

Einfluss von Zell-Zell-Kontakten auf das Apoptoseverhalten primärer humaner Kolonepithelzellen



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der naturwissenschaftlichen
Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Claudia Hofmann
aus Bayreuth

2006

Promotionsgesuch eingereicht am 22.11.2006

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. med. Richard Warth, Institut für Physiologie

Prof. Dr. med. Dr. phil. Gerhard Rogler, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. rer. nat. C. Oberprieler
1. Gutachter (1. Prüfer):	Prof. Dr. med. R. Warth
2. Gutachter (2. Prüfer):	Prof. Dr. med. Dr. phil. G. Rogler
3. Prüfer:	Prof. Dr. rer. nat. S. Schneuwly
Ersatzperson:	Prof. Dr. rer. nat. A. Kurtz

Dissertation

durchgeführt von Juni 2003 bis Oktober 2006
am Institut für Innere Medizin I der Universität Regensburg
unter Anleitung von

Prof. Dr. med. Richard Warth
Institut für Physiologie

und

Prof. Dr. med. Dr. phil. Gerhard Rogler
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I

Die Neugier steht immer
an erster Stelle eines Problems,
das gelöst werden will.

Galileo Galilei

Für meine Familie

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	Rezeptor für EGF (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
ELISA	Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (<i>enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>)
EtOH	Ethanol
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IEC-18	Zelllinie immortalisierter intestinaler Rattenepithelzellen
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
KEZ	primäre humane Kolonepithelzellen
M	Molar
mA	Milliampere

MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
n	Anzahl der Experimente
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
OD	optische Dichte
p	statistischer P-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PI	Propidiumiodid
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
P-KEZ	im Pellet inkubierte primäre humane Kolonepithelzellen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS-KEZ	primäre humane Kolonepithelzellen, die zunächst zwei Stunden im Pellet und anschließend in Suspension inkubiert wurden
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
S-KEZ	in Suspension inkubierte primäre humane Kolonepithelzellen
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>sideward scatter</i>)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
U/min	Umdrehungen/Minute
µl	Mikroliter
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	19
1.1	Aufbau und Funktion des menschlichen Darms	19
1.2	Die Kolonmukosa	20
1.3	Kolonepithelzellen	21
1.3.1	Aufbau und Funktion der Kolonepithelzellen.....	21
1.3.2	Lebenszyklus der Kolonepithelzellen	22
1.4	Apoptose – der programmierte Zelltod und seine Formen	23
1.4.1	Molekulare Mechanismen des programmierten Zelltodes.....	23
1.4.1.1	Proteine der Bcl-2-Familie	24
1.4.1.2	Caspasen	26
1.4.2	Anoikis – Induktion von Apoptose nach Verlust der Zellverankerung	29
1.5	Rolle der Zellverankerung als Überlebensfaktor	30
1.5.1	Zell-Matrix-Verankerung	31
1.5.2	Zell-Zell-Verankerung	31
1.5.3	Zell-Kontakt-vermittelte Signaltransduktion.....	33
1.5.3.1	<i>Focal Adhesion Kinase</i> (FAK)	33
1.5.3.2	Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K)/Akt	34
1.5.3.3	<i>Epidermal Growth Factor-Rezeptor</i> (EGFR).....	35
1.5.3.4	<i>Mitogen-activated protein kinases</i> (MAPK).....	36
1.5.3.5	Src	36
1.5.3.6	<i>Nuclear factor kappa B</i> (NF-κB).....	37
2	Arbeitsziele.....	38
3	Material und Methoden	40
3.1	Material	40
3.1.1	Herkunft von Material und Geräten	40
3.1.1.1	Material für die Kultur primärer humaner Kolonepithelzellen	40
3.1.1.2	Geräte für die Kultur primärer humaner Kolonepithelzellen	40
3.1.1.3	Material und Geräte für die Durchflusszytometrie.....	40
3.1.2	Herkunft von Chemikalien, Enzymen und Verbrauchsmaterial	41

3.1.2.1	Chemikalien.....	41
3.1.2.2	Verbrauchsmaterial	42
3.1.2.3	Sonstige Geräte.....	43
3.1.3	Fertigkombinationen von Biochemikalien (Kits)	43
3.1.4	Standards und Marker	44
3.1.5	Antikörper	44
3.1.5.1	Primäre Antikörper.....	44
3.1.5.2	Sekundäre Antikörper.....	46
3.1.6	Puffer und Lösungen.....	46
3.2	Methoden	50
3.2.1	Arbeiten mit primären humanen Kolonepithelzellen.....	50
3.2.1.1	Isolierung primärer humaner Kolonepithelzellen	50
3.2.1.2	Induktion von Anoikis in primären humanen Kolonepithelzellen	50
3.2.1.3	Modulation von Anoikis durch lösliches E-Cadherin	51
3.2.1.4	Blockierung der E-Cadherin-Bindung	51
3.2.1.5	Erhalt von Zell-Zell-Kontakten: Pellet-Modell.....	51
3.2.1.6	Inhibition von Signalwegen.....	52
3.2.1.7	Gewinnung von Zellüberständen.....	52
3.2.2	Arbeiten mit DNA	53
3.2.2.1	DNA-Isolation	53
3.2.2.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	53
3.2.3	Färbemethoden	53
3.2.3.1	DNA-Färbung mit DAPI	53
3.2.3.2	Immunhistochemie	54
3.2.4	Western Blot	54
3.2.4.1	Gewinnung von Zellextrakten (Cytosolpräparation).....	55
3.2.4.2	Herstellung cytosolischer und mitochondrialer Fraktionen	55
3.2.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	56
3.2.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	56
3.2.4.5	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (Blotten)	57
3.2.4.6	Färbung der Membran mit Ponceau S.....	57
3.2.4.7	Immundetektion der Proteine	57
3.2.4.8	Strippen der Nitrozellulosemembran	58
3.2.5	Kolorimetrische Messung der Caspase-3-Aktivität	58

3.2.6	Herstellung von Zellkernextrakten	59
3.2.7	ELISA.....	60
3.2.8	Durchflusszytometrie	60
3.2.8.1	Optisches System und Lichtdetektion.....	60
3.2.8.2	DNA-Färbung mit Propidiumiodid	62
3.2.8.3	Zell-Zyklus-Analyse und Apoptose-Nachweis	63
3.2.9	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)	64
3.2.10	Statistik	64
4	Ergebnisse.....	65
4.1	Zell-Zell-Kontakte als Überlebensfaktor für primäre humane Kolonepithelzellen	65
4.1.1	Fehlende Matrix-Verankerung in isolierten Kolonepithelzellkrypten.....	65
4.1.2	Blockierung von Anoikis durch Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten.....	66
4.1.2.1	Zell-Morphologie und interzelluläre Kontakte im P-KEZ-Modell	67
4.1.2.2	Die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten verhindert die Aktivierung von Caspasen in KEZ	69
4.1.2.3	Die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten verhindert den Abbau der DNA in KEZ	73
4.1.2.4	Induktion von Anoikis ist auch nach Pelletinkubation möglich	75
4.2	Bedeutung von Adhäsionsproteinen für das Überleben von Kolonepithelzellen	76
4.2.1	Modulation von Anoikis durch Simulation von Zell-Zell-Kontakten.....	76
4.2.2	Blockierung der E-Cadherin-Bindung.....	78
4.2.3	β -Catenin ist in P-KEZ vor einer Caspase-abhängigen Spaltung geschützt und bleibt aktiviert.....	79
4.3	Einfluss von Zell-Zell-Kontakten auf die Regulation pro- und anti- apoptotischer Bcl-2-Proteine	80
4.3.1	Die Konzentration anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine bleibt in den Mitochondrien von P-KEZ konstant	81
4.3.2	Der Anteil pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine nimmt in S-KEZ stark zu ...	82
4.3.3	<i>BH-3-only</i> -Proteine werden durch die Zellaggregation nicht beeinflusst.....	83

4.4	Überlebenssignale in P-KEZ	85
4.4.1	Untersuchung der Aktivierung von relevanten Signalpfaden in P-KEZ ..	85
4.4.1.1	Der anti-apoptotische Effekt in P-KEZ ist unabhängig von FAK	85
4.4.1.2	Akt bleibt in P-KEZ konstant aktiviert.....	87
4.4.1.3	Die KEZ-Aggregation induziert eine transiente Aktivierung von EGFR	88
4.4.1.4	Mitglieder der MAPK-Familie werden durch die Zellaggregation unterschiedlich beeinflusst	89
4.4.1.5	In P-KEZ werden Src-abhängige Signale partiell herunterreguliert ..	90
4.4.1.6	Die NF- κ B-Aktivität wird durch die Zellaggregation nicht beeinflusst	91
4.4.2	Blockierung aktivierter Signalpfade in P-KEZ mittels spezifischer Inhibitoren	92
4.4.2.1	Der anti-apoptotische Effekt in P-KEZ ist MAPK-unabhängig	92
4.4.2.2	EGFR-vermittelte Signale wirken in P-KEZ anti-apoptotisch	93
4.4.2.3	PI-3K-vermittelte Signale tragen zum Überleben von P-KEZ bei	94
4.4.2.4	Src-vermittelte anti-apoptotische Signale sind essentiell für das Überleben von P-KEZ.....	95
4.5	Induktion von Überlebenspfaden als transienter Schutzmechanismus vor Anoikis.....	97
4.5.1	Der Verlust der Zellverankerung induziert die Aktivierung bestimmter Überlebenspfade und Transkriptionsfaktoren	97
4.5.2	Der Verlust der Zellverankerung führt zur verstärkten Sekretion von Wachstumsfaktoren	99
4.5.3	Die Wiederherstellung physiologischer Zell-Kontakte verhindert den Fortschritt von Anoikis.....	100
4.5.4	Die Inhibition von Src hebt den Anoikis-blockierenden Effekt von Zell-Zell-Kontakte auf und beschleunigt Apoptose.....	102
5	Diskussion.....	104
5.1	Zell-Zell-Kontakte als Überlebensfaktor für primäre humane Kolonepithelzellen	104
5.2	Bedeutung von Adhäsionsproteinen für das Überleben von Kolonepithelzellen	107

5.3	Einfluss von Zell-Zell-Kontakten auf die Regulation pro- und anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine	110
5.4	Signaltransduktion in P-KEZ	112
5.5	Induktion von Überlebenspfaden als transienter Schutzmechanismus vor Anoikis.....	117
5.6	Pathophysiologische Relevanz	121
6	Zusammenfassung	123
7	Ausblick.....	125
8	Literaturverzeichnis	127
9	Anhang	140

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion des menschlichen Darms

Der menschliche Darm stellt mit einer Oberfläche von ca. 300 m² die größte Kontaktfläche des Körpers zur Außenwelt dar. Die Oberfläche der Darmschleimhaut ist damit etwa 50-mal größer als die der Haut und erfüllt zwei gegensätzliche Funktionen, die sich auch im Aufbau der Darmwand widerspiegeln: Zum einen ist sie für die Resorption von Nährstoffen verantwortlich, zum anderen muss sie sich und den ganzen Organismus vor einer permanenten Exposition mit Verdauungsenzymen, Nahrungsantigenen, pathogenen Keimen und Bakterien sowie vor deren Eindringen aus dem Darmlumen in die Mukosa und die Zirkulation schützen.

Die Wand von Dünndarm und Dickdarm ist bis auf geringe Unterschiede gleichartig aus vier konzentrischen Schichten aufgebaut (Abbildung 1.1).

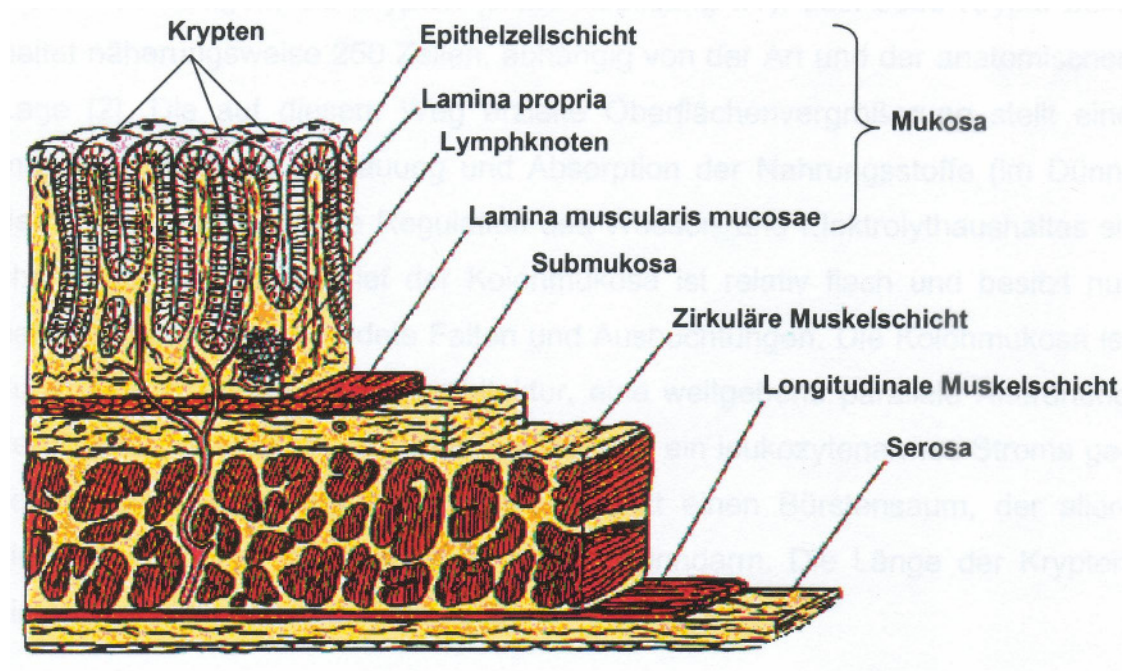


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau der Darmwand [adaptiert nach(1)].

Das Lumen des Darms ist von einer spezialisierten Schleimhaut, der Mukosa, umgeben. Diese wird zum Lumen hin von einer Schicht aus schleimbedeckten Epithelzellen begrenzt, die die unregelmäßigen Gewebserhebungen, die Zotten, und die zwischen den Zotten liegenden Gewebseinsenkungen, die Krypten, auskleiden. Durch die durch Gewebserhebungen und -einsenkungen erzielte Oberflächenvergrößerung wird eine möglichst effiziente Verdauung und Absorption von Nährstoffen im Dünndarm sowie eine optimale Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts im Dickdarm sichergestellt. Das Gewebe unter der Epithelzellschicht, die *Lamina propria*, wird von Lymphgefäßen, Blutgefäßen und Nervenbahnen durchzogen. Im Bindegewebe der *Lamina propria* findet man hauptsächlich Fibroblasten, Lymphozyten und Makrophagen. Die vorherrschenden Gewebeproteine im Darm sind Kollagene, welche von Fibroblasten und glatten Muskelzellen produziert werden. Die *Lamina propria* wird durch die *Muscularis mucosae* von der Submukosa getrennt. Die *Muscularis mucosae* ist eine etwa fünfreihe Schicht aus glatten Muskelzellen, die für die Darmmotilität von besonderer Bedeutung ist. Bei der Submukosa handelt es sich um ein loses Maschenwerk aus dünnen Kollagenfibrillen, welche die Mukosa mit der *Muscularis propria* verbinden. Die Submukosa wird von Blutgefäßen und Lymphbahnen durchzogen. Unterhalb der Submukosa schließt sich je eine Schicht aus Ringmuskulatur und Längsmuskulatur an. Die Darmwand wird durch die Serosa begrenzt, die beim Dünndarm durch das Mesenterium an der hinteren Bauchwand befestigt ist (Mesenterialwurzel).

1.2 Die Kolonmukosa

Die Mukosa, welche sich in drei Subschichten gliedert, ist für die meisten physiologischen Funktionen des Darms verantwortlich. Die Mukosa des Dickdarms (Kolonmukosa) wird von einer einschichtigen Epithelzellschicht bedeckt. Die Zellen dieses Oberflächenepithels sind mit Schleim überzogen und auf einer vom Stroma abgegrenzten Basalmembran fixiert. Sie kleiden das gesamte Darmlumen samt der Gewebseinsenkungen – der Krypten – aus (Abbildung 1.1). Jede Krypte besteht aus etwa 250 Epithelzellen, wobei die tatsächliche Anzahl von der anatomischen Lage der Krypte abhängt (2). Das Querschnittrelief der Kolonmukosa ist relativ flach und

besitzt nur halbmondförmig ausgebildete Falten und Ausbuchtungen. Die Kolonmukosa ist durch eine exklusive Kryptenarchitektur, eine weitgehend parallele Anordnung der Krypten, ein becherzellreiches Epithel und ein leukozytenarmes Stroma gekennzeichnet. Das Oberflächenepithel besitzt einen Bürstensaum, der allerdings weit weniger ausgeprägt ist als im Dünndarm. Die Länge der Krypten nimmt von oral nach aboral hin zu (3).

1.3 Kolonepithelzellen

1.3.1 Aufbau und Funktion der Kolonepithelzellen

Die klassische Funktion der Epithelzellen im Kolon besteht vor allem in der Absorption von Flüssigkeiten und Elektrolyten. Darüber hinaus stellt die einschichtige Epithelzellschicht die primäre Barriere gegen die im Darmlumen vorhandenen Mikroorganismen und Pathogene dar. Die epitheliale Zelloberfläche des Darms ist die größte Kontaktfläche des menschlichen Körpers zu seiner Umwelt und somit für die Aufrechterhaltung der physiologischen Körperintegrität von zentraler Bedeutung. Die selektive Barrierefunktion des Darms wird hauptsächlich von den Epithelzellen der Darmschleimhaut und den von ihnen produzierten Muzinen (z.B. Kleeblattpeptiden) erfüllt (4). Der schematische Aufbau einer Kolonepithelzelle ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Die zylindrischen Kolonepithelzellen besitzen an ihrer luminalen Oberfläche Mikrovilli mit einer Glykokalix aus verschiedenen Glykoproteinen wie Peptidasen, Disaccharidasen oder alkalischen Phosphatasen. In der Zellmembran der Epithelzellen befinden sich außerdem Transportkanäle für Elektrolyte und Wasser, Transportproteine, die zum Teil mit energiekonvertierenden Proteinen (ATPasen) gekoppelt sind, spezifische Rezeptoren und MHC Klasse II-Moleküle (3).

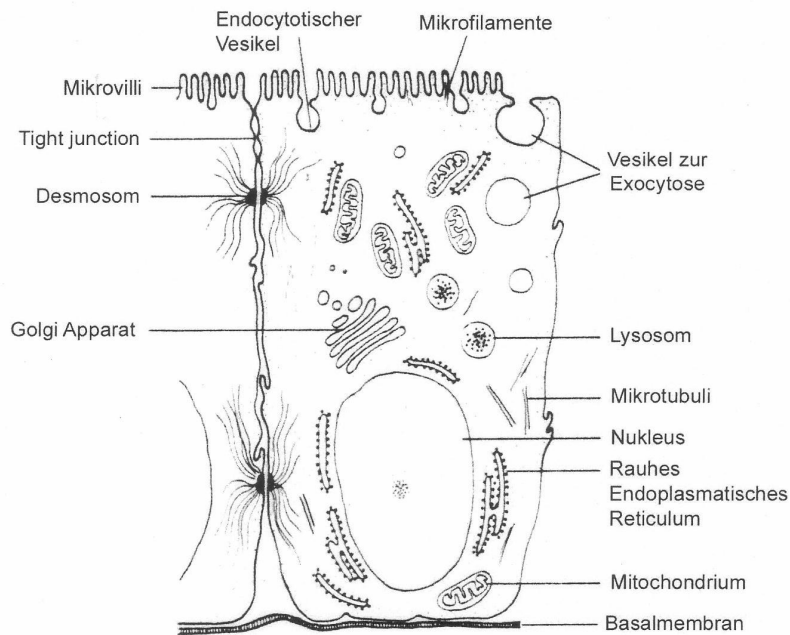


Abbildung 1.2: Schematische Übersicht einer Kolonepithelzelle. [entnommen aus (5)].

1.3.2 Lebenszyklus der Kolonepithelzellen

Die einreihige Epithelzellschicht im menschlichen Kolon wird ständig erneuert und stellt eines der am schnellsten proliferierenden Gewebe des menschlichen Körpers dar (6). Sämtliche Zellen dieser Epithelschicht werden aus undifferenzierten, epithelialen Stammzellen gebildet, die an der Basis der Krypten lokalisiert sind (7-9). Nach der Teilung migrieren die neu entstandenen Epithelzellen auf der Basalmembran als einschichtig angeordnete Zylinderepithelzellen entlang der Krypten-Lumen-Achse und durchlaufen während ihrer Wanderung einen Differenzierungsprozess (2; 10; 11). Die ausdifferenzierten Epithelzellen sind schließlich auf der Oberfläche der Krypte verteilt, während die proliferierenden und Mukus-produzierenden Becherzellen vorwiegend in der Kryptenmitte lokalisiert sind. Mit einer Lebensdauer von nur 3-5 Tagen besitzen humane Kolonepithelzellen einen sehr kurzen Lebenszyklus, der mit Erreichen des Lumens durch Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) und einer Abschilferung der Zellen in das Lumen beendet wird (Abbildung 1.3) (12; 13).

