 mediates genistein-induced G(2)/M arrest and inhibits apoptosis.
Carcinogenesis 21:1941-1945
- Lin HM, Pestell RG, Raz A, Kim HR. 2002
Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells.
Oncogene 21:8001-8010

- Lipinski CA, Tran NL, Bay C, Kloss J, McDonough WS, Beaudry C, Berens ME, Loftus JC. 2003
Differential role of proline-rich tyrosine kinase 2 and focal adhesion kinase in determining glioblastoma migration and proliferation.
Mol Cancer Res. 2003 Mar;1(5):323-32
- Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR Jr. 1995
Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages.
Am J Pathol 147:1016-1028
- Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. 2002
Intracellular functions of galectins.
Biochim Biophys Acta 1572:263-273
- Liu L, Sakai T, Sano N, Fukui K. 2004
Nucling mediates apoptosis by inhibiting expression of galectin-3 through interference with nuclear factor kappaB signalling.
Biochem J 380:31-41
- Liu FT, Rabinovich GA. 2005
Galectins as modulators of tumour progression.
Nat Rev Cancer 5:29-41
- Lorimer IA, Lavictoire SJ. 2001
Activation of extracellular-regulated kinases by normal and mutant EGF receptors.
Biochim Biophys Acta 1538:1-9
- Ma RY, Tong TH, Cheung AM, Tsang AC, Leung WY, Yao KM. 2005
Raf/MEK/MAPK signaling stimulates the nuclear translocation and transactivating activity of FOXM1c.
J Cell Sci 118:795-806
- Maeda N, Kawada N, Seki S, Arakawa T, Ikeda K, Iwao H, Okuyama H, Hirabayashi J, Kasai K, Yoshizato K. 2003
Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways.
J Biol Chem 278:18938-18944
- Mandell JW, Hussaini IM, Zecevic M, Weber MJ, VandenBerg SR. 1998
In situ visualization of intratumor growth factor signaling: immunohistochemical localization of activated ERK/MAP kinase in glial neoplasms.
Am J Pathol 153:1411-1423
- Massa SM, Cooper DNW, Leffer H, Barondes SH. 1993
L-29, an endogenous lectin, binds to glycoconjugate ligands with positive cooperativity.
Biochemistry 32, 260-267
- Matarrese P, Tinari N, Semeraro ML, Natoli C, Iacobelli S, Malorni W. 2000
Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis.
FEBS Lett 473:311-315
- Matsubayashi Y, Ebisuya M, Honjoh S, Nishida E. 2004
ERK activation propagates in epithelial cell sheets and regulates their migration during wound healing.
Curr Biol 14:731-735
- Mawrin C, Diete S, Treuheit T, Kropf S, Vorwerk CK, Boltze C, Kirches E, Firsching R, Dietzmann K. 2003
Prognostic relevance of MAPK expression in glioblastoma multiforme.
Int J Oncol 23:641-648
Mol Cell Biol 10:464-473
- Mazurek N, Conklin J, Byrd JC, Raz A, Bresalier RS. 2000
Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands.
J Biol Chem 275:36311-36315