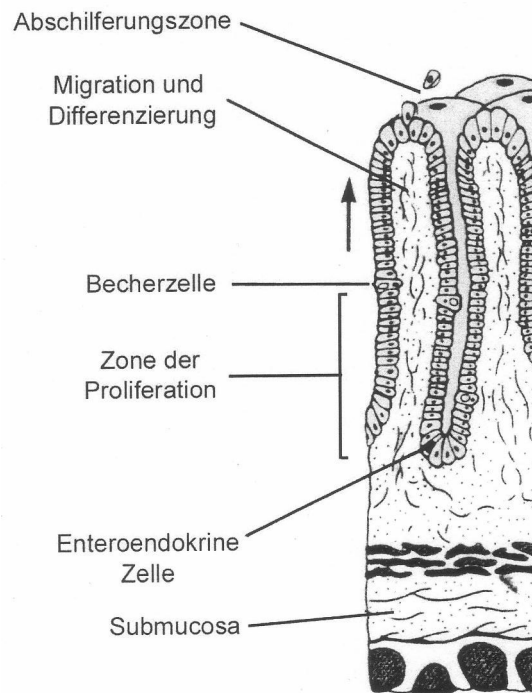


Abbildung 1.3: Migration und Differenzierung von Kolonepithelzellen entlang der Krypten-Lumen-Achse. [adaptiert nach (3)].

1.4 Apoptose – der programmierte Zelltod und seine Formen

1.4.1 Molekulare Mechanismen des programmierten Zelltodes

In multizellulären Organismen werden nicht mehr benötigte oder den Organismus gefährdende Zellen mit Hilfe eines streng regulierten Prozesses entfernt, der als programmierter Zelltod oder Apoptose (*apoptosis*: griechischer Ausdruck für von Bäumen herunterfallende Blätter) bezeichnet wird. Dabei handelt es sich um einen genetisch programmierten Vorgang, der zum kontrollierten Absterben einer Zelle führt. Apoptotische Zellen durchlaufen dabei eine Reihe von charakteristischen zellmorphologischen Veränderungen. Dazu gehören das Schrumpfen der Zelle, Chromatinkondensation, DNA-Degradation, Fragmentierung des Zellkerns und die Ausbildung membranumschlossener apoptotischer Vesikel (so genannter *apoptotic bodies*). Im Gegensatz zur Nekrose kommt es dabei weder zu einer Schädigung der Plasmamembran noch zu einer Entzündungsreaktion, die durch aus dem

Cytoplasma absterbender Zellen freigesetzte Substanzen hervorgerufen wird. Die Induktion von Apoptose löst vielmehr eine definierte Sequenz intrazellulärer Abbauprozesse aus, die zur Proteolyse bestimmter zentraler Proteine und letztendlich zur Fragmentierung der DNA führt. Gleichzeitig wird Gewebsmakrophagen im Frühstadium der Apoptose durch die Externalisation von Phosphatidylresten das Absterben der Zelle signalisiert, woraufhin die *apoptotic bodies* von den Gewebsmakrophagen identifiziert, phagozytiert und „gewebeschonend“ eliminiert werden können (14).

Die Induktion von Apoptose kann durch eine Vielzahl von Faktoren erfolgen. Dabei unterscheidet man zwischen extrazellulären Signalen, die über Rezeptoren vermittelt werden (extrinsische apoptotische Signalwege), und intrazellulären Ereignissen, die zur Apoptose führen (intrinsische apoptotische Signalwege). Extrinsische Signalwege sind unter anderem für die Eliminierung unerwünschter Zellen während der Entwicklung, bei der Ausbildung des Immunsystems sowie bei der Eliminierung von Tumoren durch das Immunsystem (Immunüberwachung) von Bedeutung. Das initiale Ereignis der Apoptoseinduktion stellt hierbei die Bindung bestimmter Liganden an Todesrezeptoren dar, woraufhin Caspase-8 zum so genannten *death inducing signaling complex* (DISC) rekrutiert und dort aktiviert wird (15). Im Gegensatz dazu führen Stressfaktoren innerhalb der Zelle (z.B. UV-Strahlung, Chemotherapeutika, Schädigung wichtiger zellulärer Bestandteile, z.B. der Mitochondrien) zur Induktion intrinsischer apoptotischer Signalwege. Diese sind Rezeptor-unabhängig und resultieren in der selektiven Permeabilisierung der Mitochondrien, der Freisetzung von Cytochrom c ins Cytosol sowie der Rekrutierung und Aktivierung von Caspase-9 in einem Multiproteinkomplex, der als „Apoptosom“ bezeichnet wird (15; 16).

1.4.1.1 Proteine der Bcl-2-Familie

Da der Zelltod aufgrund der nachfolgend (Abschnitt 1.4.1.2) beschriebenen Mechanismen sehr effizient und gerade im Fall der primären humanen Kolonepithelzellen auch sehr schnell ausgelöst werden kann, ist eine enge und vielschichtige Regulation notwendig, um eine adäquate Balance zwischen pro- und anti-apoptotischen Stimuli zur Aufrechterhaltung der Homöostase zu garantieren. Einen wichtigen Kontrollpunkt stellt die Integrität der Mitochondrien dar, deren

Membranpotential und Permeabilität durch die Familie der Bcl-2-Proteine reguliert wird. Die 22 bekannten Mitglieder enthalten definierte konservierte α -helikale Aminosäuresequenzen, so genannte Bcl-2-Homologie-Domänen (BH-Domänen). Entsprechend ihrer Funktion und Struktur werden die Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie in drei Gruppen unterteilt: Die anti-apoptotischen Proteine (z.B. Bcl-2, Bcl-xL) enthalten alle vier bekannten BH-Domänen (BH1-BH4) und fördern das Überleben der Zelle durch Bindung und Inhibition der Funktion pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine. Pro-apoptotische Multidomänen-Proteine (z.B. Bax, Bak) weisen die Domänen BH1-BH3 auf und sind die einzigen Bcl-2-Proteine, die aktiv die äußere Mitochondrienmembran durch Ausbildung von Poren permeabilisieren können. Die pro-apoptotischen *BH-3-only*-Proteine (z.B. Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf) weisen zwar große strukturelle Unterschiede auf, enthalten jedoch alle die BH-3-Domäne. Die „Aktivatoren“ Bid und Bim können die porenbildende Aktivität von Bax und Bak verstärken; Bad und Bik wirken als „Sensoren“ für apoptotische Stresssignale und verdrängen die „Aktivator“-Proteine aus der Bindung an Bcl-2 und Bcl-xL (17; 18).

Die Ereignisse, die zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran führen, sind in Abbildung 1.4 zusammengefasst. In Abwesenheit apoptotischer Stimuli sind Bcl-2 und Bcl-xL an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert, während die pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine entweder im Cytosol oder ebenfalls an der Mitochondrienmembran vorliegen. Apoptotische Signale führen zur Aktivierung der pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine und deren Translokation zu den Mitochondrien. Dort erfolgt dann die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran sowie die Freisetzung des mitochondrialen Proteins Cytochrom c. Im Cytosol interagiert Cytochrom c mit dem *apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1) und Caspase-9 zum Apoptosom.

Durch Regulation der Expression (Bcl-2, Bax, Bak), der Phosphorylierung (Bcl-2, Bad, Bim, Bik), der proteolytischen Spaltung (Bid) und der intrazellulären Lokalisation (Bax, Bim, Bmf) hat die Zelle die Möglichkeit, das Verhältnis von anti- und pro-apoptotischen Signalen zu kontrollieren (17).

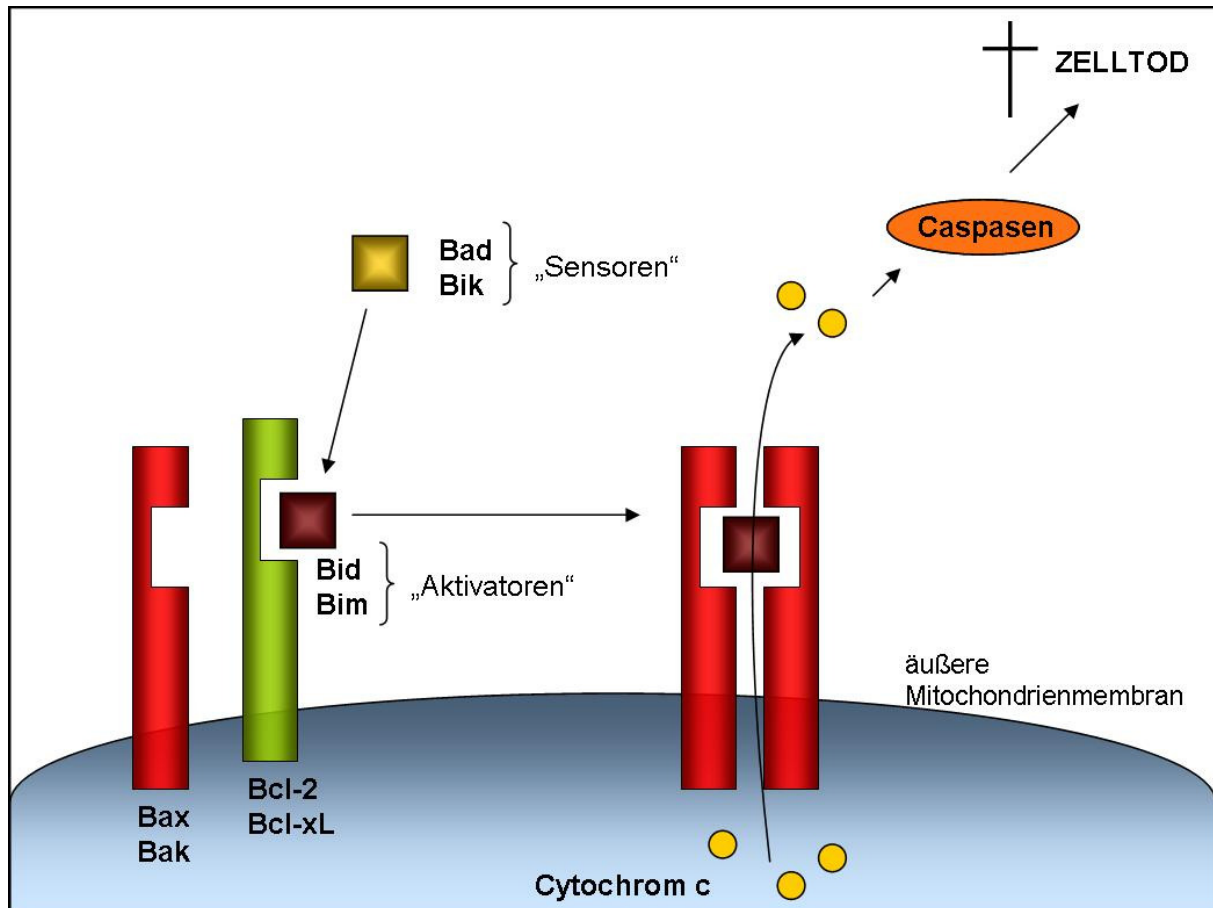


Abbildung 1.4: Regulation der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran durch Bcl-2-Proteine. Die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak sind die einzigen Bcl-2-Proteine, die während des apoptotischen Zelltods aktiv zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran fähig sind. Die Multimerisierung von Bax oder Bak führt zur Porenbildung, der Freisetzung von Cytochrom c ins Cytosol sowie der Aktivierung von Effektorcaspasen. Die porenbildende Aktivität von Bax und Bak wird durch die BH-3-only-Aktivator-Proteine (Bid und Bim) stimuliert. Anti-apoptotische Proteine (Bcl-2 und Bcl-xL) verhindern eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran indem sie mit Bax und Bak assoziieren und dadurch deren porenbildende Aktivität blockieren bzw. an die Aktivatoren Bid und Bim binden und dadurch indirekt die Porenbildung verhindern. Die BH-3-only-Sensorproteine (Bad und Bik) verdrängen die Aktivatorproteine aus der Bindung an Bcl-2 oder Bcl-xL und verstärken dadurch deren Aktivatorfunktion [adaptiert nach (17)].

1.4.1.2 Caspasen

Überwiegen die pro-apoptotischen Stimuli, wird eine intrazelluläre Kaskade in Gang gesetzt. Die zentralen Komponenten des apoptotischen Zelltodapparats stellen dabei die Caspasen dar, Cystein-Proteasen, die ihre Substrate an konservierten Aspartat-Resten spalten (19-24). Bei den apoptotischen Caspasen unterscheidet man zwischen Initiator- und Effektorcaspasen. Beide Subtypen liegen in allen Zellen als

inaktive Proenzyme vor, deren Aktivität durch extrinsische oder intrinsische Signale induziert werden kann. Die Initiator- oder *upstream*-Caspasen (Caspasen-2, -8, -9 und 10) besitzen lange Prodomänen (>90 Aminosäuren) und enthalten Erkennungsmotive (CARD: *caspase-activation and recruitment domain* und DED: *death effector domain*), über die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, z.B. Todesrezeptor-assoziierten Signalproteinen, möglich sind. Vor ihrer Aktivierung liegen die Initiatorcaspasen als inaktive Monomere mit großen und kleinen Untereinheiten vor. Zur Aktivierung ist die Rekrutierung der Proenzyme an Adaptorproteine in Multiproteinkomplexen notwendig, wo die Caspasemonomere dann dimerisieren und durch die damit verbundenen Konformationsänderungen aktiviert werden (22; 23). In dieser Form können die Initiatorcaspasen nachfolgend Effektor- oder *downstream*-Caspasen (Caspasen-3, -6 und 7) aktivieren. Diese besitzen kurze Prodomänen (20-30 Aminosäuren) und liegen im Cytosol als inaktive Dimere vor. Durch proteolytische Spaltung an bestimmten Erkennungsmotiven entstehen Untereinheiten von etwa 10 und 20 kDa (15; 23; 25; 26). Die Erkennungsmotive bestehen aus einer Sequenz von vier Aminosäuren P1–P4, die durch ein Aspartat an P1 (daher das „asp“ im Namen **Caspase**) und eine starke Präferenz für Glutamin an P3 gekennzeichnet ist (27). Prozessierte Effektorcaspasen bilden Heterotetramere, die aus je zwei p10 und p20 Untereinheiten und einem Cysteinrest im katalytischen Zentrum (daher das „C“ im Namen **Caspase**) bestehen. In ihrer aktivierten Form vermitteln sie eine schnelle Verstärkung und den Fortschritt des apoptotischen Signals, indem sie weitere Caspasen prozessieren und aktivieren („Schneeballeffekt“). Am Ende der Kaskade kommt es schließlich zum gezielten und spezifischen Abbau bestimmter essentieller zelleigener Proteine (*targets*) sowie der chromosomalen DNA. Die Mechanismen der Caspasen-Aktivierung sind in Abbildung 1.5 veranschaulicht.

Wichtige Regulatoren der Apoptose auf der Ebene der Caspasen sind die IAPs (*inhibitors of apoptosis proteins*). Die Mitglieder dieser Proteinfamilie inhibieren die apoptotische Kaskade, indem sie entweder an Pro-Caspasen binden, um deren Aktivierung zu verhindern oder sie binden an prozessierte Caspasen und hemmen deren Aktivität. Kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, werden gleichzeitig auch Proteine freigesetzt, die die Funktion der IAPs blockieren (IAP-Antagonisten) und auf diese Weise die Effizienz des Apoptose-stimulierenden Prozesses verstärken (22).

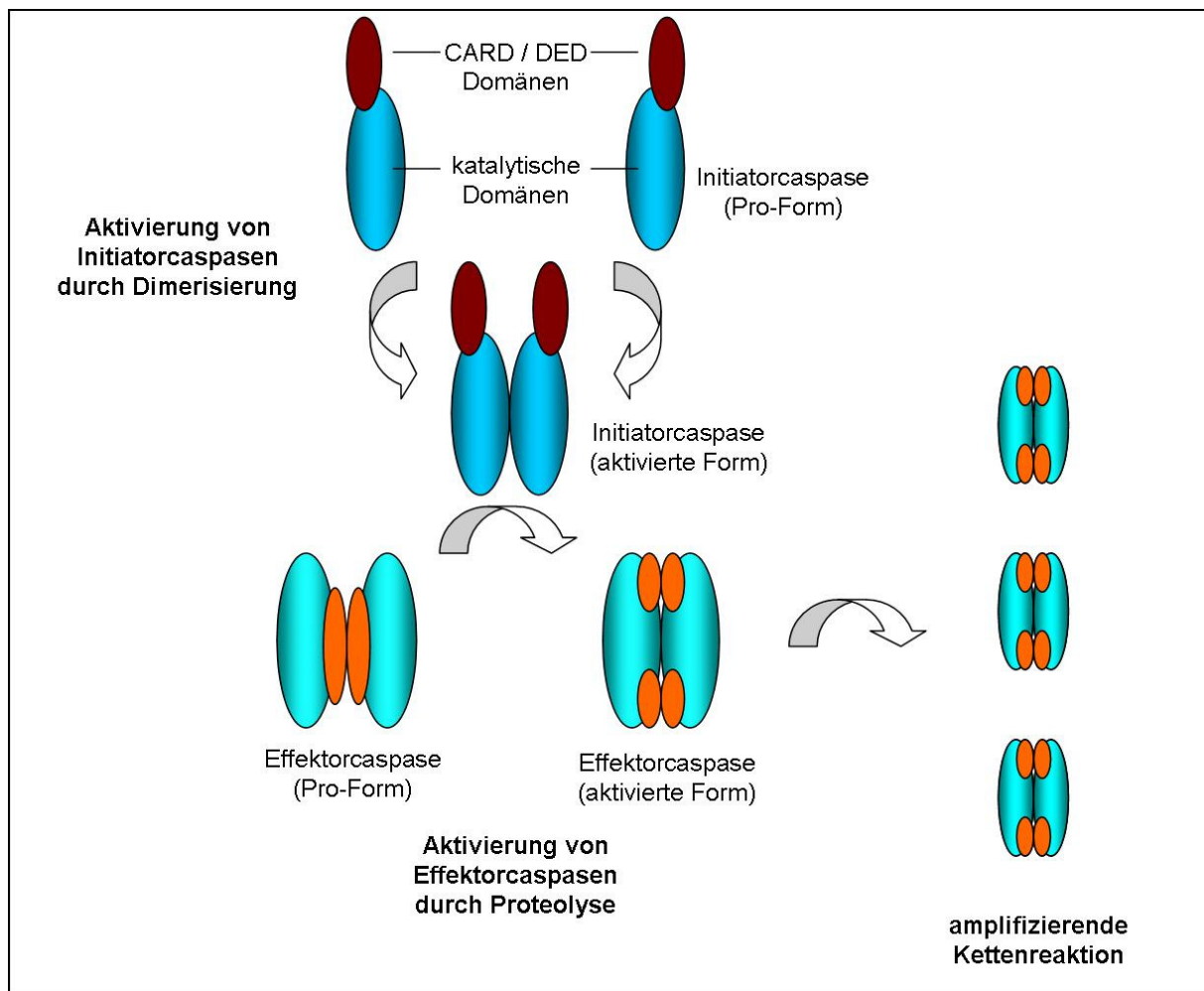


Abbildung 1.5: Mechanismen der Pro-Caspasen-Aktivierung. Die inaktiven Pro-Formen der Initiatorcaspasen liegen als Monomere, die der Effektorcaspasen als Dimere vor. Die Aktivierung der Initiator-Caspasen erfolgt durch die DED- oder CARD-Domänen-vermittelte Rekrutierung an Multiproteinkomplexen („Aktivierungsplattformen“) und die dortige Dimerisierung. Die aktivierten Initiatorcaspasen aktivieren dann durch proteolytische Spaltung downstream gelegene Effektorcaspasen, welche im Anschluss weitere Effektorcaspasen aktivieren können und auf diese Weise zur Amplifikation des apoptotischen Signals beitragen [modifiziert nach (15)].

Interessanterweise gibt es bislang keine einheitlich erkennbare Reihenfolge der Caspasen-Aktivierung im Verlauf der unterschiedlichen Apoptoseformen. Vielmehr scheinen der Zelltyp und die Art des apoptotischen Triggers ausschlaggebend dafür zu sein, welche spezifische Sequenz von Caspasen nacheinander aktiviert wird (28-32).

1.4.2 Anoikis – Induktion von Apoptose nach Verlust der Zellverankerung

Meredith *et al.* (33) beobachteten 1993, dass Endothelzellen apoptotisch absterben, wenn ihnen der Kontakt zur extrazellulären Matrix entzogen wird. Das gleiche Phänomen beschrieben Frisch und Francis (34) an renalen Epithelzellen und gaben ihm den Namen *Anoikis* (griech.: Zustand der Heimatlosigkeit). Ihre ursprüngliche Definition von Anoikis - „Apoptose, die durch den Verlust des Zell-Matrix-Kontakts induziert wird“ – wurde inzwischen erweitert zu „Apoptose, die durch den Verlust der Zellverankerung induziert wird“, da neuere Daten zeigen, dass auch der Verlust der Zell-Zell-Verankerung zum apoptotischen Zelltod führen kann (35-38).

Diese spezielle Form des Zelltods ist von besonderer physiologischer Relevanz, da ein Verlust der Verankerungsabhängigkeit einen wesentlichen Schritt im Rahmen der neoplastischen Transformation adhärenter Zellen darstellt. Maligne transformierte, metastasierende Zellen entwickeln eine Anoikisresistenz und sind deshalb in der Lage, sich aus dem Zellverband bzw. von der Matrix zu lösen ohne der Apoptose zu unterliegen (39-44).

Inzwischen wurde Anoikis für eine Vielzahl adhärent wachsender Zelltypen beschrieben, wie den mammären (45; 46), thyreoidalen (47), intestinalen (30; 48) und bronchialen Epithelzellen (35), aber auch für Keratinozyten (49; 50), Endothelzellen (51) und Fibroblasten (52). 1996 wurde Anoikis erstmals bei intestinalen Epithelzellen beobachtet (48) und in den letzten Jahren genauer charakterisiert (30; 53-55): Primäre humane Kolonepithelzellen sind hochgradig verankerungsabhängig und deshalb besonders anfällig für Apoptose. Sie unterliegen nach Verlust der Zellverankerung innerhalb weniger Stunden dem programmierten Zelltod. Dabei hat die Lokalisation der Epithelzelle innerhalb der Krypte keinen Einfluss auf ihre Anoikis-Anfälligkeit. Im Verlauf der Anoikis von Kolonepithelzellen kommt es zu einer hierarchischen Aktivierung der Caspasen-2 und -9, anschließend zur Prozessierung der Caspasen-7, -3 und -6. Daneben wurde die Freisetzung von Cytochrom c und die Translokation der aktivierten Caspase-3 in den Zellkern beobachtet (Abbildung 1.6) (53).

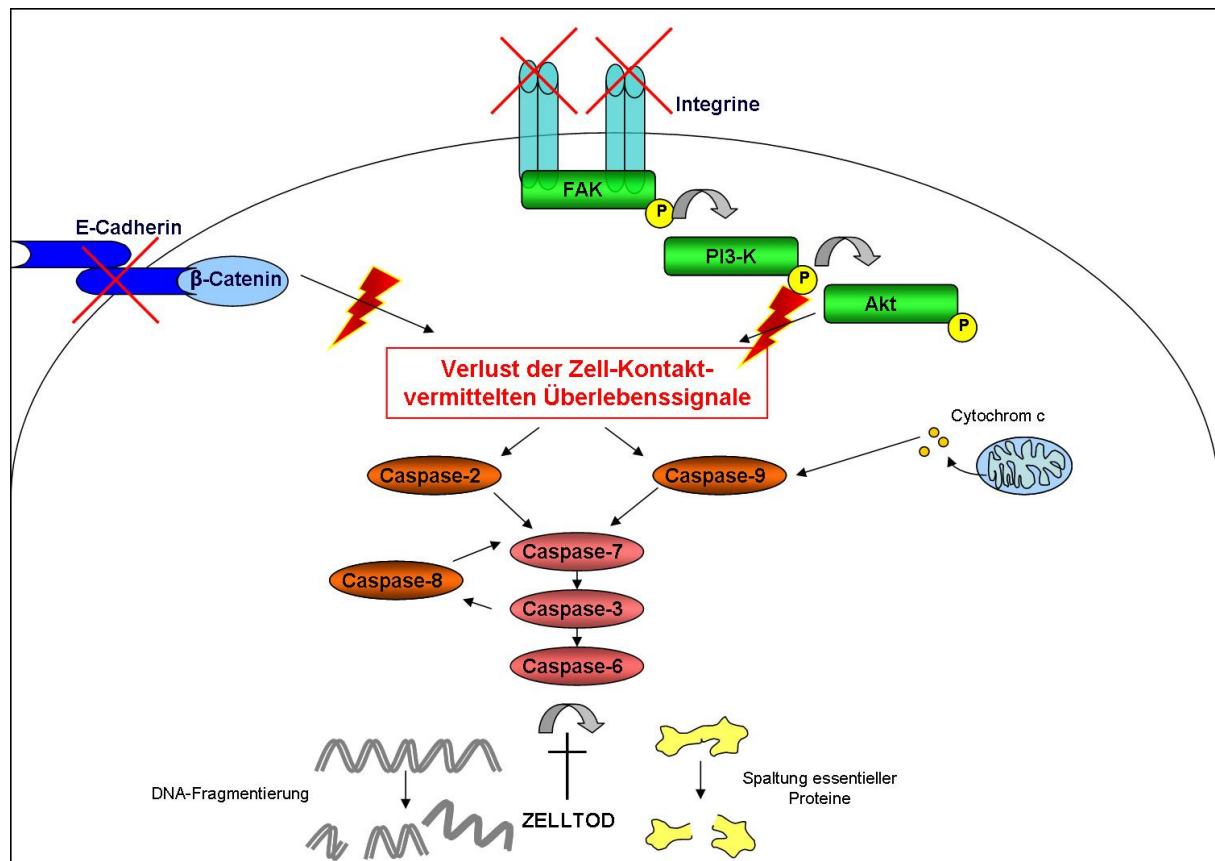


Abbildung 1.6: Signaltransduktion nach Induktion von Anoikis in primären humanen Kolonepithelzellen. Der Verlust der Zellverankerung führt zur Aktivierung der Initiatorcaspasen-2 und -9, gefolgt von der raschen Aktivierung der Effektorcaspasen-7, -3 und -6. Parallel erfolgt die Prozessierung von Caspase-8 sowie die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Die apoptotische Signalkaskade endet mit der Fragmentierung der DNA sowie der Proteolyse wichtiger zellulärer Proteine [modifiziert nach (53)].

1.5 Rolle der Zellverankerung als Überlebensfaktor

Die Verankerung adhärenter Zellen in ihrem Gewebsverband kommt durch Zell-Matrix-Kontakte und Zell-Zell-Kontakte zustande. Beiden Formen der Zellverankerung liegen auf molekularer Ebene unterschiedliche Strukturen zugrunde. Die Zell-Adhäsion an die Bestandteile der extrazellulären Matrix erfolgt überwiegend über Integrine, während Zell-Zell-Kontakte durch Strukturen wie *tight junctions*, *adherens junctions*, Desmosomen und *gap junctions* vermittelt werden.

Neben der rein mechanischen Verankerung der Zelle spielen diese Strukturen auch in funktioneller Hinsicht eine wichtige Rolle, da sie fähig sind, Signale zu übertragen, die für das Überleben und die Proliferation der Zelle von großer Bedeutung sein

können. Ein Fehlen dieser Signale aufgrund des Verankerungsverlustes induziert in den meisten adhären Zelltypen Anoikis.

Die unterschiedlichen Elemente der Zellverankerung werden im Folgenden näher charakterisiert.

1.5.1 Zell-Matrix-Verankerung

Die Verankerung von Zellen an die Komponenten der extrazellulären Matrix (Kollagene, Fibronectin, Laminin, etc.) kommt hauptsächlich über Integrine zustande. Integrine sind heterodimere Transmembranproteine, die aus je einer alpha- ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4, \dots$) und einer beta-Kette ($\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \dots$) bestehen, welche kovalent miteinander verbunden sind. Es sind über 20 Kombinationen von alpha- und beta-Ketten bekannt, wobei ein spezifisches Integrin an unterschiedliche Komponenten der extrazellulären Matrix binden kann, genauso wie umgekehrt verschiedene Integrine die Bindungspartner einer bestimmten Matrixkomponente sein können (56; 57).

Neben der physikalischen Zellverankerung übernehmen Integrine auch eine wichtige Funktion bei der Aktivierung intrazellulärer mitogener Signalfade, die einen wesentlichen Einfluss auf das Überleben der Zelle haben (58-60). Die Zelladhäsion führt zum *clustering* der Integrine und zur Ausbildung so genannter fokaler Adhäsionen, Integrin-assoziiierter Signalkomplexe, deren wesentliche Komponenten Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie z.B. die *Focal Adhesion Kinase* (FAK) sind (Abbildung 1.6) (61-63). Mit Hilfe der assoziierten Signalproteine können dann unterschiedliche mitogene und anti-apoptotische Signalkaskaden aktiviert werden (64-76).

1.5.2 Zell-Zell-Verankerung

Die Zell-Zell-Verankerung wird in Abhängigkeit vom Zelltyp von unterschiedlichen Adhäsionsproteinen vermittelt. Zwischen benachbarten Epithelzellen und Endothelzellen bilden sich *tight junctions* aus, die unter anderem für die

Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere und Polarität von entscheidender Bedeutung sind. Direkt unterhalb der *tight junctions* findet man die *adherens junctions*, über die der interzelluläre Kontakt durch Assoziation von Cadherinen zustande kommt (Abbildung 1.7). Die Proteinfamilie der Cadherine besteht aus *single-pass*-Transmembran-Glykoproteinen, die eine Ca^{2+} -abhängige Zell-Zell-Adhäsion vermitteln. Zu den klassischen Cadherinen gehören E-Cadherin (in Epithelzellen), N-Cadherin (in Endothel-, Neuronal- und Muskelzellen) und P-Cadherin (in Zellen der Plazenta). Die durch die Cadherine vermittelte Zelladhäsion kann zwischen homotypischen Zellen (z.B. über E-Cadherin der intestinalen Epithelzellen) oder heterotypischen Zellen (z.B. die Bindung von Melanomzellen an Fibroblasten durch N-Cadherin) erfolgen (77; 78). Um die Stabilität der Zell-Zell-Interaktion zu verstärken, müssen die intrazellulären Domänen der Cadherine über Ankerproteine – unter anderem α -, β - und γ -Catenin – mit dem Actin-Cytoskelett verbunden werden.

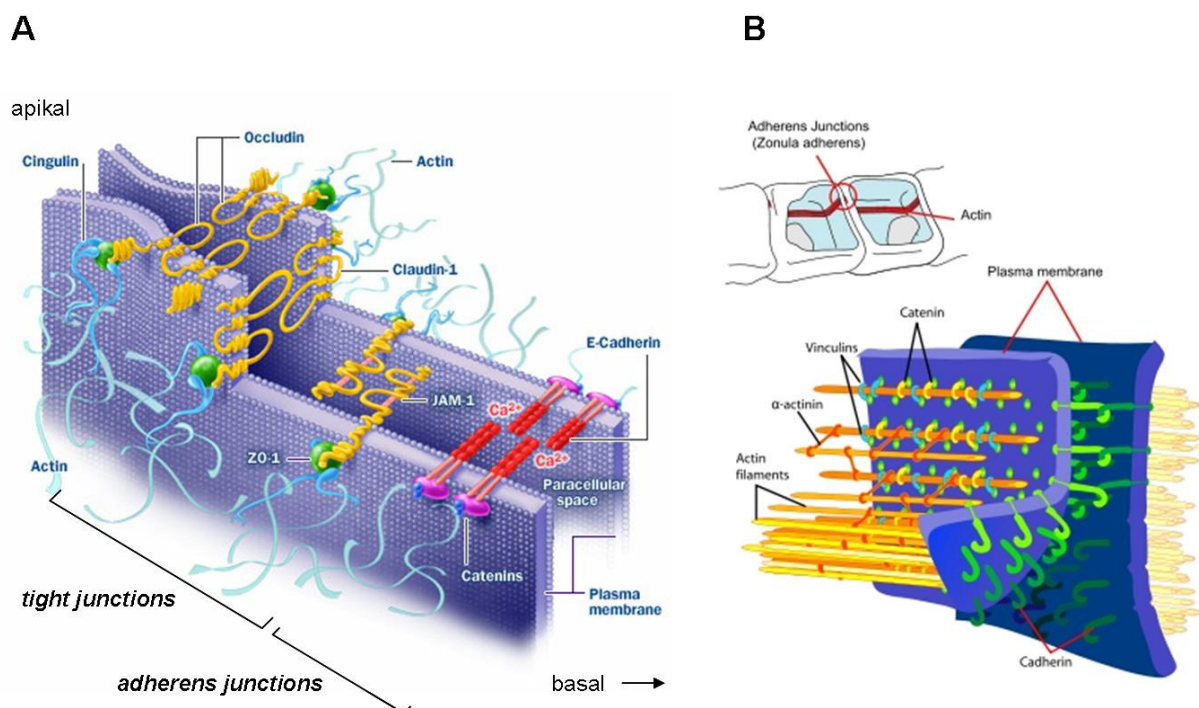


Abbildung 1.7: Schematischer Aufbau von tight und adherens junctions.

(A) Komponenten der Zell-Zell-Kontakt-vermittelnden tight und adherens junctions [modifiziert nach http://www.nastech.com/nastech/junctions_biology]. (B) Wechselwirkungen struktureller Proteine an Cadherin-abhängigen adherens junctions [Quelle: <http://en.wikipedia.org/wiki/Cadherin>].

Ähnlich wie bei den Integrinen geht auch die Funktion der Cadherine über die der reinen Zellverankerung hinaus, da sie ebenfalls an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sein können. Der Verlust dieser Zell-Zell-Kontakt-abhängigen Signale kann neben der strukturellen Instabilität der Zelle auch zur Induktion des programmierten Zelltods führen: Nach Deletion von Cadherin in chimären Mäusen *in vivo* wurde eine erhöhte Apoptoserate der intestinalen Epithelzellen beobachtet (37). Dagegen waren orale Plattenepithelzellen sowie Epithelzellen des renalen Tubulussystems nach Verlust der Zell-Matrix-Verankerung durch Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte vor Anoikis geschützt. Erst durch eine zusätzliche Blockierung der E-Cadherin-Bindung wurde Apoptose induziert (36; 38). Auch in primären murinen Brustepithelzellen wird Anoikis trotz Verlust der Zell-Matrix-Verankerung durch vorhandene Zell-Zell-Kontakte blockiert (79), und konfluente Fibroblasten bilden Zell-Zell-Kontakte aus, die sie nach Verlust der Zell-Matrix-Verankerung vor Anoikis schützen (52).

1.5.3 Zell-Kontakt-vermittelte Signaltransduktion

Über die Zell-Kontakt-vermittelnden Strukturen werden der Zelle eine Reihe von Überlebenssignalen vermittelt, deren Verlust mit der Induktion von Anoikis verbunden ist (Abbildung 1.6). Intrazellulär sind daran eine Reihe von Überlebenspfaden beteiligt, die die strukturelle Information der Zellverankerung in ein anti-apoptotisches Signal „übersetzen“. Die Komponenten der Signaltransduktion variieren zwar je nach Zelltyp, dennoch gibt es einige zentrale Proteine und Pfade, die für das Zell-Kontakt-abhängige Überleben von besonderer Bedeutung sind. Diese werden im Folgenden kurz beschrieben.

1.5.3.1 *Focal Adhesion Kinase (FAK)*

Die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase FAK ko-lokalisiert an fokalen Adhäsionen mit Integrinen und spielt deshalb vor allem bei der Zell-Matrix-Adhäsion eine zentrale Rolle. Die Bindung von FAK an Integrin-assoziierte Signalkomplexe führt zur Autophosphorylierung von Tyrosin 397 (Tyr397) und zur Rekrutierung und Phosphorylierung diverser Effektorproteine, durch welche wiederum eine Reihe

unterschiedlicher pro-mitotischer und anti-apoptotischer Signalkaskaden aktiviert werden. Durch die Interaktion mit FAK kommt es so unter anderem zur Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signalpfads (68-70), des Ras/Erk-Signalpfads (65-67; 71; 75; 76) sowie der MAPK-Kaskade (64; 72-74). Die Expression einer konstitutiv aktiven FAK-Form verleiht Zellen eine Anoikisresistenz (18; 80; 81). Dagegen induziert eine Hemmung von FAK-abhängigen Signalen in Tumorzellen Anoikis, nachdem diese vom Substrat abgelöst wurden (80; 81). In normalen Kolonepithelzellen führt die Induktion von Anoikis zu zwei aufeinander folgenden Spaltungen des nativen FAK-Proteins, die von den Caspasen-3 und -6 ausgeführt werden (54). Die Proteolyse von FAK schaltet die von diesem Protein vermittelten Überlebenssignale ab. Das bei der Spaltung entstehende carboxyterminale Fragment wirkt dann als Inhibitor weiterer FAK-abhängiger Signaltransduktion, wodurch der apoptotische Effekt der FAK-Spaltung weiter verstärkt wird (81).

1.5.3.2 Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K)/Akt

Es sind eine Reihe extrazellulärer Stimuli bekannt, die zur Aktivierung PI3-K/Akt-abhängiger Signale führen (82-85). Die Lipidkinase PI3-K und die Serin-Threonin-Kinase Akt stellen deshalb zentrale Komponenten der intrazellulären Transduktion von Überlebenssignalen dar (86). Die aktivierte Form von PI3-K katalysiert die Phosphorylierung von Phosphatidylinositolresten an der intrazellulären Seite der Plasmamembran. Die phosphorylierten Phosphatidylinositolreste stimulieren die Rekrutierung und Bindung der Proteinkinase Akt an die Membran, wo dann durch Phosphorylierung die Aktivierung von Akt erfolgt. In der aktivierten Form vermittelt Akt intrazelluläre Überlebenssignale durch Phosphorylierung einer Reihe von Substraten, wodurch unter anderem die Funktion pro-apoptotischer Proteine wie Bad und Pro-Caspase-9 inhibiert wird (87). Durch die Überexpression von Akt wird daher Apoptose in Epithelzellen verhindert (68).

Neben der essentiellen Bedeutung bei der Zell-Matrix-Kontakt-vermittelten Signaltransduktion (18) scheint der PI3-K/Akt Signalpfad auch bei der Zell-Zell-Kontakt-vermittelten Überlebenssignaltransduktion eine wichtige Rolle zu spielen: Die Ausbildung von E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Kontakten zwischen MDCK-Zellen induziert die physikalische Assoziation von PI3-K an E-Cadherin-enthaltende Multiproteinkomplexe der *adherens junctions* sowie eine PI3-K-abhängige

Aktivierung von Akt und die darauf folgende Translokation von Akt in den Zellkern (88). In konfluenten Caco-2-Monolayern wurde ebenfalls eine Rekrutierung von PI3-K an die *adherens junctions* beobachtet. Die Aktivierung von PI3-K führte dabei zur *downstream*-Stimulation Akt- und p38 MAPK-abhängiger Signalpfade (86). Nach Verlust der Zell-Matrix-Verankerung bewirkte die Aggregation proximaler Tubuluszellen der Maus eine Aktivierung von PI3-K, wodurch die Zellen vor Apoptose geschützt waren (36).

1.5.3.3 *Epidermal Growth Factor-Rezeptor (EGFR)*

Der EGFR gehört zu einer Familie von Rezeptor-Tyrosinkinasen, die unter anderem für Zell-Zell-Interaktionen während der Organogenese von Bedeutung sind. Die EGFR-vermittelte Signaltransduktion erfolgt über einen klassischen Wachstumsfaktor-Signalpfad: Die Bindung von Liganden (z.B. EGF, TGF- α) an die monomere Form des Rezeptors aktiviert dessen cytoplasmatische katalytische Funktion durch Dimerisierung und Autophosphorylierung an bestimmten Tyrosinresten. Letztere dienen als Bindungsstellen für eine Reihe von Adaptormolekülen, die wiederum eine Vielzahl von Signalkaskaden stimulieren, unter anderem den Erk/MAPK-Signalweg (89).

Eine Aktivierung von EGFR und des *downstream* gelegenen MAPK-Pfads trägt zum verankerungsunabhängigen Überleben humaner Keratinozyten bei (90). Der Rezeptor kann auch Liganden-unabhängig durch Integrin-Bindung aktiviert werden und Zelladhäsions-abhängig Wachstum und Proliferation vermitteln (91). Es gibt darüber hinaus auch Hinweise auf eine Interaktion von EGFR und E-Cadherin: In humanen Keratinozyten und oralen Plattenepithelkarzinomzellen kommt es in Abwesenheit von Zell-Matrix-Kontakten zur Ausbildung von E-Cadherin-EGFR-Komplexen, einer Liganden-unabhängigen Aktivierung des Rezeptors sowie zur Stimulation des MAPK-Signalwegs. In oralen Plattenepithelkarzinomzellen wird mit Hilfe dieses Mechanismus' Apoptose inhibiert (92; 93).

1.5.3.4 *Mitogen-activated protein kinases (MAPK)*

Ein anderer Signalpfad, der häufig für das Überleben von Zellen eine Rolle spielt, ist die Ras-MEK-MAPK-Kaskade (94; 95). Über den MAPK-Signalpfad erfolgt die Regulation fast aller wichtigen zellulären Aktivitäten (96). Auch eine Reihe von Stimuli, die von Integrinen ausgehen, laufen an dieser Stelle zusammen (64; 72-74). Wie in Abschnitt 1.5.3.3 beschrieben, münden daneben viele EGFR-vermittelte Stimuli in den MAPK-Signalweg. Onkogenes Ras schützt intestinale Epithelzellen der Ratte durch Aktivierung eines PI3-K-unabhängigen und MAPK-abhängigen Pfads vor Anoikis (97). Des Weiteren sind Fibroblasten und MDCK-Zellen nach Verlust der Zell-Matrix-Verankerung vor Apoptose geschützt, wenn der MAPK-Überlebenspfad konstitutiv aktiviert ist (71).

1.5.3.5 *Src*

Src-Kinasen stellen einen weiteren Faktor dar, der das Potential besitzt, Anoikis effektiv zu hemmen (98; 99). Innerhalb der Familie der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen zählt Src als Schlüsselprotein für Zellüberleben und -wachstum und kann in Epithelzellen an der Regulation verschiedener Signalwege beteiligt sein (100). Ursprünglich wurde dieses Molekül als Onkogen (*v-Src*) des Retrovirus *Rous sarcoma virus* entdeckt und erst später fand man das entsprechende zelluläre Protein c-Src (101; 102). Die Familie der Src-Kinasen besteht aus mehreren Mitgliedern (Src, Lyn, Fyn, Yes, Hck, Fgr, Blk und Lck). Die Regulation der Src-Aktivität erfolgt über Phosphorylierungen an negativen regulatorischen (Tyr527) und positiven regulatorischen Resten (Tyr416) (103). In über 80% der Darmkrebszellen sind Src-Expression und -Aktivität im Vergleich zu Epithelzellen aus gesundem Gewebe stark erhöht (104) und hohe Src-Aktivitäten verleihen IEC-18-Zellen und Kolonkarzinomzellen Anoikisresistenz (104; 105). Eine Modulation bzw. Veränderung der Src-Aktivität kann sich daher stark auf die Regulation von Zellproliferation und -überleben auswirken (98; 99). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass Src eine zentrale Komponente des E-Cadherin/PI3-K-Signalpfads darstellt, da die Src-Kinaseaktivität für die Rekrutierung von PI3-K an die Proteinkomplexe der *adherens junctions* nötig ist (106).