- Mirza AM, Gysin S, Malek N, Nakayama K, Roberts JM, McMahon M. 2004
Cooperative regulation of the cell division cycle by the protein kinases RAF and AKT.
Mol Cell Biol 24:10868-10881
- Miyakoshi J, Yagi K. 2000
Inhibition of I kappaB-alpha phosphorylation at serine and tyrosine acts independently on sensitization to DNA
damaging agents in human glioma cells.
Br J Cancer 82:28-33
- Mocigemba A. 2001
Synchrone Expression von Galectin-3 und aktiviertem ERK1/2 in Gliomzelllinien.
Diplomarbeit an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Moutsatsos IK, Davis JM, Wang JL. 1986
Endogenous lectins from cultured cells: subcellular localization of carbohydrate-binding protein 35 in 3T3
fibroblasts.
J Cell Biol 102, 477-483
- Nangia-Makker P, Thompson E, Hogan C, ochieng J, Raz A. 1995
Induction of tumorigenicity by galectin-3 in a non tumorigenic human breast carcinoma cell line.
Int J Oncol 7:1079-1087
- Nickel W. 2003
The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes.
Eur J Biochem 270:2109-2119
- Oka N, Nakahara S, Takenaka Y, Fukumori T, Hogan V, Kanayama HO, Yanagawa T, Raz A. 2005
Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt
in human bladder carcinoma cells.
Cancer Res 65:7546-7553
- Osborn M, Ludwig M, Weber K, Bignami A, Dahl D, Bayreuther K. 1981
Expression of glial and vimentin type intermediate filaments in cultures derived from human glial material.
Differentiation 19, 161-167
- Parsons JT. 2003
Focal adhesion kinase: the first ten years.
J Cell Sci 116:1409-14016
- Pekkola-Heino K, Servomaa K, Kiuru A, Grenman R. 1998
Sublethal damage repair capacity in carcinoma cell lines with p53 mutations.
Head Neck 20:298-303
- Pesheva P, Urschel S, Frei K, Probstmeier R. 1998
Murine microglial cells express functionally active galectin-3 in vitro.
J Neurosci Res 51:49-57
- Ponten J, Macintyre EH. 1968
Long term culture of normal and neoplastic human glia.
Acta Pathol Microbiol Scand 74, 465-486
- Probstmeier R, Kuhn K, Schachner M. 1986
Binding properties of the neural cell adhesion molecule to different components of the extracellular matrix.
J Neurochem 53, 1794-1801
- Probstmeier R, Montag D, Schachner M. 1995
Galectin-3, a beta-galactoside-binding animal lectin, binds to neural recognition molecules.
J Neurochem 64:2465-2472

- Qui MS, Green SH. 1992
PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity.
Neuron 9:705-717
- Rabinovich GA. 1999
Galectins: an evolutionary conserved family of animal lectins with multifunctional properties, a trip from the gene to clinical therapy
Cell Death Differ. 6, 711-721
- Robertson SC, Tynan J, Donoghue DJ. 2000
RTK mutations and human syndromes: when good receptors turn bad
Trends Genet 16:368
- Roux PP, Blenis J. 2004
ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions.
Microbiol Mol Biol Rev 68:320-344
- Sato S, Hughes RC. 1992
Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylectosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin.
J Biol Chem 267:6983-6990
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. 1998
Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways.
EMBO J 17:1675-1687
- Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. 1977
Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma.
Int J Cancer 19, 621-626.
- Schouten GJ, Vertegaal AC, Whiteside ST, Israel A, Toebes M, Dorsman JC, van der Eb AJ, Zantema A. 1997
IkappaB alpha is a target for the mitogen-activated 90 kDa ribosomal S6 kinase.
EMBO J 16:3133-3144
- Schwarz CS, Evert BO, Seyfried J, Schaupp M, Kunz WS, Vielhaber S, Klockgether T, Wüllner U. 2001
Overexpression of bcl-2 results in reduction of cytochrome c content and inhibition of complex I activity.
Biochem Biophys Res Commun 280, 1021-1027
- Shimura T, Takenaka Y, Fukumori T, Tsutsumi S, Okada K, Hogan V, Kikuchi A, Kuwano H, Raz A. 2005
Implication of galectin-3 in Wnt signaling.
Cancer Res 65:3535-3537
- Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A, Raz A. 2004
Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin.
Cancer Res 64:6363-6367
- Simpson L, Parsons R. 2001
PTEN: life as a tumor suppressor.
Exp Cell Res 264:29-41
- Stepczynska A, Lauber K, Engels IH, Janssen O, Kabelitz D, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. 2001
Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation.
Oncogene 20:1193-1202
- Stevenson M, Volsky DJ. 1986
Activated v-myc and v-ras oncogenes do not transform normal human lymphocytes.
Mol Cell Biol 6:3410-3417