1.5.3.6 *Nuclear factor kappa B* (NF- κ B)

NF- κ B ist ein induzierbarer Transkriptionsfaktor, der aus mehreren Untereinheiten aufgebaut ist (cRel, RelA, RelB, p50 und p52) und in nahezu allen Zelltypen vorkommt. Jedes Mitglied der NF- κ B-Familie besitzt eine N-terminal gelegene, aus 300 Aminosäuren aufgebaute *rel homology domain* (RHD). Dieser Bereich ist für die DNA-Bindung, Dimerisierung und die Interaktion mit der I κ B (*inhibitor of kappa B*) - Familie, den Inhibitoren von NF- κ B, zuständig. In den meisten Zellen liegt NF- κ B im Cytoplasma als inaktives Heterodimer aus RelA (p65) und p50 vor. In dieser Form ist es an die I κ B-Proteine gebunden, welche die Aktivität des Transkriptionsfaktors regulieren. NF- κ B-aktivierende Stimuli führen zur Phosphorylierung und Ubiquitinierung sowie zum anschließenden proteasomalen Abbau von I κ B. Auf diese Weise kommt es zur Freisetzung von NF- κ B, welches in den Zellkern transloziert und dort die Transkription bestimmter Zielgene initiiert. Hierzu gehören unter anderem eine Reihe von Genen, die bei Immunreaktionen von Bedeutung sind, wie IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), Cyclooxygenase-2 (COX-2), ICAM-1, VCAM-1 und MHC Klasse II Moleküle (107). Die Aktivierung von NF- κ B kann durch eine Vielzahl von verschiedenen Stimuli erfolgen, unter anderem durch Substanzen wie IL-1, TNF- α , Lipopolysaccharid, doppelsträngige RNA und cAMP (108-110).

Neuere Daten zeigen, dass auch der Verlust der Zellverankerung zur unmittelbaren Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs führt und daher ein Zusammenhang zwischen Zellkontakten und der NF- κ B-Aktivität besteht (111). Die Induktion von NF- κ B nach Zellverankerungsverlust bewirkt eine deutliche Verzögerung des apoptotischen Prozess in IEC-18-Zellen (111). Dieser Anti-Anoikis-Effekt wird unter anderem durch die erhöhte Expression von Bcl-2 und IAP-1 vermittelt (112). NF- κ B spielt daher direkt nach Verlust der Zellverankerung eine wichtige Rolle für das Überleben von IEC-18-Zellen.

2 Arbeitsziele

Während die anti-apoptotische Signaltransduktion, die durch Integrin-vermittelte Bindungen der Zelle an die extrazelluläre Matrix induziert wird, in diversen Zelltypen inzwischen sehr gut charakterisiert ist (18), gab es bisher nur wenige Daten darüber, in welchem Maß und über welche Signalwege Zell-Zell-Kontakte zum Überleben adhärenter Zellen beitragen. Die Bedeutung der Zell-Zell-Verankerung für das Überleben der hochgradig verankerungsabhängigen primären humanen Kolonepithelzellen war dabei noch völlig unklar.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde ein Protokoll zur Isolation dieser Zellen entwickelt, mit Hilfe dessen eine schnelle und effiziente Gewinnung intakter Kolonepithelzellkrypten möglich ist (113; 114). Darauf basierend sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Zell-Zell-Verankerung auf das Apoptoseverhalten bzw. das Überleben primärer humaner Kolonepithelzellen untersucht werden.

Als Grundlage sollte ein Modell entwickelt werden, mit dessen Hilfe es möglich ist, bestehende Zell-Zell-Kontakte innerhalb einer Kolonepithelzellkrypte über mehrere Stunden aufrecht zu erhalten. Gleichzeitig sollten die Zellen jedoch keine Kontakte zu Bestandteilen der extrazellulären Matrix ausbilden können. Die isolierten Zellen sollten hierzu zu Zellaggregaten zentrifugiert und der Erhalt von Zell-Zell-Kontakten elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden.

Zunächst sollte untersucht werden, in welchem Maß Zell-Zell-Kontakte die Apoptoserate primärer humaner Kolonepithelzellen beeinflussen. Auf molekularer Ebene sollte in Zellen mit aufrecht erhaltener Zell-Zell-Verankerung der Grad an Apoptose anhand der Aktivierung von Caspasen sowie der DNA-Fragmentierung ermittelt werden.

Weiterhin sollte aufgeklärt werden, welche Zell-Zell-Kontakt-vermittelnden Strukturen neben ihrer mechanischen Funktion auch an Signaltransduktionsprozessen in Kolonepithelzellen beteiligt sein können. Dabei sollten zunächst die Rolle von

Komponenten der *adherens junctions* untersucht werden, da die Ausbildung dieser Proteinkomplexe das initiale Ereignis der Zell-Zell-Adhäsion darstellt (115-118) und bereits gezeigt wurde, dass E-Cadherin als Rezeptormolekül wirken kann, welches durch Zell-Zell-Adhäsion aktiviert wird (106).

Zusätzlich sollte analysiert werden, welchen Einfluss die Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Verankerung auf die Regulation von Bcl-2-Proteinen hat. Dazu sollten zunächst die Mengen einzelner Vertreter der Bcl-2-Familie in Kolonepithelzellen mit intakter Zell-Zell-Adhäsion bzw. nach Verlust der Zellverankerung ermittelt und miteinander verglichen werden. Darüber hinaus sollten cytosolische und mitochondriale Proteinfractionen aus Zellen mit bestehenden bzw. abwesenden Zell-Zell-Kontakten isoliert werden und hinsichtlich der intrazellulären Lokalisation von Bcl-2-Proteinen untersucht werden.

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit sollte die Identifizierung von Signalwegen sein, welche durch Zell-Zell-Kontakte aktiviert und reguliert werden. Hierzu sollten zunächst die Aktivierungszustände bestimmter Signalmoleküle in Kolonepithelzellen mit intakter Zell-Zell-Verankerung ermittelt und mit Zellen nach vollständigem Verlust der Zellkontakte verglichen werden. Im Anschluss sollten die aktivierten Signalpfade mit Hilfe spezifischer Inhibitoren blockiert werden, um Aufschluss darüber zu erhalten, in welchem Ausmaß die einzelnen Zell-Zell-Kontakt-abhängigen Signalwege das Überleben von Kolonepithelzellen beeinflussen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Herkunft von Material und Geräten

3.1.1.1 Material für die Kultur primärer humaner Kolonepithelzellen

Bovine Serum Albumin (BSA)	Biomol, Hamburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	PAA, Pasching Österreich
Keratinocyte Serum Free Medium (KSFM)	Gibco BRL, Eggenstein
Nylonfilter, 80 µm Porengröße	Sefar, Kansas City, USA
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco BRL, Eggenstein
Polypropylenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Trypanblau	Biochrom, Berlin

3.1.1.2 Geräte für die Kultur primärer humaner Kolonepithelzellen

Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Plattformschüttler	Bioblock Scientific, Illkirch, Frankreich

3.1.1.3 Material und Geräte für die Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer EPICS XL-MCL	Coulter Immuntech, Krefeld
Biofuge fresco	Heraeus Sepatech, Osterode
Polystyrenröhrchen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Trägerflüssigkeit Isoton®II	Coulter Immunotech, Krefeld

3.1.2 Herkunft von Chemikalien, Enzymen und Verbrauchsmaterial

3.1.2.1 Chemikalien

Die in den Experimenten dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme sind mit deren Bezugsquellen in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-para-nitroanilid (Ac-DEVD-pNA)	Biomol, Hamburg
Acrylamid-Bisacrylamid	National Diagnostics, Atlanta, USA
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
CHAPS	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
ChemMate™ Target Retrieval Solution	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Complete™ Proteasen Inhibitoren Cocktail	Boehringer, Mannheim
Digitonin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
DTT	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
EDTA	Merck, Darmstadt
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
HEPES	Merck, Darmstadt
Hyperfilm ECL™	Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Sucofin, Zeven
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriummolybdat (Na ₂ MoO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Nonidet P-40 (NP-40)	Boehringer, Mannheim
Para-Nitrophenylphosphat (PNPP)	Fluka, Buchs

PMSF	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ponceau S	Fluka, Buchs
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
RNase A	Qiagen, Hilden
Re-Blot-Solution	Chemicon International, Temecula, USA
Saccharose	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SDS	Fluka, Buchs
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Tris	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Xylencyanol	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

3.1.2.2 Verbrauchsmaterial

Einmal-Gelkassetten (1,0 mm; 10 well)	Invitrogen BV/Novex, Groningen, Niederlande
Kanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
96-well-Mikrotiterplatten	Nunc, Dänemark
Nitrozellulosemembranen	Invitrogen BV/Novex, Groningen, Niederlande
Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pipetten	Costar, Cambridge, Großbritannien
Polypropylenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritzen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Whatman-Papier	Invitrogen BV/Novex, Groningen, Niederlande

3.1.2.3 Sonstige Geräte

Absorptionsspektrometer	Perkin Elmer, Weiterstadt
Analysenwaage, Sartorius analytic A120 S	Sartorius, Göttingen
Elektrophoreseapparatur	Gibco BRL, Eggenstein
ELISA-Reader	MWG Biotech, Denkendorf
Millipore Wasser-Filtrationsanlage	Millipore, Eschhorn
pH-Meter	wiss. Tech.Werkstatt, Weilheim
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Videosystem	Visitron Systems, München
Vortex	Heidolph, Kelheim
Waage, Sartorius excellence E1200 S	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge, Biofuge15	Heraeus Sepatech, Hanau
Zentrifuge, Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech, Hanau

3.1.3 Fertigkombinationen von Biochemikalien (Kits)

Die in dieser Arbeit verwendeten Reagenziensätze von Biochemikalien („Kits“), sind mit deren Bezugsquellen in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

BIO-RAD Protein Assay	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
ECL-Plus™ Western Blotting Detection Kit	Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien
EGF ELISA	Biosource, Camarillo, USA
NF-κB-Aktivitätsassay	Active Motif, Carlsbad, USA
Phospho-c-Jun ELISA	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
TGF-α-ELISA	Calbiochem, Darmstadt

3.1.4 Standards und Marker

100 bp DNA Leiter	Gibco BRL, Eggenstein
Precision Plus Protein™ Standards „all blue“	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Rainbow™ Multi-colored Marker	Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien

3.1.5 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten, kommerziell erhältlichen Antikörper sind in den folgenden Tabellen unter Angabe des Spenderorganismus, des Klons und der Herstellerfirma zusammengefasst.

3.1.5.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Spender-organismus	Klon	Firma
Actin	Maus		Chemicon International, Temecula, USA
Akt	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Phospho-Akt (Thr308)	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Phospho-Akt (Thr308)	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Bad	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Phospho-Bad	Maus	7E11	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Bak	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Bax	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Bcl-2	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Bcl-xL	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Bik	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Bim	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA

Antikörper	Spender- organismus	Klon	Firma
Caspase-2	Ratte		Alexis Biochemicals, San Diego, USA
Caspase-3	Maus	19	BD Transduction Laboratories, Lexington, USA
Caspase-7	Maus		BD Transduction Laboratories, Lexington, USA
Caspase-8	Maus		BioCheck, Münster
Caspase-9	Maus	96-2-22	Biomol, Hamburg
β -Catenin	Maus	7D11	Biomol, Hamburg
Aktives β -Catenin	Maus	8E7	Biomol, Hamburg
EGFR	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Phospho-EGFR	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Erk1/2	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204)	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
FAK	Maus		Chemicon International, Temecula, USA
Phospho-FAK (Tyr397)	Kaninchen		Biosource, Camarillo, USA
p38 MAPK	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Phospho-p38 MAPK	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
SAPK/JNK	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Phospho- SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Src	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Phospho-Src (Tyr 416)	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA

3.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spender-organismus	Firma
Anti-Kaninchen IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Maus IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Ratte IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

3.1.6 Puffer und Lösungen

Allgemeine Puffer

PBS (10x)

NaCl	80,0 g/l
KCl	2,0 g/l
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	21,6 g/l
KH ₂ PO ₄	2,0 g/l
pH 7,4	

Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50x)

Tris/Acetat, pH 8,0	2 M
EDTA, pH 8,0	50 mM

DNA-Ladepuffer

Glycerin	5,47 ml
Bromphenolblau	25 mg
Xylencyanol	25 mg
EDTA (0,5 M)	2 ml
ad. 10 ml Aqua bidest.	

Proteinisolierung**CHAPS-Lysepuffer**

HEPES, pH 7,4	100 mM
CHAPS	0,1 %
Saccharose	10 %
DTT	1 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
PMSF	1 mM

1 Tablette Complete™ Protease Inhibitoren pro 10 ml Puffer

Western Blot

Tris-Trenngelpuffer	Tris 1,5 M, pH 8,8
Tris-Sammelgelpuffer	Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8
SDS (10 %)	
Ammoniumpersulfat (10%)	

Laemmli-Probenpuffer (2x)

Tris 0,5 M, pH 6,8	
Glycerin	20 %
SDS	4 %
β-Mercaptoethanol	2 %
Bromphenolblau	

Laufpuffer für die SDS-PAGE

Tris	2,9 g/l
Glycin	14,4 g/l
SDS	1 g/l

Transferpuffer

Tris	3 g/l
Glycin	14,5 g/l
Methanol	20 % (v/v)

Waschpuffer

Tris, pH 6,8	10 mM
NaCl	100 mM
Tween 20	0,1 % (v/v)

Herstellung von Zellkernextrakten**Phosphatase-Inhibitor-Puffer (PIB)**

NaF	125 mM
β -Glycerophosphat	250 mM
Para-Nitrophenylphosphat (PNPP)	250 mM
Na_3VO_4	25 mM

PBS/PIB

PIB	0,5 ml
PBS	10 ml

(unmittelbar vor Gebrauch ansetzen)

Hypotonischer Puffer (HB)

HEPES, pH 7,5	20 mM
NaF	5 mM
Na_2MoO_4	10 μM
EDTA	0,1 mM

Isolation von cytosolischen und mitochondrialen Fraktionen**Cytosol-Extraktionspuffer**

Saccharose	250 mM
KCl	70 mM
NaCl	137 mM
Na ₂ HPO ₄	4,3 mM
KH ₂ PO ₄ pH 7,2	1,4 mM
Digitonin	200 µg/ml

1 Tablette Complete™ Protease Inhibitoren pro 10 ml Puffer

Mitochondrien-Lysepuffer

Tris, pH 7,4	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	2 mM
EGTA	2 mM
Triton X-100	0,2 %
NP-40	0,3 %

1 Tablette Complete™ Protease Inhibitoren pro 10 ml Puffer

3.2 Methoden

3.2.1 Arbeiten mit primären humanen Kolonepithelzellen

3.2.1.1 Isolierung primärer humaner Kolonepithelzellen

Die Isolierung von primären humanen Kolonepithelzellen (KEZ) aus Darmresektaten erfolgte wie von Grossmann *et al.* (113) beschrieben. Aus Präparaten menschlichen Darms (normale, gesunde Mukosa; >10 cm Entfernung vom Tumor) wurden mit einer Schere Mukosastreifen abpräpariert. Anschließend wurden die Streifen für 30 min bei RT in einer 1 mM DTT-Lösung (in HBSS) unter leichtem Rühren inkubiert, um die Schleimschicht auf den Epithelzellen zu entfernen. Danach wurden die Mukosastreifen in eine 1 mM EDTA-Lösung (pH 8,0; in HBSS) überführt und 10 min bei 37°C unter Rühren inkubiert, kurz mit HBSS gespült, in ein frisches Gefäß mit ca. 20 ml HBSS (RT) überführt und 5-10-mal kräftig geschüttelt, um die intakten Krypten von der darunter liegenden extrazellulären Matrix abzulösen. Die abgelösten Epithelzellkrypten wurden von den Mukosastreifen mit Hilfe eines Stahlsiebs (400 µm Porengröße) getrennt und die Kryptenfraktion sofort auf Eis gestellt. Die Prozedur ab der Inkubation in 1 mM EDTA wurde insgesamt 2-3-mal wiederholt. Alle gewonnenen Kryptenfraktionen wurden vereinigt und die erhaltene Zellsuspension wurde zur weiteren Aufreinigung über einen Nylonfilter (80 µm Porengröße) passiert, um die in der Zellsuspension vorhandenen Einzelzellen (Erythrozyten, Leukozyten, Fibroblasten, etc.) zu entfernen. Die intakten Epithelzellkrypten verblieben im Filter und wurden im Anschluss mit gekühltem KSF-Medium heraus gewaschen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt. Mit Hilfe dieser Methode erhält man KEZ-Krypten, in denen die Zell-Zell-Kontakte erhalten bleiben, während die Zell-Matrix-Verankerung verloren geht.

3.2.1.2 Induktion von Anoikis in primären humanen Kolonepithelzellen

Direkt nach Isolation der primären humanen KEZ-Krypten wurden diese als Zellsuspension in KSFM in einem Polypropylenröhrchen bei 37°C auf einem Plattformschüttler inkubiert. Die Inkubation als Suspensionskultur führte innerhalb von ein bis zwei Stunden zur Auflösung der Kryptenstruktur in Einzelzellen. Durch

den Verlust jeglicher Zellverankerung kam es daher in den KEZ-Einzelzellen zur Induktion der Apoptose. Zu den angegebenen Zeiten wurde jeweils ein Zell-Aliquot abgenommen und analysiert. Im Folgenden werden die in Suspension inkubierten Zellen als S-KEZ bezeichnet.

3.2.1.3 Modulation von Anoikis durch lösliches E-Cadherin

Frisch isolierte KEZ-Krypten wurden als Suspensionskultur in Gegenwart eines funktionellen E-Cadherin-Liganden, inkubiert (E-Cadherin-Fc; 10 µg/ml; R&D Systems, Minneapolis, USA). Hierbei handelt es sich um ein dimeres E-Cadherin-Chimärprotein, dessen extrazelluläre Domäne an den Fc-Teil des humanen IgG1 fusioniert wurde. KEZ wurden für 15 min bei 4°C mit E-Cadherin-Fc vorinkubiert; anschließend wurde ein Fc-spezifischer anti-human-IgG-Antikörper zugegeben (6 µg/ml; Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, Großbritannien), um ein Clustern der E-Cadherin-Fc-Moleküle an der Zellmembran zu induzieren. Die Zellen wurden dann unter leichtem Schütteln eine Stunde bei 37°C inkubiert, anschließend geerntet und untersucht.

3.2.1.4 Blockierung der E-Cadherin-Bindung

Um die homophile Bindung zwischen E-Cadherin-Molekülen benachbarter Zellen zu blockieren, wurden frisch isolierte KEZ-Krypten zunächst durch 10–20-faches Aufziehen in einer Kanüle vereinzelt, um die vorhandenen E-Cadherin-Bindungen zu unterbrechen. Die Zellsuspension wurde dann für 15 min bei 4°C mit einem E-Cadherin-blockierenden Antikörper (200 µg/ml; anti-human E-Cadherin, Chemicon International, Temecula, USA) inkubiert und anschließend zu Zellpellets zentrifugiert. Die aggregierten Zellen wurden im Anschluss zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

3.2.1.5 Erhalt von Zell-Zell-Kontakten: Pellet-Modell

Um die Bedeutung von Zell-Zell-Kontakten für das Überleben von KEZ zu untersuchen, wurden KEZ-Krypten direkt nach der Isolation vorsichtig bei 100 g und 4°C für 5 min zu einem Zellaggregat/Pellet zentrifugiert, um die bestehenden Zell-Zell-Kontakte innerhalb der Krypten zu erhalten und eine Auflösung der

Kryptenstruktur zu verhindern. Die KEZ-Pellets wurden anschließend bei 37°C inkubiert, nach der jeweils angegebenen Zeit geerntet und analysiert. Im Folgenden werden diese Zellen als P-KEZ bezeichnet.

3.2.1.6 Inhibition von Signalwegen

Zur Blockierung relevanter Signalpfade in P-KEZ wurden die frisch isolierten Krypten mit spezifischen Inhibitoren für 10-15 min bei RT vorinkubiert, anschließend bei 100 g und 4°C für 5 min zu Pellets zentrifugiert und zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

Es wurden die folgenden Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt:

Blockierung von	Inhibitor	Hersteller	eingesetzte Konzentrationen
PI3-K	LY294002	Cell Signaling Technology, Beverly, USA	15-60 µM
EGFR	Tyrphostin 1478	Calbiochem, Darmstadt	10-50 µM
MEK	U0126	Cell Signaling Technology, Beverly, USA	10-50 µM
Src	PP1	Biomol, Hamburg	10-50 µM

3.2.1.7 Gewinnung von Zellüberständen

Für die Gewinnung von Zellüberständen wurden aus S-KEZ-Kulturen Aliquots entnommen und bei 100 g zentrifugiert. Die Überstände wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 10.000 g erneut zentrifugiert. Die so erhaltenen Überstände wurden aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.2 Arbeiten mit DNA

3.2.2.1 DNA-Isolation

Die Isolation von DNA aus KEZ erfolgte mit dem QIAamp® DNA Mini Kit nach den Angaben des Herstellers.

3.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Moleküle verschiedener Länge können aufgrund ihrer unterschiedlichen Mobilität in Agarosegelen getrennt werden. Man macht sich dabei die negative Gesamtladung der DNA-Doppelhelix zunutze, welche durch die unter physiologischen Bedingungen deprotonierten Phosphatgruppen des Rückgrats entsteht. DNA-Fragmente wandern daher im elektrischen Feld, wobei die elektrophoretische Mobilität indirekt proportional zum Logarithmus der Anzahl ihrer Basen ist.