- Stock M, Schafer H, Stricker S, Gross G, Mundlos S, Otto F. 2003
Expression of galectin-3 in skeletal tissues is controlled by Runx2.
J Biol Chem 278:17360-17367
- Takenaka Y, Fukumori T, Yoshii T, Oka N, Kim HR, Bresalier RS, Raz A. 2004
Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs.
Mol Cell Biol 24:4395-4406
- Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Ueki K, Izumi T, Chatani Y, Kohno M, Kasuga M, Yazaki Y, Akanuma Y. 1992
Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells.
J Biol Chem 267:20293-20297
- Tan JL, Ravid S, Spudich JA. 1992
Control of nonmuscle myosins by phosphorylation.
Annu Rev Biochem 61:721-759
- Tenen DG. 2003
Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way.
Nat Rev Cancer 3:89-101
- Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998
Caspases: enemies within.
Science 281:1312-1316
- Towbin H, Staehlin T, Gordon J. 1979
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc Natl Acad Sci USA 76, 4350-4354
- Tohtong R, Phattarasakul K, Jiraviriyakul A, Sutthiphongchai T. 2003
Dependence of metastatic cancer cell invasion on MLCK-catalyzed phosphorylation of myosin regulatory light chain.
Prostate Cancer Prostatic Dis 6:212-216
- Truong MJ, Gruart V, Kusnierz JP, Papin JP, Loiseau S, Capron A, Capron M. 1993
Human neutrophils express immunoglobulin E (IgE)-binding proteins (Mac-2/epsilon BP) of the S-type lectin family: role in IgE-dependent activation.
J Exp Med 177:243-248
- Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, Downward J, Magels ELV, Whittle N, Warfield MD, Seeburg PH. 1984
Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells.
Nature 309:418-425
- Ussar S, Voss T. 2004
MEK1 and MEK2, different regulators of the G1/S transition.
J Biol Chem 279:43861-43869
- Vladimirova V, Mocigemba A, Waha A, Pesheva P, Probstmeier R.
Runx2 regulates the expression of galectin-3 in human glioma cells.
zur Veröffentlichung eingereicht
- Vito P, Pellegrini L, Guet C, D'Adamio L. 1999
Cloning of AIP1, a novel protein that associates with the apoptosis-linked gene ALG-2 in a Ca²⁺-dependent reaction.
J Biol Chem 274:1533-1540

- Webb DJ, Nguyen DH, Sankovic M, Gonias SL. 1999
The very low density lipoprotein receptor regulates urokinase receptor catabolism and breast cancer cell motility in vitro.
J Biol Chem 274:7412-7420
- Webb DJ, Nguyen DH, Gonias SL. 2000
Extracellular signal-regulated kinase functions in the urokinase receptor-dependent pathway by which neutralization of low density lipoprotein receptor-related protein promotes fibrosarcoma cell migration and matrigel invasion.
J Cell Sci 113:123-134
- Weil M, Jacobson MD, Coles HS, Davies TJ, Gardner RL, Raff KD, Raff MC. 1996
Constitutive expression of the machinery for programmed cell death.
J Cell Biol 133, 1053-1059
- Weller M, Frei K, Groscurth P, Krammer PH, Yonekawa Y, Fontana A. 1994
Anti-Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of cultured human glioma cells. Induction and modulation of sensitivity by cytokines.
J Clin Invest 94, 954-964
- Wick W, Grimm C, Wagenknecht B, Dichgans J, Weller M. 1999
Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing.
J Pharmacol Exp Ther 289:1306-1312
- Woods D, Cherwinski H, Venetsanakos E, Bhat A, Gysin S, Humbert M, Bray PF, Saylor VL, McMahon M. 2001
Induction of beta3-integrin gene expression by sustained activation of the Ras-regulated Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway.
Mol Cell Biol 21:3192-3205
- Wright JH, Munar E, Jameson DR, Andreassen PR, Margolis RL, Seger R, Krebs EG. 1999
Mitogen-activated protein kinase kinase activity is required for the G(2)/M transition of the cell cycle in mammalian fibroblasts.
Proc Natl Acad Sci U S A 96:11335-11340
- Wu S, Zhou L, Rose M, Xiao X, Graham SH. 2004
c-FLIP-L recombinant adeno-associated virus vector infection prevents Fas-mediated but not nerve growth factor withdrawal-mediated cell death in PC12 cells.
Brain Res Mol Brain Res 122:79-87
- Yang RY, Hsu DK, Liu FT. 1996
Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis.
Proc Natl Acad Sci U S A 93:6737-6742
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. 1997
Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked.
Science 275:1129-1132
- Yoshii T, Fukumori T, Honjo Y, Inohara H, Kim HR, Raz A. 2002
Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest.
J Biol Chem 277:6852-6857
- Yu F, Finley RL Jr, Raz A, Kim HR. 2002
Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation.
J Biol Chem 277:15819-15827
- Zhang XD, Gillespie SK, Hersey P. 2004
Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways.
Mol Cancer Ther 3:187-197

Zhu Y, Parada LF. 2002

The molecular and genetic basis of neurological tumours.

Nat Rev Cancer 2:616-626

Zuberi RI, Frigeri LG, Liu FT. 1994

Activation of rat basophilic leukemia cells by epsilon BP, an IgE-binding endogenous lectin.

Cell Immunol 156:1-12

Zwick E, Bange J, Ullrich A. 2001

Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies.

Endocr Relat Cancer 8:161-173

Zwicker HF. 2003

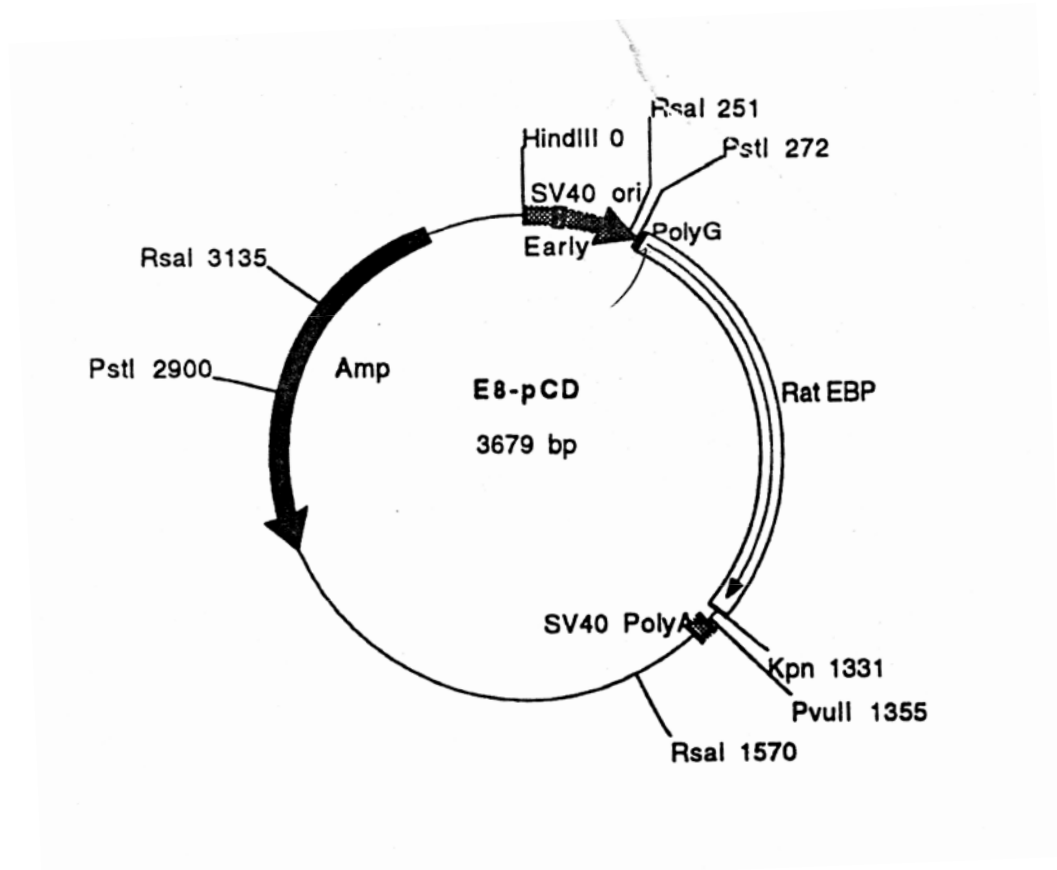
Vergleichende Expressionsanalyse von Galectin-1, Galectin-3 und Mitgliedern der Bcl-2-Familie in humanen Gliomzelllinien unter normalen und apoptotischen Kulturbedingungen.