Zur Auftrennung der DNA wurden 1,5%ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in TAE-Puffer (1x) aufgekocht und nach dem Abkühlen auf etwa 50°C wurde Ethidiumbromid zugegeben (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer im Verhältnis 4:1 gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Als Größenstandard wurde eine Probe bekannter Länge und Konzentration mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 Volt für 2 Stunden. Durch das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid fluoreszierten die Fragmente im UV-Licht und konnten fotografiert werden.

3.2.3 Färbemethoden

3.2.3.1 DNA-Färbung mit DAPI

Für den Nachweis der Chromatinkondensation wurden Zellkerne mit DAPI gefärbt. Durch die selektive Bindung des Farbstoffs DAPI an zelluläre DNA kommt es zur Ausbildung stark fluoreszierender Komplexe, wodurch fluoreszierende Zellkerne entstehen, während eine cytoplasmatische Fluoreszenz nicht nachweisbar ist.

KEZ wurden durch Cytospin-Zentrifugation auf Objektträger fixiert, mit DAPI-haltigem *Vectashield mounting medium* (Vector, Burlingame, USA) gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop analysiert.

3.2.3.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ermöglicht den Nachweis und die Lokalisation bestimmter intra- oder extrazellulärer Proteine in Geweben und Zellen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Allen immunhistochemischen Methoden liegt die Fähigkeit immunreaktiver Antikörper zugrunde, zugehörige Antigene zu erkennen und daran mit hoher Affinität zu binden. Die Antigen-Antikörper-Bindung kann dann durch verschiedene direkte oder indirekte Markierungsverfahren sichtbar gemacht werden. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden frisch isolierte KEZ sowie als Positivkontrolle ein etwa 1 cm² großes Stück intakte Mukosa über Nacht in Formalin fixiert, entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Es wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, auf unbeschichtete Objektträger überführt und für 60 min bei 60 °C getrocknet. Die Schnitte wurden dann für 10 min in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (99%, 95%, 70% Ethanol und PBS pH 7,4 für je 5 min). Zur Demaskierung wurden die Schnitte durch 20-minütige Inkubation in Zitronensäurepuffer (ChemMate™ Target Retrieval Solution, Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark) bei 95 °C vorbehandelt. Um die Aktivität endogener Peroxidasen der Zellen im Gewebeschnitt zu senken, wurden die Objektträger für 30 min in 0,3%iger Wasserstoffperoxidlösung inkubiert und anschließend 3 x 5 min in PBS gewaschen. Die Färbung erfolgte maschinell (Ventana Medical Systems, Illkirch, Frankreich) mit einem anti-Fibronektin-Antikörper (Progen, Heidelberg; Verdünnung 1:5).

3.2.4 Western Blot

Mit Hilfe des so genannten Western Blotting ist es möglich, Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen und anschließend zu identifizieren. Ein Proteingemisch wird mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend des Molekulargewichts seiner Komponenten aufgetrennt. Durch die Anwesenheit von

SDS erhalten die Proteine eine negative Ladung. Der Zusatz von β -Mercaptoethanol bewirkt eine Spaltung intramolekularer Disulfidbrücken (Reduktion). Die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine hängt dann nur noch von der Molekülgröße sowie der Porengröße des dreidimensionalen Gel-Netzwerks ab. Nach der elektrophoretischen Auftrennung werden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert („geblottet“) und können mit spezifischen Antikörpern markiert und mittels einer Chemolumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht werden.

3.2.4.1 Gewinnung von Zellextrakten (Cytosolpräparation)

Die Zellen wurden für 5 min bei 200 g zentrifugiert und das Pellet in CHAPS-Lysepuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend mehrmals mit 3-sekündigen Ultraschall-Pulsen behandelt um eine vollständige Lyse zu gewährleisten und eventuelle DNA-Protein-Wechselwirkungen zu beseitigen. Das erhaltene gesamtcytosolische Lysat wurde 10 min bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert und der die cytosolischen Proteine enthaltende klare Überstand in ein neues vorgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

3.2.4.2 Herstellung cytosolischer und mitochondrialer Fraktionen

Die Herstellung cytosolischer und mitochondrialer Fraktionen erfolgte durch subzelluläre Fraktionierung mittels Digitonin. Dazu wurden Zellaliquots in Cytosol-Extraktionspuffer für etwa 1 min auf Eis inkubiert. Die dabei stattfindende Permeabilisierung der Plasmamembran wurde mittels Trypanblaufärbung kontrolliert. Nachdem etwa 80% der Zellen permeabilisiert waren, wurden die Zellen bei 1000 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen cytosolischen Fraktionen wurden abgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Pellets wurden im gleichen Volumen Mitochondrien-Lysepuffer resuspendiert und anschließend für 10 min bei 10.000g und 4°C zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand enthielt die mitochondrialen Fraktionen und wurde ebenfalls in ein neues Gefäß überführt.

3.2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der isolierten Proteine wurde photometrisch mit Hilfe des BIO-RAD Protein Assays bestimmt. Der Test beruht auf der Methode von Bradford, bei der die Bindung von *Coomassie brilliant blue G250* an Proteine das Absorptionsmaximum von 465 nm (ohne Protein) zu 595 nm (mit Protein) verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Probenlösung. Absolute Werte für den Proteingehalt wurden durch die Messung einer Verdünnungsreihe einer BSA-Standardlösung bekannter Konzentration ermittelt. Durch Auftragung der Absorption bei 595 nm gegen den Proteingehalt der Verdünnungsreihe erhielt man eine Eichgerade, mit deren Hilfe der Gesamtproteingehalt der Probe ermittelt werden konnte. Die Probenlösungen wurden hierfür im Verhältnis 1:1000 verdünnt eingesetzt, mit 200 µl BIO-RAD-Farbstoff versetzt und der 1,0 ml-Ansatz für 20 min bei RT inkubiert. Die Absorption der gebildeten Komplexe konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden. Anschließend wurden anhand der Standardkurve die Proteinkonzentrationen der Probenlösung berechnet.

3.2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung der denaturierten Proteine mittels SDS-PAGE wurde das X-Cell II™ Mini-Cell Modul (Novex-Kammer) der Firma Invitrogen BV/Novex verwendet. Hierfür wurden Einmal-Gelkassetten benutzt, in denen ein für den Auftrennungsbereich geeignetes SDS-Polyacrylamidgel (6–15%; pH 8,8) gegossen wurde. Das Trenngel wurde mit einem 5%igen Sammelgel (pH 6,8) überschichtet und der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach ca. 30 min Polymerisation wurde der Probenkamm vorsichtig entfernt und die Kammern mit Aqua bidest. gespült. Die fertigen Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Novex-Kammer mit Laufpuffer befüllt.

Zur Vorbereitung der Proben wurden 10-50 µg isoliertes Gesamtprotein mit Aqua bidest. auf ein Volumen von maximal 20 µl eingestellt und mit dem gleichen Volumen 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt. Die äquivalenten Proteinmengen wurden anschließend bei 95°C für 5 min denaturiert und nach kurzer Zentrifugation in die Taschen des Polyacrylamidgels einpipettiert. Auf jedes Gel wurde außerdem ein Proteinstandard als Größenmarker für die zu detektierenden Proteine aufgetragen.

Nachdem die in die Geltaschen gefüllten Proteinproben bei 50-70 V (12,5 mA pro Gel) in das Sammelgel eingewandert waren und das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 120 V (18 mA pro Gel) erhöht. Die Laufzeit, bis die Laufmittelfront das untere Ende des Gels erreicht hatte, betrug ca. 1,5 h.

3.2.4.5 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (Blotten)

Proteine können durch einen Transfer aus SDS-Polyacrylamidgelen auf geeignete Membranen übertragen werden. Der Proteintransfer erfolgte mit dem X-Cell II™ Mini-Cell Blot-Modul mittels Tank-Blot-Technik. Hierfür wurde eine Sandwich-Anordnung aus Schwämmen, Whatman-Filterpapieren, dem Polyacrylamidgel und der Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm) hergestellt. Auf die Kathodenseite des Blot-Moduls wurden zwei mit Transferpuffer getränkte Schwämme gelegt; darauf folgte eine Anordnung aus je einer Lage Whatman-Filterpapier, Polyacrylamidgel, Nitrozellulosemembran, Whatman-Filterpapier und zwei weiteren getränkten Schwämmen. Beim Aufbau wurde darauf geachtet, dass sich zwischen den einzelnen Schichten keine Luftblasen befanden, da sonst nur ein unvollständiger Transfer stattgefunden hätte. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 0,8 mA/cm² Gelfläche für die Dauer von einer Stunde.

3.2.4.6 Färbung der Membran mit Ponceau S

Um den vollständigen Transfer der Proteine vom Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran zu überprüfen, wurde diese mit Ponceau S angefärbt. Die Membran wurde für ca. 30 Sekunden in Ponceau S-Lösung geschwenkt und anschließend so lange in Aqua bidest. entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar wurden. Die Intensität der sichtbaren Banden konnte als Ladungskontrolle des Polyacrylamidgels verwendet werden. Im Anschluss wurde die Membran durch Schwenken in Waschpuffer restlos entfärbt.

3.2.4.7 Immundetektion der Proteine

Zur Immundetektion der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4°C bzw. für eine Stunde bei RT in Blockierlösung (5%ige Magermilchlösung oder

5%ige BSA-Lösung in Waschpuffer) inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen und so unspezifische Bindungsstellen auf ein Minimum zu reduzieren. Danach wurde die Membran kurz in Waschpuffer geschwenkt und anschließend für mindestens eine Stunde bei RT unter leichtem Schütteln mit dem in Blockierlösung verdünnten Primärantikörper inkubiert. Die Membran wurde dann für 6 x 10 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend für eine weitere Stunde mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper (HRP-gekoppelt; verdünnt in 5%iger Magermilchlösung in Waschpuffer) inkubiert. Die Membran wurde erneut für 6 x 10 min gewaschen und anschließend mit dem ECL-Plus™ Western Blotting Detection Kit entwickelt, in Folie verpackt und in eine Röntgenfilmkassette eingelegt. Es wurde ein Hyperfilm aufgelegt und nach geeigneter Expositionszeit entwickelt.

3.2.4.8 Strippen der Nitrozellulosemembran

Nach erfolgter Immundetektion des Zielproteins auf der Nitrozellulosemembran konnte diese für weitere Antikörperinkubationen verwendet werden. Hierfür wurden die gebundenen Antikörper durch eine 15-minütige Inkubation in einer Stripping-Lösung (Re-Blot-Solution) bei RT entfernt. Anschließend wurde die Membran 2 x 10 min gewaschen, neu blockiert und mit dem nächsten Primärantikörper inkubiert.

3.2.5 Kolorimetrische Messung der Caspase-3-Aktivität

Zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität in KEZ wurde ein kolorimetrischer Assay verwendet. Dieser basiert auf der Hydrolyse des synthetischen Caspase-3-Peptidsubstrats N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-para-nitroanilid (Ac-DEVD-pNA). Ein Produkt der Caspase-3-abhängigen Spaltung dieses Peptids ist para-Nitroanilid (pNA). Freies pNA absorbiert bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die Freisetzung von pNA aus dem Peptidsubstrat ist proportional zur Caspase-3-Aktivität und kann im Absorptionsspektrometer bestimmt werden (Abbildung 3.1).

In einem 100 µl-Ansatz wurden 30 µg Gesamtzelllysate mit CHAPS-Lysepuffer verdünnt und in Gegenwart von 200 µM Ac-DEVD-pNA für zwei Stunden bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Caspase-3-Aktivität in

den Proben anhand der Absorption bei 405 nm quantifiziert. Als Negativkontrolle diente BSA, als Positivkontrolle wurden Proteinextrakte von KEZ verwendet, die für zwei Stunden in Suspension inkubiert worden waren.

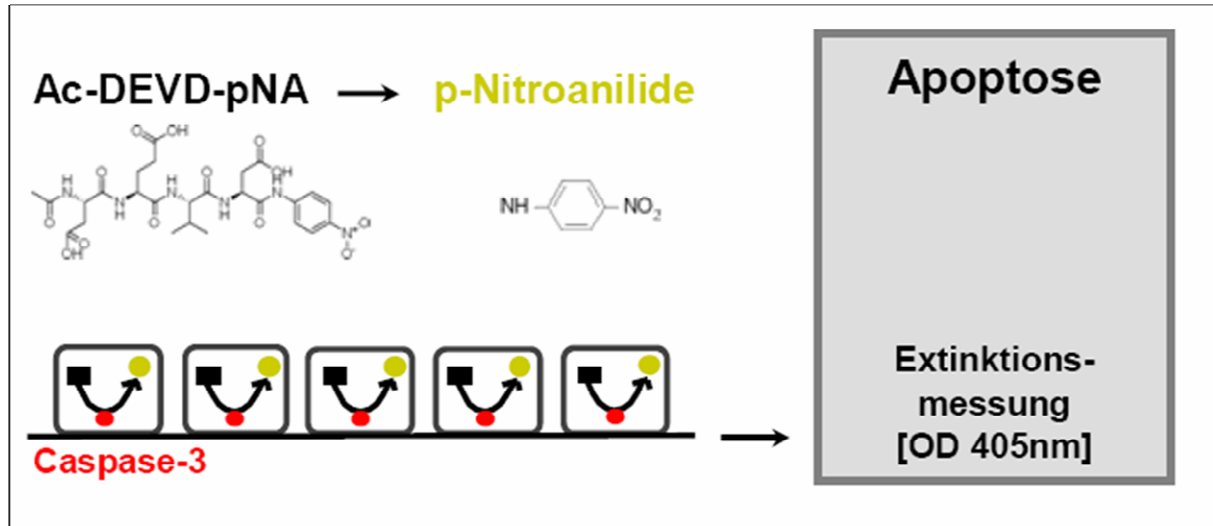


Abbildung 3.1: Prinzip des Caspase-3-Aktivitäts-Assays. Die Hydrolyse des farblosen Substrats Ac-DEVD-pNA durch aktive Caspase-3 führt zur Freisetzung von kolorimetrisch messbarem pNA.

3.2.6 Herstellung von Zellkernextrakten

Für die Bestimmung der NF- κ B-Aktivierung in KEZ wurden Zellkernextrakte hergestellt. Hierzu wurden die Zellen mit 2 ml eiskaltem PBS/PIB gewaschen, anschließend bei 100 g und 4°C für 5 min zentrifugiert und in 1 ml eiskaltem HB-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wurden 50 μ l Nonidet P-40 zugegeben und der Ansatz 1 min bei 1000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen; das Pellet wurde in 50 μ l *Complete Lysis Buffer* des NF- κ B-Aktivitätsassays resuspendiert und 30 min unter leichtem Schütteln auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 10.000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt den Zellkernextrakt und wurde bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.7 ELISA

Mittels ELISA wurden die Sekretion von EGF und TGF- α , sowie die Phosphorylierung von c-Jun und die Aktivierung von NF- κ B bestimmt. Die Durchführung dieser Assays erfolgte jeweils entsprechend der Protokolle der Hersteller.

3.2.8 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist eine gleichzeitige Analyse mehrerer Parameter einzelner Zellen möglich. Durch Detektion des Streulichtverhaltens und der Fluoreszenz von Einzelzellen, die über spezifische Rezeptoren, Proteine oder Marker (membranständig oder intrazellulär) fluoreszenzmarkiert wurden, können chemische und physikalische Eigenschaften der Zellen erfasst werden. Dabei kann eine sehr große Zellmenge innerhalb kürzester Zeit (bis zu 1.000 Zellen pro Sekunde) analysiert werden.

3.2.8.1 Optisches System und Lichtdetektion

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Durchflusszytometer, Coulter EPICS XL-MCL (Coulter Immunotech, Krefeld), werden die Zellen in einer Suspension vorgelegt, über eine Kapillare angesaugt und mit Probenflüssigkeit (isotonische Kochsalzlösung) verdünnt. Durch einen Geschwindigkeitsgradienten wird der Probenstrom zur Mitte der Düse hin stärker beschleunigt. Diese so genannte hydrodynamische Fokussierung bewirkt, dass eine Verwirbelung vermieden wird und die einzelnen Zellen in einem Flüssigkeitsstrom nacheinander eine Messküvette passieren, auf die ein Argonlaserstrahl mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm trifft. Gestreutes Licht und Fluoreszenz werden über ein System von dichroitischen Spiegeln, optischen Linsen und Filtern zu Photomultipliern weitergeleitet und detektiert. Abbildung 3.2 zeigt den schematischen Aufbau des optischen Systems des Durchflusszytometers EPICS XL-MCL.

Die Photodiode für das Vorwärtsstreulicht (FSC) detektiert das Licht, das in Strahlenrichtung von der Zelle gestreut wird. Die Intensität des Vorwärtsstreulichts

gibt Auskunft über die Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SSC) wird orthogonal zum Strahlengang detektiert. Das SSC-Signal ist abhängig von der inneren Struktur der Zelle und liefert ein Maß für die Granularität der Zelle. Die Fluoreszenzemission wird ebenfalls im 90°-Winkel zur Strahlenrichtung des Lasers gesammelt und nach Abtrennung mit Hilfe von dichroitischen Spiegeln und Interferenzfiltern in Spektralbereiche bestimmter Wellenlängen aufgetrennt:

Fluoreszenz 1 (FL1):	505-545 nm, mit 525nm Bandpassfilter
Fluoreszenz 2 (FL2):	555-600 nm, mit 575 nm Bandpassfilter
Fluoreszenz 3 (FL3):	605-645 nm, mit 620 nm Bandpassfilter
Fluoreszenz 4 (FL4):	650-725 nm, mit 675 nm Bandpassfilter

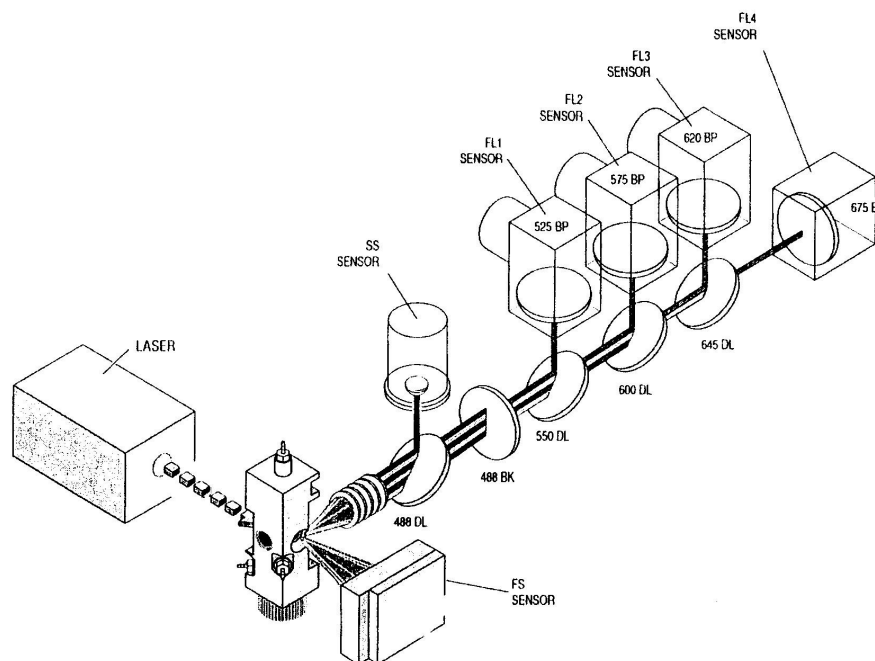


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des optischen Systems des Durchflusszytometers Coulter EPICS XL-MCL. (Nach dem „user manual“ der Firma Coulter Immunotech, Krefeld) Vorwärtsstreulicht (FS), Seitwärtsstreulicht (SS), dichroitischer Spiegel (DL), Filter (BK) und Bandpassfilter (BP) in nm.

Für jede vermessene Zelle wird eine Datenbank angelegt. Dadurch ist es möglich Zellsubpopulationen einer Messung unabhängig voneinander zu betrachten und zu analysieren. Zellpopulationen können im Histogramm oder, bei Auftragung zweier gemessener Parameter, als *Dot Plot* dargestellt werden. Die Messungen und Auswertungen der vorliegenden Arbeit wurden mit der Software *Expo32* durchgeführt.

3.2.8.2 DNA-Färbung mit Propidiumiodid

Zur Markierung der DNA wurde der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) verwendet. Das Absorptionsmaximum von PI liegt bei 536 nm, das Emissionsmaximum bei 617 nm. In dieser Arbeit wurde die PI-Fluoreszenz immer im FL3-Kanal detektiert. PI ist ein polares Fluorochrom (Abbildung 3.3), welches durch die vorher mit 70%igem Methanol permeabilisierte Membran in die Zelle eindringt und stöchiometrisch zwischen die Basen der doppelsträngigen Nukleinsäuren interkaliert. Die resultierende Fluoreszenz ist proportional zum Gehalt an DNA und kann so zur DNA-Quantifizierung und zur Zellzyklusanalyse verwendet werden.

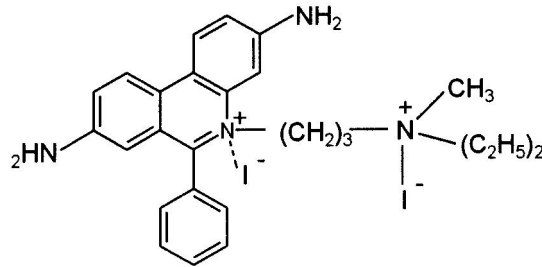


Abbildung 3.3: Chemische Struktur von Propidiumiodid.

Für die PI-Färbung wurden die Zellen zunächst mit kaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml eisgekühltem, 70%igem Methanol und leichtem Vortexen erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembran bei gleichzeitiger Fixierung der Zellen bei 4°C für 30 min bzw. bei -20°C über Nacht. Nach zwei Waschschritten mit kaltem PBS wurde das Zellpellet in 470 µl PBS resuspendiert, mit 5 µl RNaseA (1 mg/ml) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt zerstört doppelsträngige RNA, in die der DNA-Farbstoff sonst ebenfalls interkalieren würde. Im Anschluss wurden die Zellen mit 25 µl PI (1 mg/ml) unter Lichtausschluss für 5 min auf Eis inkubiert und direkt vor der Messung 10-20-mal durch eine Kanüle gezogen, um die Kryptenzellen zu vereinzeln. Für die Auswertung wurden in das erhaltene DNA-Histogramm stellvertretend für die G₁-, S- und G₂/M-Populationen drei Fit-Funktionen eingepasst. Die Fläche unter den Kurven wurde integriert und die prozentualen Anteile der Phasen des Zellzyklus berechnet.

3.2.8.3 Zell-Zyklus-Analyse und Apoptose-Nachweis

Proliferierende Zellen durchlaufen nacheinander folgende Stadien des Zellzyklus: G₁ (*gap1*, Ruhephase), S (*synthesis*, DNA-Synthese) und G₂/M (*gap2/mitosis*, Mitose), worauf wieder G₁ folgt. Wenn man Zellen über diesen Zyklus hinweg verfolgt, besitzen sie in G₁ den einfachen DNA-Gehalt, im Verlauf der S-Phase wird dieser verdoppelt, in G₂/M liegt der doppelte DNA-Gehalt vor und bei der anschließenden Zellteilung halbiert er sich wieder auf den einfachen Wert. Durch DNA-spezifische und DNA-stöchiometrische Fluoreszenzfarbstoffe lässt sich der DNA-Gehalt einer Zelle durchflusszytometrisch analysieren und sich somit ihre Position im Zellzyklus feststellen (Abbildung 3.4 A).

Die Analyse apoptotischer Zellen erfolgte am Durchflusszytometer durch Detektion fragmentierter genomischer DNA, die anhand des so genannten prä-G₁-Peaks zu erkennen ist. Abbildung 3.4 B verdeutlicht den Nachweis apoptotischer Zellen durch Quantifizierung des prozentualen Anteils der Zellen innerhalb des prä-G₁-Peaks, der in diesem Beispiel bei 54% der Gesamtzellen liegt.

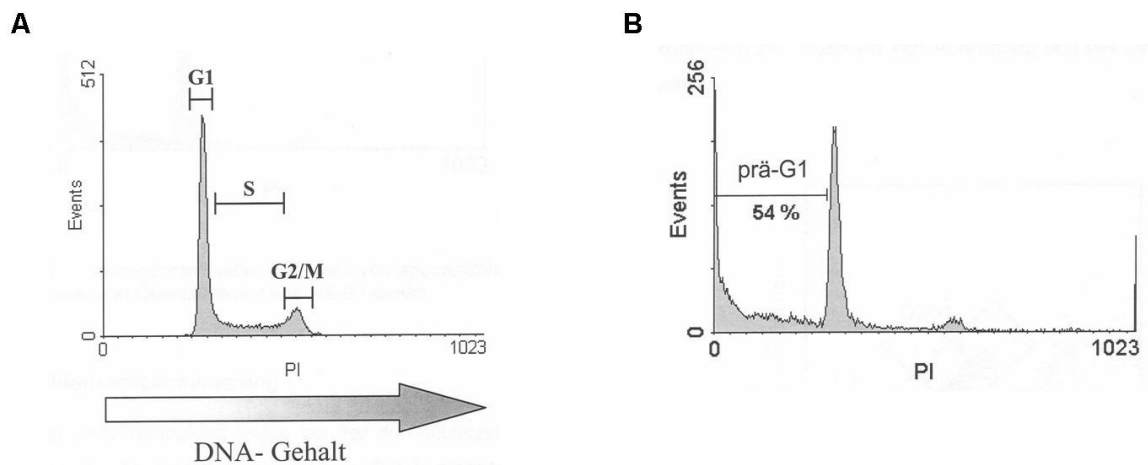


Abbildung 3.4: Zellzyklus-Analyse und Apoptose-Nachweis mittels Durchflusszytometrie. (A) Exemplarisches durchflusszytometrisch gemessenes DNA-Histogramm einer PI-Färbung. (B) Durchflusszytometrischer Nachweis von apoptotischen Zellen mittels PI-Färbung und Quantifizierung des prä-G₁-Peaks.

3.2.9 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Die Zellen wurden in 0,1 M Kakodylat-gepufferter Karnovsky-Lösung (2,5% Glutaraldehyd und 1% Paraformaldehyd) über Nacht bei RT fixiert und in einer 1%igen Osmiumtetroxidlösung bei pH 7,3 für zwei Stunden nachfixiert.

Vor der Einbettung in wasserunlösliches Epoxidharz (EmBed-812, Science Services, München) mussten die Proben mit Ethanol in steigender Konzentration entwässert werden (jeweils 10 min EtOH 50%, 70%, 90% und 95%, danach 3 x 15 min EtOH 100%). Anschließend wurden die Proben 2 x 30 min in 100% Propylenoxid, drei Stunden in ein 1:1-Gemisch aus Propylenoxid und Epon und darauf über Nacht mit Agitation in Epon gelegt. Nach der manuellen Einbettung erfolgte die Polymerisation für 48 h bei 60°C. Anschließend wurden Semidünnschnitte (0,8 µm) für lichtmikroskopische Voruntersuchungen angefertigt, mit Toluidinblau gefärbt und nach Auswahl geeigneter Areale wurde der Epon-Block für die ultradünnen Schnitte vorbereitet.

Die ultradünnen Schnitte (80 nm) wurden mit Hilfe eines Diamantmessers an einem Reichert Ultracut-S Ultramicrotom angefertigt. Die Doppelkontrastierung der Schnitte erfolgte durch aufeinander folgende 10-min-Inkubationen in wässrigen 2%igen Uranylacetat- und Bleicitrat-Lösungen. Die Präparate wurden an einem Transmissions-Elektronenmikroskop LEO912AB der Firma LEO/ZEISS bei einer Beschleunigung von 80 kV untersucht.

3.2.10 Statistik

Messwerte wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistischen Auswertungen wurden mit dem *Students T-Test* durchgeführt. Bei einem p-Wert von $< 0,05$ wurden die Unterschiede als statistisch signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Zell-Zell-Kontakte als Überlebensfaktor für primäre humane Kolonepithelzellen

4.1.1 Fehlende Matrix-Verankerung in isolierten Kolonepithelzellkrypten

Primäre humane Kolonepithelzellen (KEZ) wurden in Form intakter Krypten isoliert. Während der Isolation wurde die Epithelzellschicht von der Basallamina abgetrennt, so dass die gewonnenen Krypten keine Matrixbestandteile mehr enthielten, an welche die KEZ über Integrine hätten binden können. Dies wurde immunhistochemisch am Beispiel von Fibronektin nachgewiesen (Abbildung 4.1). Innerhalb der Kolonmukosa waren die Epithelzell-Krypten in ein dichtes Netzwerk aus Fibronektinfasern eingebettet. Nach der Isolation waren an den Krypten dagegen keine Rückstände von Fibronektin mehr nachweisbar. Die Zell-Zell-Kontakte zwischen den einzelnen Epithelzellen innerhalb der Krypte wurden durch den Isolationsprozess dagegen nicht beeinträchtigt. Die immunhistochemischen Färbungen bestätigen somit, dass während der Isolation primärer humaner KEZ der Zell-Matrix-Kontakt verloren geht, während die Zell-Zell-Kontakte innerhalb der Krypten erhalten bleiben.

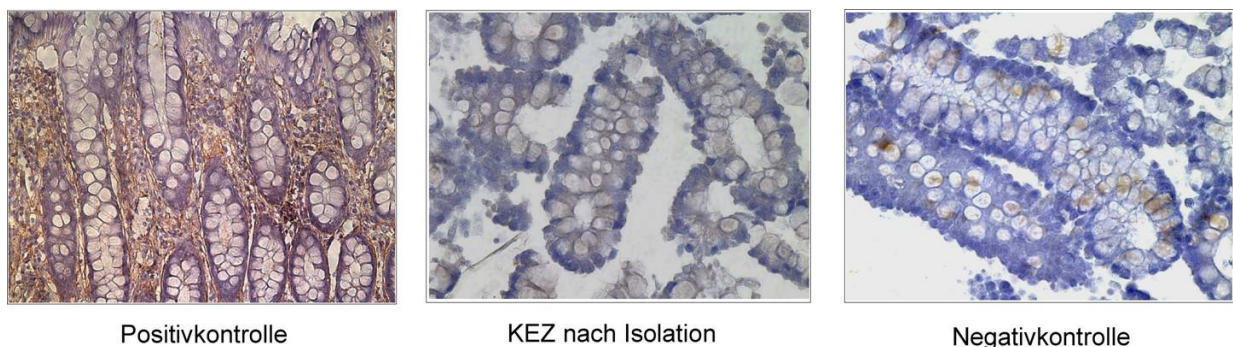


Abbildung 4.1: Nachweis des Verlustes der extrazellulären Matrix in isolierten KEZ-Krypten. KEZ-Krypten wurden direkt nach der Isolation fixiert und immunhistochemisch auf das Vorhandensein von Fibronektin untersucht. Als Positivkontrolle wurden Paraffinschnitte der gesamten Kolonmukosa verwendet. Während des Isolationsprozesses wurden die Krypten vollständig von der darunter liegenden Fibronektinschicht abgetrennt.

4.1.2 Blockierung von Anoikis durch Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten

Während des Isolationsprozesses bleiben die KEZ-Zell-Zell-Kontakte innerhalb der Krypten erhalten (Abbildung 4.1). Inkubiert man die frisch isolierten KEZ-Krypten anschließend in Suspension, führt dies jedoch zu einer raschen Auflösung der Kryptenstruktur in Einzelzellen, so dass nach und nach auch der Zell-Zell-Kontakt zwischen den KEZ verloren geht und infolgedessen Anoikis induziert wird.

Zur Untersuchung der Bedeutung der Zell-Zell-Kontakte für das Überleben von KEZ war es daher notwendig, ein Modell zu entwickeln, welches die Aufrechterhaltung der bestehenden Zell-Zell-Kontakte innerhalb einer Epithelzellkrypte *ex vivo* ermöglicht. Um den Erhalt der Zell-Zell-Verankerung zu gewährleisten, wurden deshalb frisch isolierte Krypten vorsichtig zu einem Zellaggregat (Pellet; P-KEZ) zentrifugiert, bevor die Auflösung der Kryptenstruktur in Einzelzellen einsetzen konnte. Die Zellpellets wurden anschließend bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden parallel KEZ in Suspension inkubiert (S-KEZ), um den Verlust der Zell-Zell-Kontakte und damit Anoikis zu induzieren (Abbildung 4.2).

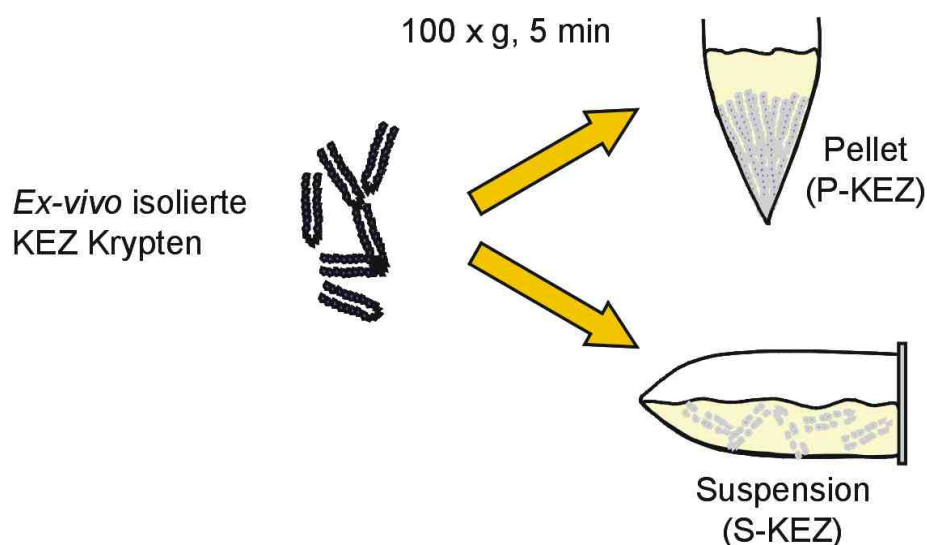


Abbildung 4.2: Experimenteller Ansatz zur Untersuchung der Rolle von Zell-Zell-Kontakten für das Überleben von KEZ. Ex vivo isolierte intakte KEZ-Krypten wurden vorsichtig zu einem Zellaggregat (Pellet) zentrifugiert, um bestehende Zell-Zell-Kontakte innerhalb der Krypten aufrecht zu erhalten. Parallel wurden KEZ in Suspension unter Schütteln inkubiert, um den Verlust von Zell-Zell-Kontakten und damit Anoikis zu induzieren.

4.1.2.1 Zell-Morphologie und interzelluläre Kontakte im P-KEZ-Modell

Zunächst musste nun nachgewiesen werden, dass die KEZ-Zell-Zell-Kontakte tatsächlich durch die Aggregation aufrecht erhalten werden können. Außerdem war es wichtig festzustellen, wie stark der Prozess der Zentrifugation die Morphologie der Zellen beeinflusst. Frisch isolierte KEZ sowie KEZ, die zwei Stunden im Pellet oder in Suspension inkubiert worden waren, wurden hierzu elektronenmikroskopisch untersucht (Abbildung 4.3). Unmittelbar nach der Isolation waren die Zellen in einer typischen Kryptenstruktur angeordnet und wiesen stabile apikale Zell-Zell-Kontakte sowie zahlreiche Mikrovilli an der apikalen Oberfläche auf (Abbildung 4.3 A). Aufgrund der physikalischen Beanspruchung während des Zentrifugationsvorgangs war in P-KEZ die apikale Oberfläche im Vergleich zu den frisch isolierten Zellen zwar leicht deformiert, dennoch blieben die Zell-Zell-Kontakt-vermittelnden Strukturen intakt (Abbildung 4.3 B). Darüber hinaus konnten in P-KEZ keinerlei Anzeichen von Apoptose oder Nekrose beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wiesen S-KEZ mit starker Chromatinkondensation und der Ausbildung von *apoptotic bodies* einen stark apoptotischen Phänotyp auf. Die Struktur der Krypten war komplett aufgelöst und die S-KEZ waren deutlich geschrumpft (Abbildung 4.3 C). Anhand der elektronenmikroskopischen Daten konnte somit nachgewiesen werden, dass durch Aggregation der KEZ-Krypten Zell-Zell-Kontakte, Zell-Lebensfähigkeit und Zell-Morphologie erhalten werden können.

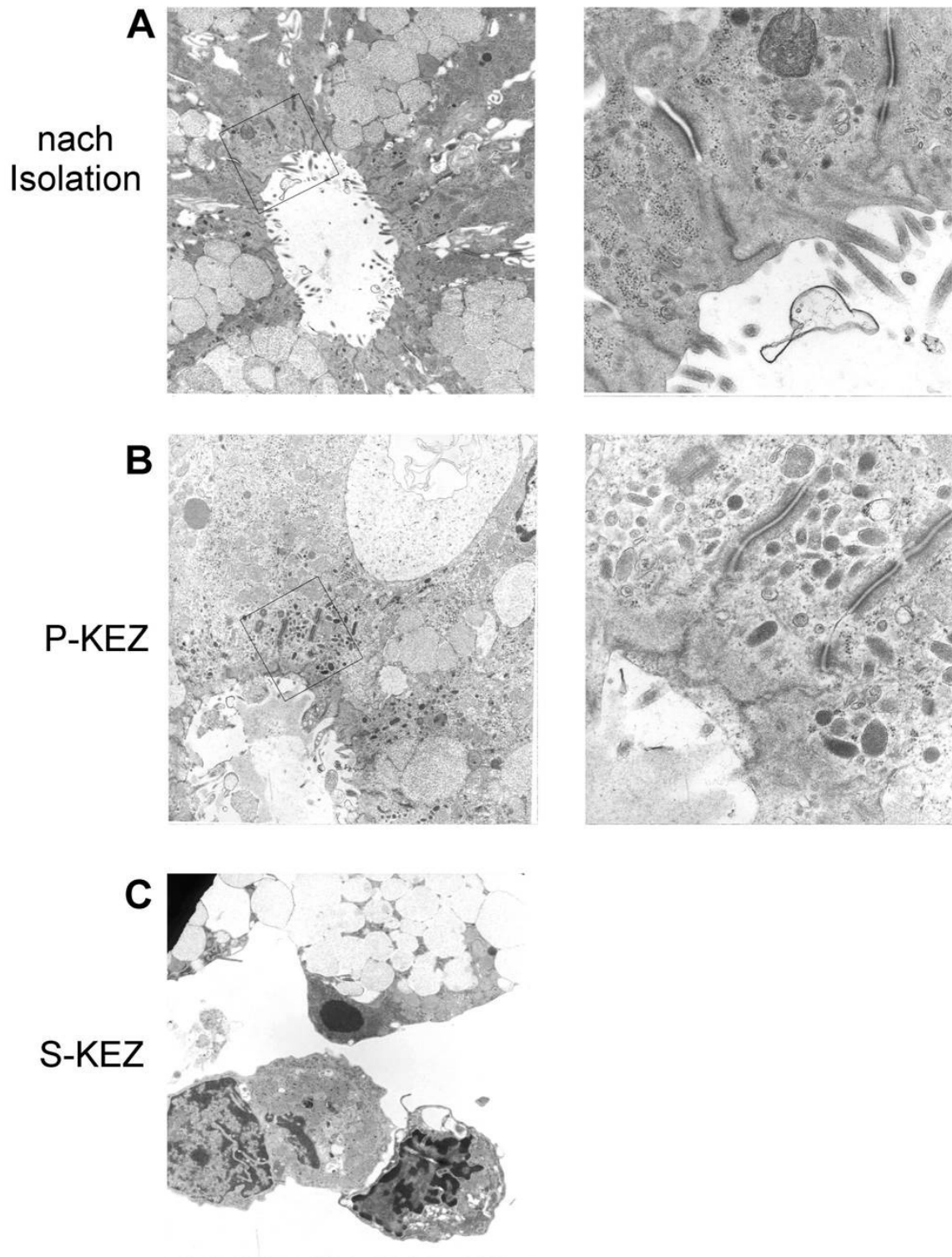


Abbildung 4.3: Erhaltung der Zellmorphologie in P-KEZ. KEZ wurden nach der Isolation entweder direkt fixiert (A) oder zunächst zwei Stunden als Pellet (B) bzw. in Suspension (C) inkubiert. Die fixierten Präparate wurden mittels TEM auf die Erhaltung von Zell-Zell-Kontakten untersucht (linke Felder: 5.000-fache Vergrößerung; rechte Felder 20.000-fache Vergrößerung). Die eingezeichneten Quadrate kennzeichnen die stärker vergrößerten Ausschnitte (rechte Felder). Nach zwei Stunden Inkubation wiesen P-KEZ intakte Zell-Zell-Kontakte sowie keinerlei Anzeichen von Apoptose auf. Dagegen war die Kryptenstruktur in S-KEZ nach gleicher Inkubationszeit vollständig aufgelöst und die Zellen waren stark apoptotisch.

4.1.2.2 Die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten verhindert die Aktivierung von Caspasen in KEZ

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen deuteten darauf hin, dass durch die alleinige Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten zwischen KEZ Apoptose gehemmt wurde. Dieser Effekt sollte nun im Folgenden auf molekularer Ebene genauer charakterisiert werden. Hierzu wurde zunächst die Aktivierung derjenigen Caspasen, die bei KEZ-Anoikis von Bedeutung sind, mittels Western Blot analysiert (Abbildung 4.4, Abbildung 4.5).

Als erstes wurde die Prozessierung der Initiatorcaspasen -2 und -9 untersucht. In S-KEZ wurde bereits nach 30 min eine Spaltung von Pro-Caspase-2 (p48) zu einem p33-Fragment detektiert. Die Menge an aktivierter Caspase-2 stieg während der weiteren Inkubation der S-KEZ stark an bis schließlich nach 120 min ausschließlich das p33-Fragment nachweisbar war (Abbildung 4.4 A). Ein ähnliches Aktivierungsmuster konnte im Western Blot gegen Caspase-9 beobachtet werden (Abbildung 4.4 B): Nach 30 min war in S-KEZ die aktive Caspase-9-Form (p34) nachweisbar, deren Menge zu den späteren Zeitpunkten noch weiter anstieg. Im Gegensatz dazu wiesen P-KEZ eine deutlich verminderte Aktivierung dieser beiden Initiatorcaspasen auf. Die prozessierte Form von Caspase-2 war in geringen Mengen erst nach 90 min nachweisbar, während die Menge an prozessierter Caspase-9 während der gesamten Inkubationsdauer auf dem Anfangsniveau blieb.

Zudem wurde die Prozessierung einer weiteren Initiatorcaspase, Caspase-8, untersucht. Diese blieb nach Induktion von Anoikis zunächst unprozessiert (p48- und p45-Isoformen). Erst 30 bis 60 min nach Verlust der Zell-Kontakte wurde in S-KEZ die erste Prozessierung der Pro-Domäne und die damit verbundene Entstehung der p43- und p41-Fragmente beobachtet. Die p18-Untereinheit der aktivierten Caspase-8 konnte nach 90 min detektiert werden (Abbildung 4.4 C). Dagegen wurde in P-KEZ während der gesamten Inkubationsdauer eine konstant hohe Menge an Pro-Caspase-8 nachgewiesen und lediglich eine geringe Prozessierung zu den p43- und p41-Fragmenten beobachtet. Im Gegensatz zu den S-KEZ konnte jedoch in P-KEZ zu keinem der untersuchten Zeitpunkte die vollständig prozessierte Form von Caspase-8 (p18) detektiert werden (Abbildung 4.4 C).