Diplomarbeit an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

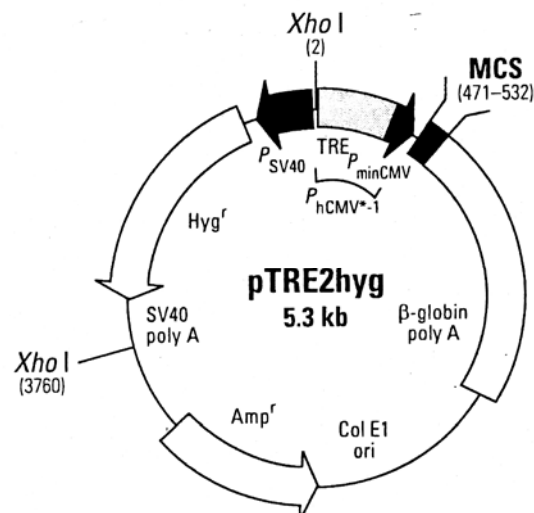
7 Anhang

7.1 Vektoren und Plasmide

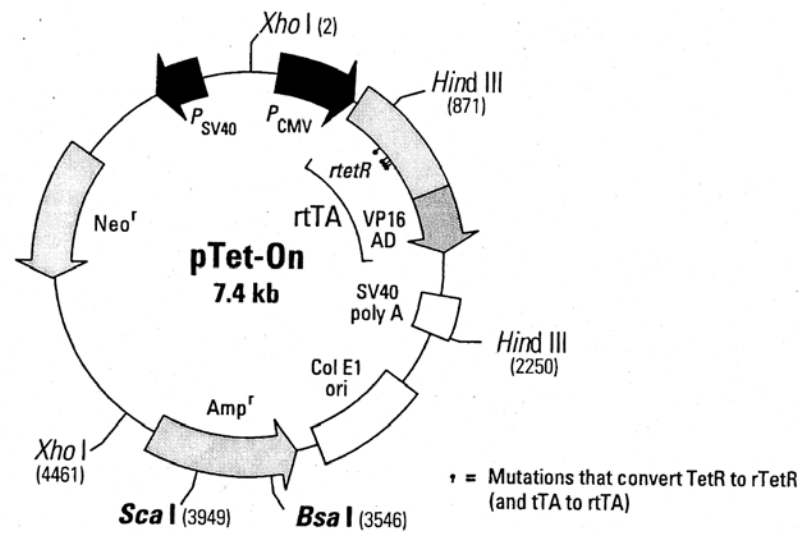
E8-pCD



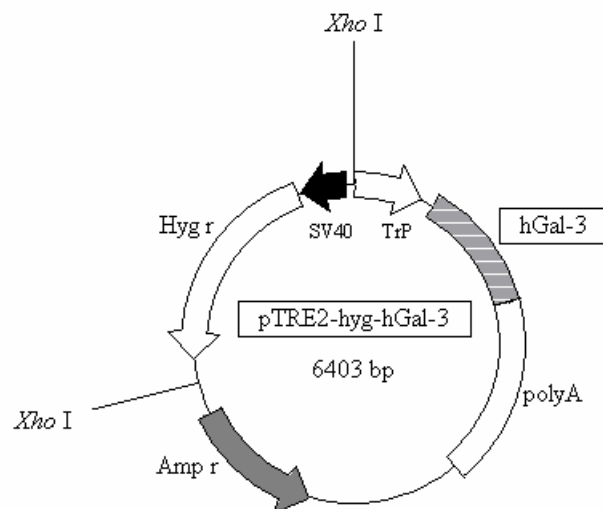
pTRE2-hyg



pTet-On



pTRE2-hGal-3



pTRE2-rGal-3