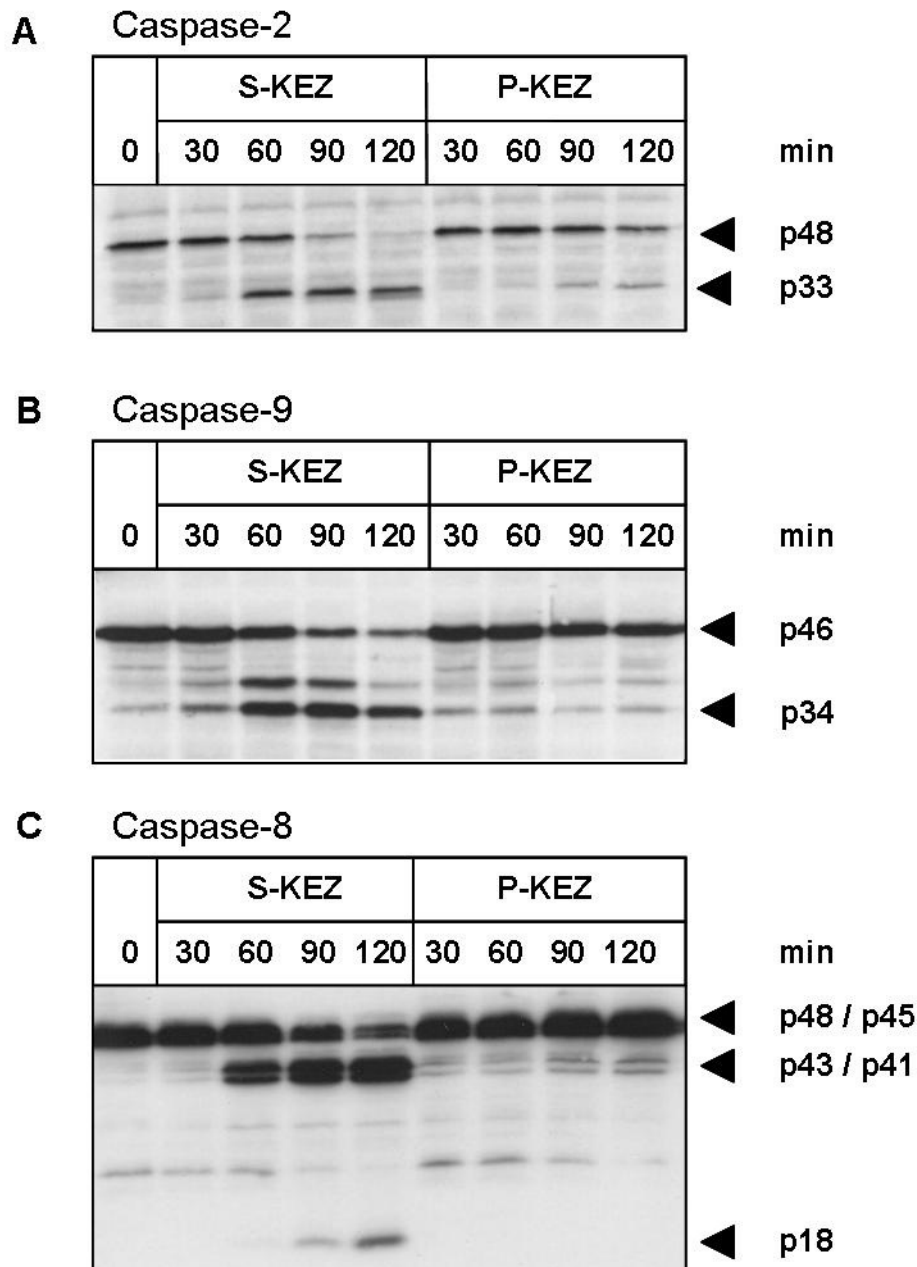


Abbildung 4.4: Hemmung der Aktivierung von Initiatorcaspasen durch die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten. Nach den genannten Inkubationszeiten wurden Zellextrakte aus S- und P-KEZ gewonnen und mittels Western Blot auf die Aktivierung von Caspase-2 (A), Caspase-9 (B) und Caspase-8 (C) untersucht. Eine Aktivierung der Caspasen-2 und -9 erfolgte in S-KEZ nahezu unmittelbar nach der Isolation (Bildung der 33 kDa- bzw. 34 kDa-Fragmente). Die Prozessierung von Caspase-8 fand zeitlich verzögert statt; eine vollständige Aktivierung wurde in S-KEZ nach 120 min beobachtet. Durch die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten in P-KEZ wurde dagegen die Prozessierung von Caspase-2 stark und die Prozessierung von Caspase-9 und -8 vollständig blockiert.

Als nächstes wurde die Aktivierung der Effektorcaspasen-7 und -3 analysiert. Caspase-3 wurde in S-KEZ innerhalb der ersten 60 min nach Verlust der Zellverankerung aktiviert, was an der Prozessierung des p32-Pro-Enzyms zu einem Fragment von etwa 17 kDa zu erkennen war (Abbildung 4.5 B). Im Western Blot gegen Caspase-7 ergab sich in S-KEZ ein Caspase-3-ähnliches Spaltungsmuster: Die aktive p20-Untereinheit von Caspase-7 wurde nach 60 min beobachtet (Abbildung 4.5 A). In P-KEZ dagegen konnte weder eine Aktivierung von Caspase-7 noch von Caspase-3 festgestellt werden, da im Western Blot keine aktive p17-Untereinheit von Caspase-3 und nur geringfügige Mengen an aktiver Caspase-7 (p20) nachweisbar waren (Abbildung 4.5 A, B). Um die semi-quantitativen Ergebnisse der Western Blots funktionell zu bestätigen, wurde mit Hilfe des synthetischen Substrats Ac-DEVD-pNA die Caspase-3-Aktivität in den gewonnenen Zellextrakten quantifiziert (Abbildung 4.5 C). Bereits nach 30 min Inkubation war die Caspase-3-Aktivität in S-KEZ im Vergleich zu P-KEZ signifikant erhöht; nach 60 min war ein starker Anstieg der Enzymaktivität in S-KEZ zu beobachten, welche mit fortschreitender Inkubationszeit noch weiter zunahm. Im Gegensatz dazu wurde bei der Caspase-3-Aktivität in P-KEZ während der gesamten Inkubationsdauer nur ein sehr geringer Anstieg beobachtet; die in P-KEZ ermittelten Enzymaktivitäten blieben nahe am Ausgangsniveau und waren zu allen Zeitpunkten signifikant geringer als in S-KEZ.

Diese Ergebnisse zeigen, dass trotz Verlust der Zell-Matrix-Verankerung eine Aktivierung der Caspase-Kaskade in KEZ durch die alleinige Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte effektiv blockiert werden kann.

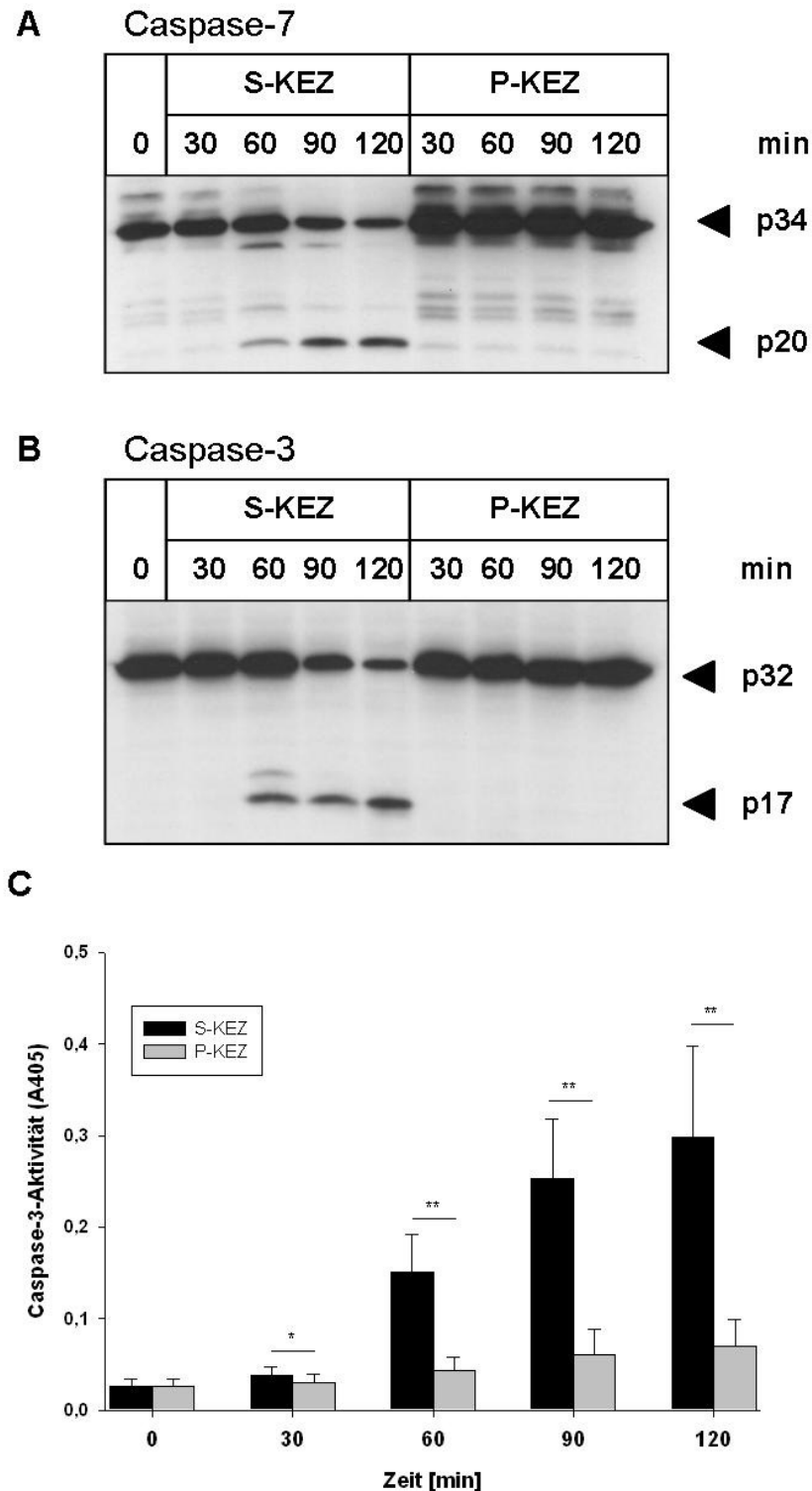


Abbildung 4.5: Hemmung der Aktivierung von Effektorcaspasen durch die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten. Cytosol aus S- und P-KEZ wurde auf die Aktivierung von Caspase-7 (A) und Caspase-3 (B) untersucht. Die aktiven Untereinheiten von Caspase-7 und -3 (p20 bzw. p17) wurden in S-KEZ 60 min nach Induktion von Anoikis detektiert. In P-KEZ war die Aktivierung dieser beiden Proteine hingegen deutlich reduziert. (C) Zu allen Zeitpunkten nach Induktion von Anoikis war die Caspase-3-Aktivität in P-KEZ signifikant geringer als in S-KEZ. $n=9$; $*p<0,05$; $**p<0,001$.

4.1.2.3 Die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten verhindert den Abbau der DNA in KEZ

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Erhaltung von Zell-Zell-Kontakten auf den Prozess der DNA-Fragmentierung untersucht. Da dieser ein späteres Ereignis innerhalb der apoptotischen Kaskade darstellt, wurde dafür DNA aus KEZ isoliert, die bis zu vier Stunden im Pellet bzw. in Suspension inkubiert worden waren. Die gewonnene DNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt und auf Fragmentierung untersucht (Abbildung 4.6 A). KEZ wiesen direkt nach der Isolation (0h) keine Anzeichen von DNA-Fragmentierung auf; nach zwei und vier Stunden war die DNA in S-KEZ jedoch sehr stark fragmentiert, was im Agarosegel anhand einer „DNA-Strickleiter“ zu erkennen war. Im Gegensatz dazu wies die DNA aus P-KEZ zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein Leitemuster auf und war auch nach vier Stunden Inkubation noch intakt.

Um diese Beobachtungen genauer zu quantifizieren, wurden fixierte S- und P-KEZ mit Propidiumiodid gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Sowohl nach zwei als auch nach vier Stunden war der Anteil apoptotischer Zellen (Prä-G₁-Peak) bei den P-KEZ signifikant geringer als bei den S-KEZ (Abbildung 4.6 B, C). Im Zeitraum zwischen zwei und vier Stunden stieg der mittlere Prä-G₁-Anteil der S-KEZ von 41,3% auf 56,9%, während der Maximalwert der P-KEZ nach vier Stunden Inkubation bei 24,6% lag.

Als Ergänzung zu den quantitativen Daten wurde die Chromatinkondensation, die ein charakteristisches morphologisches Kennzeichen apoptotischer Zellen darstellt, mittels DAPI-Kernfärbung sichtbar gemacht (Abbildung 4.6 D). In frisch isolierten Zellen wurden ausschließlich intakte Zellkerne ohne Anzeichen von Chromatinkondensation beobachtet. Nach zwei Stunden Inkubation waren in S-KEZ über 90% der Zellkerne fragmentiert, während etwa 95% der Zellkerne von P-KEZ intakt blieben und kondensiertes Chromatin hier nur in vereinzelten Zellen nachweisbar war.

Diese Ergebnisse zeigen auf DNA-Ebene, dass Anoikis in KEZ durch die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten effektiv inhibiert werden kann.

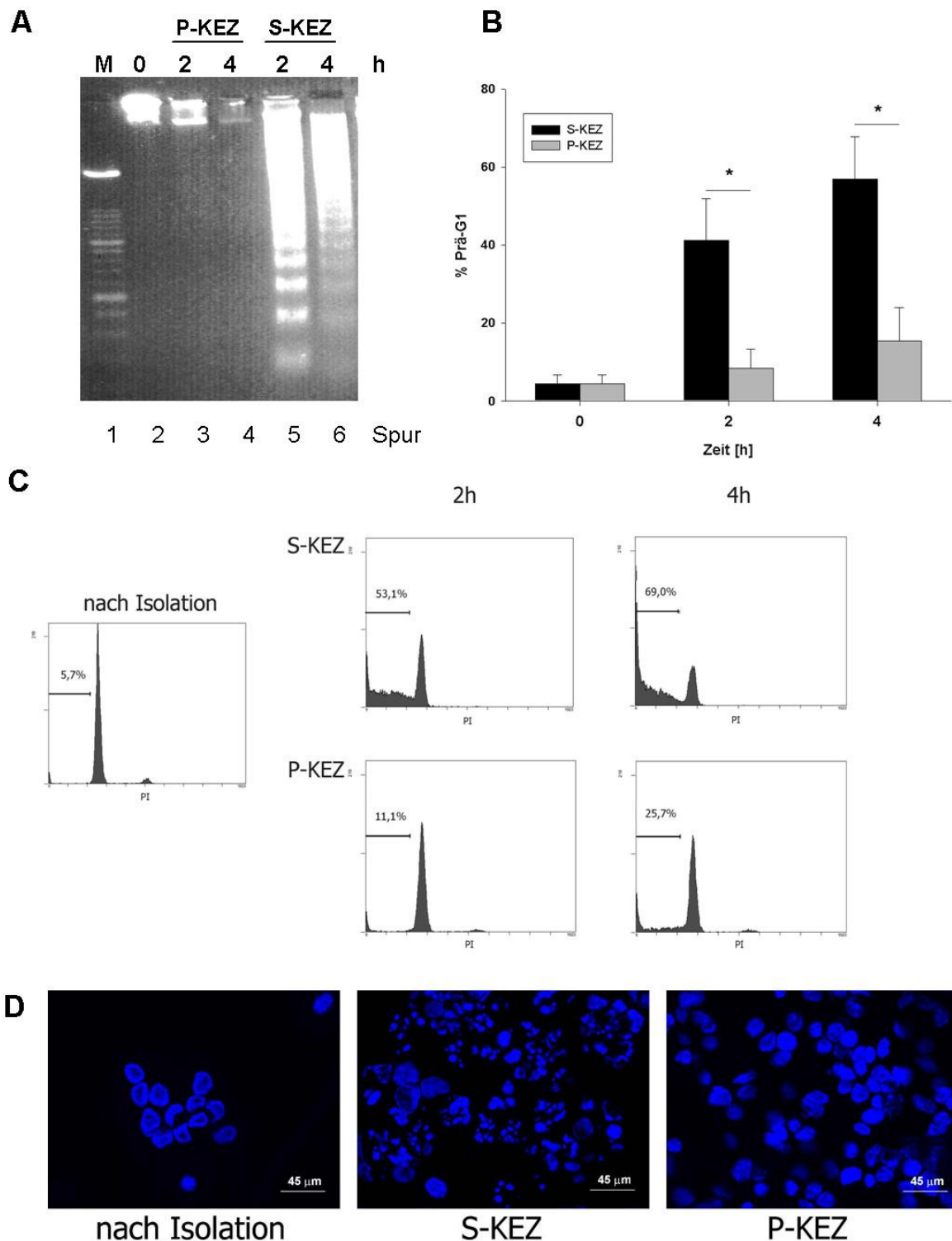


Abbildung 4.6: Durch den Erhalt von Zell-Zell-Kontakten wird der DNA-Abbau gehemmt. (A) DNA, die direkt nach der Isolation bzw. nach zwei und vier Stunden aus S-KEZ und P-KEZ isoliert wurde, wurde im Agarosegel aufgetrennt und auf DNA-Fragmentierung untersucht. S-KEZ zeigten eine starke DNA-Fragmentierung, während die DNA der P-KEZ intakt blieb. (B, C) S- und P-KEZ wurden nach zwei und vier Stunden Inkubation fixiert, mit Propidiumiodid gefärbt und im Durchflusszytometer untersucht. Die DNA in P-KEZ war signifikant schwächer fragmentiert als in S-KEZ. $n=5$; $*p<0,05$. Abgebildet sind repräsentative Histogramme eines von fünf unabhängigen Experimenten. (D) Frisch isolierte KEZ sowie S- und P-KEZ nach zwei Stunden Inkubation wurden fixiert und ihre Zellkerne mit DAPI gefärbt. Eine signifikant hohe Chromatinkondensation wurde ausschließlich in S-KEZ beobachtet.

4.1.2.4 Induktion von Anoikis ist auch nach Pelletinkubation möglich

Um auszuschließen, dass die Aggregation und Inkubation von P-KEZ zu einer anderen Form des Zelltods führt, wurden P-KEZ nach zweistündiger Pelletinkubation in Medium resuspendiert und für weitere zwei Stunden als Suspension inkubiert, um so den Verlust der bis dahin aufrecht erhaltenen Zell-Zell-Kontakte zu induzieren. Diese Zellen werden im Folgenden als PS-KEZ bezeichnet. In parallelen Ansätzen wurden zum Vergleich S- und P-KEZ jeweils über den gesamten Zeitraum von vier Stunden beobachtet. Hier zeigte sich, dass auch über eine Inkubationsdauer von vier Stunden die Caspase-3-Aktivität in S-KEZ signifikant höher war als in P-KEZ (Abbildung 4.7). Der Verlust des Zell-Zell-Kontakts, der in PS-KEZ durch die Inkubation in Suspension induziert wurde, verursachte eine starke Zunahme der Caspase-3-Aktivität, während die Inkubation von drei und vier Stunden in P-KEZ zu keiner signifikanten Veränderung der Enzymaktivität führte. Dabei war der Anstieg der Caspase-3-Aktivität in PS-KEZ nach drei und vier Stunden ähnlich hoch wie in S-KEZ nach einer und zwei Stunden (Abbildung 4.7).

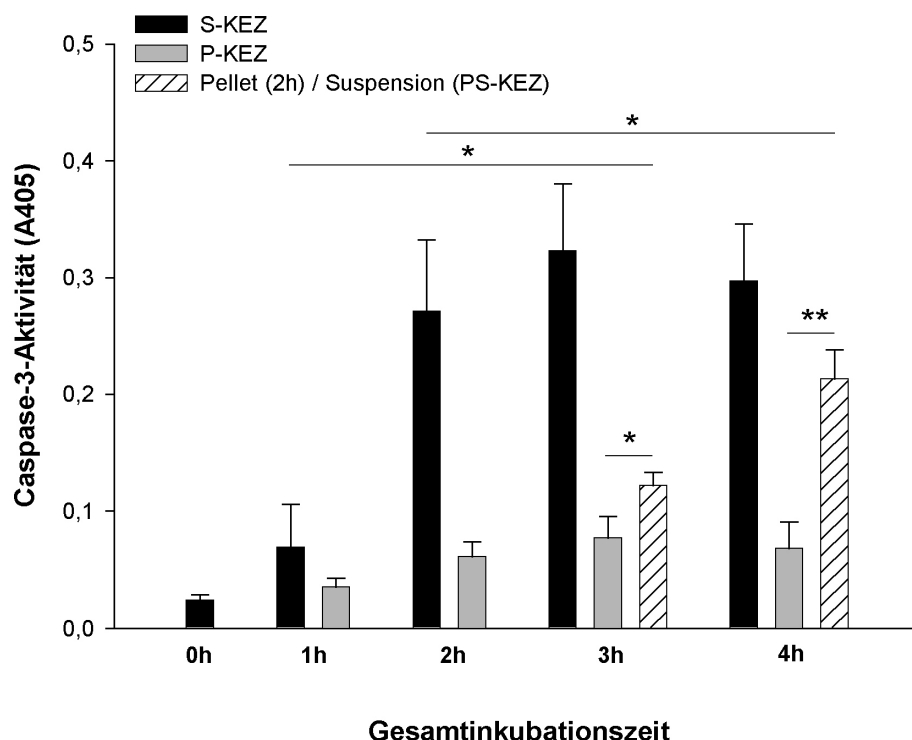


Abbildung 4.7: Induktion von Anoikis nach Pelletinkubation. P-KEZ wurden nach zwei Stunden Inkubation in Medium resuspendiert und für weitere zwei Stunden als Suspension inkubiert (PS-KEZ). Parallel wurden S- und P-KEZ über vier Stunden inkubiert. Bei allen Ansätzen wurde zu den genannten Zeitpunkten die Caspase-3-Aktivität in den Zellextrakten ermittelt. In PS-KEZ erfolgte nach Verlust der Zell-Zell-Kontakte eine ähnlich hohe Induktion der Caspase-3-Aktivität wie in den frisch isolierten KEZ. $n=6$; * $p<0,05$; ** $p<0,001$.

Da Anoikis also auch nach einigen Stunden Pelletinkubation noch induziert werden kann, zeigen diese Daten, dass die Zellaggregation im Pellet-Modell weder eine andere Form des Zelltods auslöst noch die Anoikis-ausführenden Mechanismen außer Kraft setzt.

4.2 Bedeutung von Adhäsionsproteinen für das Überleben von Kolonepithelzellen

Mit Hilfe des in Abschnitt 4.1 beschriebenen Pellet-Modells wurde durch die Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Verankerung Anoikis in KEZ inhibiert. Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass bestimmte Komponenten der Zell-Zell-Kontakt-vermittelnden Strukturen an der Übertragung anti-apoptotischer Signale beteiligt sein müssen. Um herauszufinden, welche Komponenten für den anti-apoptotischen Effekt des Pellet-Modells von Bedeutung sind, wurden die beiden *adherens junctions*-Proteine E-Cadherin und β -Catenin untersucht.

4.2.1 Modulation von Anoikis durch Simulation von Zell-Zell-Kontakten

Bei der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zwischen benachbarten Epithelzellen stellt die Aggregation von E-Cadherin-Molekülen an den *adherens junctions* das primäre Ereignis dar. Erst nach der Ausbildung der *adherens junctions* kommt es zur Formation sowie zur Stabilisierung anderer Zell-Zell-Kontakt-Strukturen (*tight junctions*, *gap junctions*, Desmosomen) (115-118). Zunächst wurde deshalb untersucht, ob die alleinige homophile Bindung von E-Cadherin für die Blockierung der apoptotischen Kaskade ausreichend ist. Hierzu wurden in einer KEZ-Suspensionskultur Zell-Zell-Kontakte mit Hilfe von löslichem E-Cadherin simuliert. Um eine E-Cadherin-Bindung und die Aktivierung entsprechender *downstream* gelegener intrazellulärer Signalwege zu erreichen, wurde eine Suspension aus frisch isolierten KEZ-Krypten in Gegenwart eines dimeren E-Cadherin-Chimärproteins inkubiert, in welchem die extrazelluläre E-Cadherin-Domäne an das Fc-Fragment des IgG-Moleküls fusioniert ist (E-Cadherin-Fc). Dieses Molekül wirkt als funktioneller Cadherin-Ligand und induziert die Rekrutierung von zelleigenem E-Cadherin in

funktionelle Komplexe an der Cytoplasmamembran. Nach einer Stunde Suspensionskultur in Gegenwart von E-Cadherin-Fc wurden die Caspase-3-Aktivitäten in den gewonnenen Zelllysaten ermittelt. Der fortschreitende Verlust des Zell-Zell-Kontakts führte in den unbehandelten Zellen innerhalb von 60 min zu einem deutlichen Anstieg der Caspase-3-Aktivität. Die Gegenwart von E-Cadherin-Fc bewirkte dagegen eine signifikante Blockierung der Caspase-3-Aktivität in S-KEZ (Abbildung 4.8). Allerdings wurde keine vollständige Hemmung der Apoptose erreicht, wie dies infolge der Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte in P-KEZ der Fall war. Dennoch zeigen diese Daten, dass durch einen funktionellen E-Cadherin-Liganden KEZ-Anoikis moduliert werden kann und das *adherens junction*-Protein E-Cadherin an der Kontrolle von Anoikis beteiligt ist.

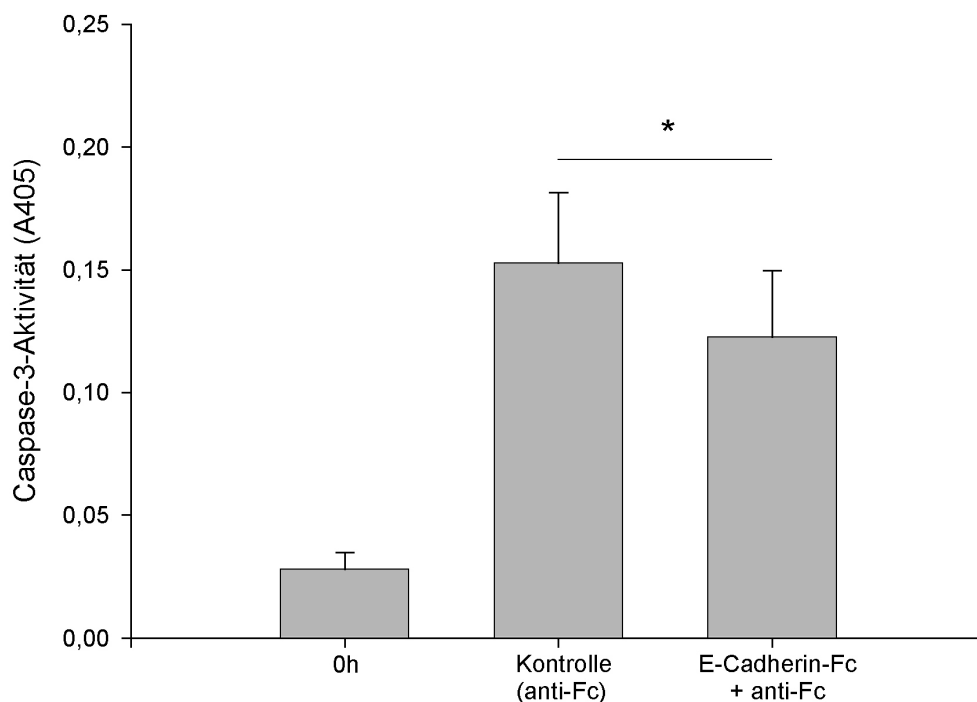


Abbildung 4.8: Modulation von Anoikis durch ein agonistisches E-Cadherin-Fc-Protein. Frisch isolierte KEZ wurden für eine Stunde in Suspension in Gegenwart eines E-Cadherin-Fc-Chimärproteins sowie einem anti-Fc IgG-Antikörper inkubiert. Die Anwesenheit von E-Cadherin-Fc bewirkte eine signifikante Reduktion der Caspase-3-Aktivität. $n=11$; $*p<0,02$.

4.2.2 Blockierung der E-Cadherin-Bindung

In Abschnitt 4.2.1 konnte nachgewiesen werden, dass funktionelle E-Cadherin-Bindungen apoptosehemmend wirken. In einem umgekehrten Ansatz sollte nun festgestellt werden, ob die Blockierung der E-Cadherin-Bindung zu erhöhten Apoptoseraten in P-KEZ führt. Hierzu wurden frisch isolierte KEZ-Krypten zunächst mit einer Kanüle vereinzelt, um die vorhandenen E-Cadherin-Bindungen zu unterbrechen, und anschließend 10 min mit einem E-Cadherin-blockierenden Antikörper inkubiert, bevor die Zellaggregation erfolgte. Im Anschluss wurden die Zellpellets zwei Stunden bei 37°C inkubiert und die Caspase-3-Aktivitäten in den Zelllysaten ermittelt. Zwischen den Enzymaktivitäten der anti-E-Cadherin-behandelten und -unbehandelten Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (Abbildung 4.9). Die Gegenwart des blockierenden anti-E-Cadherin-Antikörpers führte zu keiner Steigerung der Apoptose in P-KEZ. Die alleinige Hemmung der E-Cadherin-Bindung scheint daher für die Induktion von Anoikis in P-KEZ nicht ausreichend zu sein.

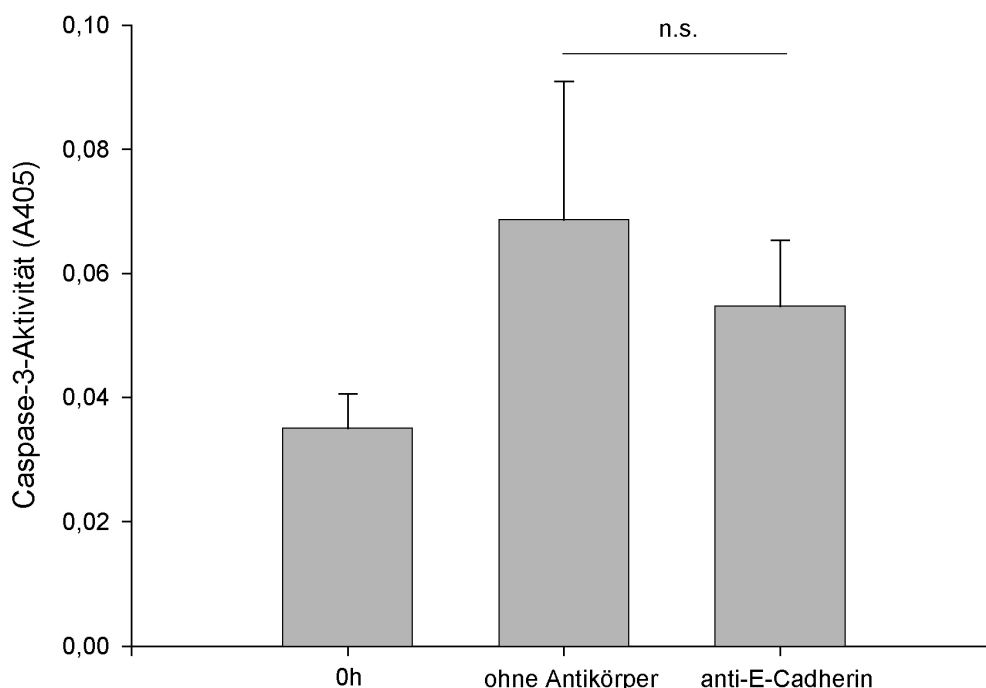


Abbildung 4.9: Blockierung der E-Cadherin-Bindung in P-KEZ. Isolierte KEZ wurden mit Hilfe einer Kanüle vereinzelt, mit einem blockierenden anti-E-Cadherin-Antikörper vorinkubiert, anschließend zu Pellets zentrifugiert und zwei Stunden inkubiert. Die Inkubation der Kontroll-P-KEZ erfolgte ohne den blockierenden Antikörper. Die Blockierung der E-Cadherin-Bindung in P-KEZ führte zu keiner Steigerung der Caspase-3-Aktivität. (n=3).

4.2.3 β -Catenin ist in P-KEZ vor einer Caspase-abhängigen Spaltung geschützt und bleibt aktiviert

Intrazellulär ist E-Cadherin unter anderem über das Linkerprotein β -Catenin mit dem Actin-Cytoskelett verbunden. β -Catenin besitzt daher eine strukturelle Funktion, spielt darüber hinaus jedoch auch eine wichtige Rolle bei intrazellulären Signaltransduktionsprozessen. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob die Aufrechterhaltung der KEZ-Zell-Zell-Kontakte die Regulation von β -Catenin beeinflusst. Wie in Abbildung 4.10 gezeigt, führte der Verlust des Zell-Zell-Kontakts in S-KEZ im Laufe von 120 min zu einer kontinuierlichen Abnahme der Gesamtmenge an β -Catenin (92 kDa), wobei nach 60 min zusätzliche Banden von etwa 70 kDa detektiert wurden. Diese entsprechen Spaltprodukten, die bei der Caspase-abhängigen Prozessierung von β -Catenin entstehen (119). Im Gegensatz dazu blieb die Menge an nativem β -Catenin in P-KEZ über 120 min konstant hoch und es konnten keine Spaltprodukte nachgewiesen werden.

β -Catenin liegt in aktivierter Form dephosphoryliert vor. Eine Untersuchung der Level an aktivem β -Catenin ergab, dass die Menge an aktivierter Form in S-KEZ bereits nach 60 min sehr stark reduziert war und im weiteren Verlauf der Inkubation noch weiter abnahm, so dass nach 120 min Suspensionskultur kein aktives β -Catenin mehr vorhanden war. Dagegen blieb der Aktivierungszustand von β -Catenin in P-KEZ während der gesamten Inkubation unverändert hoch (Abbildung 4.10).

Die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten verhindert folglich nicht nur den proteolytischen Abbau sondern darüber hinaus auch die Deaktivierung von β -Catenin in P-KEZ. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das *adherens junction*-Molekül β -Catenin an der Zell-Zell-Kontakt-vermittelnden Überlebenssignaltransduktion in KEZ beteiligt ist.

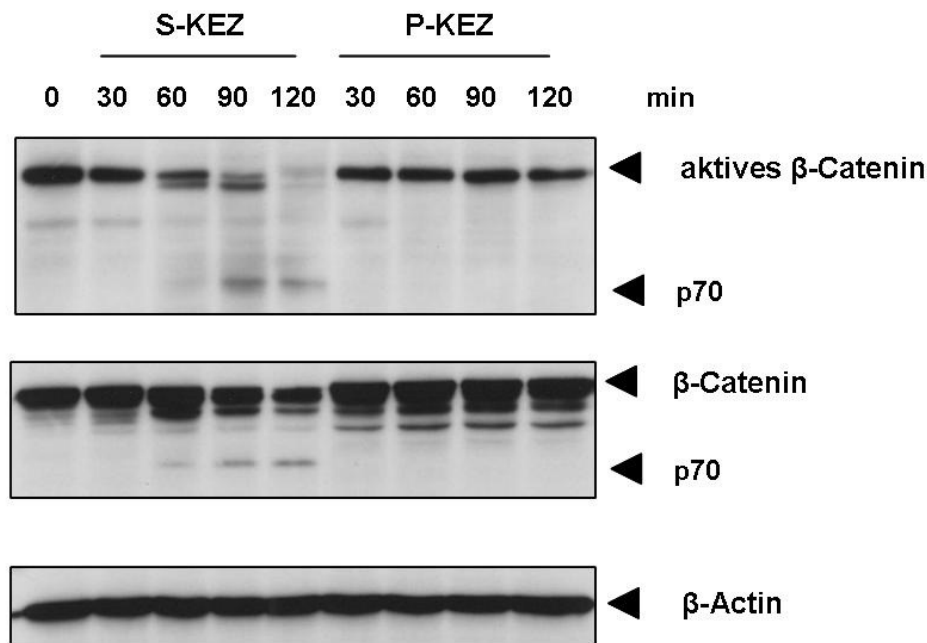


Abbildung 4.10: β-Catenin bleibt in P-KEZ aktiviert. Zu den genannten Zeiten wurden Zellextrakte aus S- und P-KEZ gewonnen. Mittels Western Blot wurden qualitativ sowohl die Gesamtmengen als auch die Level an aktivem (dephosphoryliertem) β-Catenin bestimmt. Aufgrund einer Caspase-abhängigen Spaltung nahm die Menge an Gesamt-β-Catenin in S-KEZ kontinuierlich ab. Dieser Prozess wurde in P-KEZ effektiv blockiert. Nach 120 min konnte in S-KEZ keine aktive Form von β-Catenin mehr detektiert werden, während die Signale des aktiven β-Catenin in P-KEZ unverändert blieben.

4.3 Einfluss von Zell-Zell-Kontakten auf die Regulation pro- und anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine

Wie bei vielen anderen Apoptoseformen spielt die Membranintegrität der Mitochondrien auch bei Anoikis eine Rolle. Bcl-2-Proteine wirken dabei als wichtige Regulatoren des mitochondrialen Membranpotentials und der Membranpermeabilität. Im Zusammenhang mit Anoikis scheint vor allem die Kontrolle durch die Proteine Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bak, Bid, Bim, Bad und Bik von Bedeutung zu sein (17; 18). Inwieweit die Funktion und Regulation dieser Proteine durch die Aufrechterhaltung von KEZ-Zell-Zell-Kontakten beeinflusst wird, sollte im Folgenden näher analysiert werden. Hierzu wurden jeweils Gesamtproteinextrakte sowie cytosolische und mitochondriale Fraktionen aus S- und P-KEZ gewonnen und mittels Western Blot untersucht.

4.3.1 Die Konzentration anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine bleibt in den Mitochondrien von P-KEZ konstant

Die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL fördern das Überleben von Zellen, indem sie an pro-apoptotische Proteine binden und dadurch deren Funktion inhibieren.

Die Gesamtmenge an Bcl-2 blieb sowohl in S-KEZ als auch in P-KEZ konstant, die intrazelluläre Lokalisation des Proteins war jedoch unterschiedlich (Abbildung 4.11). Direkt nach der Isolation der KEZ war Bcl-2 nahezu ausschließlich in der mitochondrialen Fraktion lokalisiert. In S-KEZ nahm der Anteil an mitochondrialem Bcl-2 während der Inkubation stark ab und das Protein wurde bereits nach 60 min in erhöhten Mengen im Cytosol detektiert. Dagegen blieb die Menge an mitochondrialem Bcl-2 während der Pelletinkubation konstant hoch und in den Cytosolfractionen wurden gegenüber dem Ausgangswert (0 min) nur geringfügig stärkere Signale beobachtet.

Bcl-xL lag in S- und P-KEZ während der gesamten Inkubationszeit fast ausschließlich in den mitochondrialen Fraktionen vor. Der Verlust der Zellverankerung bewirkte in S-KEZ eine schwache Abnahme des mitochondrialen Bcl-xL-Gehalts, während in P-KEZ konstant hohe Mengen an Bcl-xL detektiert wurden (Abbildung 4.11).

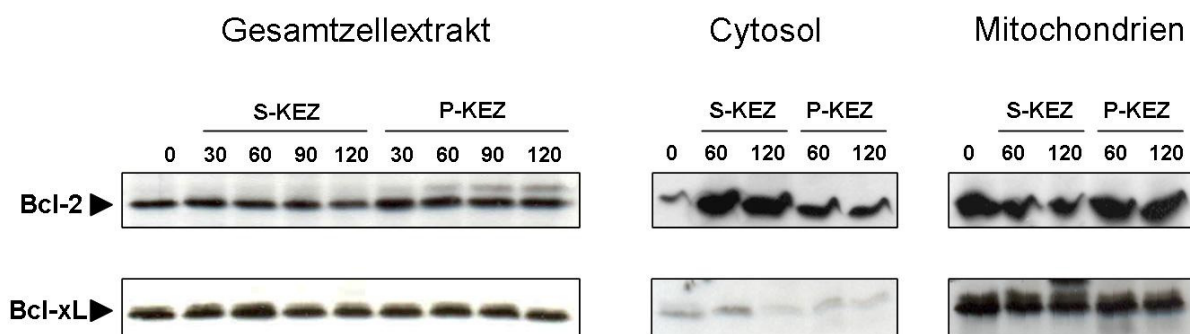


Abbildung 4.11: Regulation anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine. Aus S- und P-KEZ wurden Gesamtzellextrakte gewonnen sowie cytosolische und mitochondriale Fraktionen isoliert und auf die Mengen der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL untersucht. Pro Spur wurden jeweils 30 µg Protein aufgetragen. Die Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte in P-KEZ hatte keinen Einfluss auf die Mengen und intrazellulären Lokalisationen der Proteine. Dagegen führte der Verlust der Zell-Zell-Kontakte in S-KEZ zur Freisetzung von Bcl-2 ins Cytosol sowie zu einer schwachen Reduktion von mitochondrialem Bcl-xL.

Der Verlust der Zellverankerung scheint daher die Freisetzung von Bcl-2 aus den Mitochondrien ins Cytosol zu induzieren. Durch die Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte wird dieser Prozess blockiert. Die Konzentration anti-apoptotischer Faktoren in den Mitochondrien wird folglich in S-KEZ stark reduziert, während sie in P-KEZ konstant bleibt.

4.3.2 Der Anteil pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine nimmt in S-KEZ stark zu

Die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak sind die einzigen Vertreter der Bcl-2-Familie, die durch Porenbildung die äußere Mitochondrienmembran permeabilisieren und damit die Funktion der Mitochondrien direkt zerstören können.

Durch den Verlust bzw. die Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte wurden die Gesamtmengen an Bax und Bak nicht beeinflusst (Abbildung 4.12). Der Hauptanteil von Bax war bereits direkt nach der Isolation in den Mitochondrien lokalisiert. Auch Bak konnte in den cytosolischen Fraktionen nicht nachgewiesen werden, sondern wurde ausschließlich in den Mitochondrienfraktionen detektiert. Die Behandlung der Zellen hatte darüber hinaus auch keinen Einfluss auf den mitochondrialen Anteil von Bax; dieser blieb in S- wie in P-KEZ über 120 min unverändert. In den cytosolischen Fraktionen aus S-KEZ war Bax nach 120 min nicht mehr nachweisbar, während der geringe cytosolische Bax-Anteil in P-KEZ auf dem Niveau direkt nach der Isolation blieb. Nach Verlust des Zell-Kontakts war Bak in den mitochondrialen Fraktionen aus S-KEZ in erhöhten Mengen nachweisbar. Diese Zunahme wurde in P-KEZ nicht beobachtet; hier blieb der mitochondriale Bak-Anteil vergleichbar mit dem Zeitpunkt der Isolation.

Die Konzentration pro-apoptotischer Faktoren nimmt somit in S-KEZ zu, während sie in P-KEZ konstant bleibt.

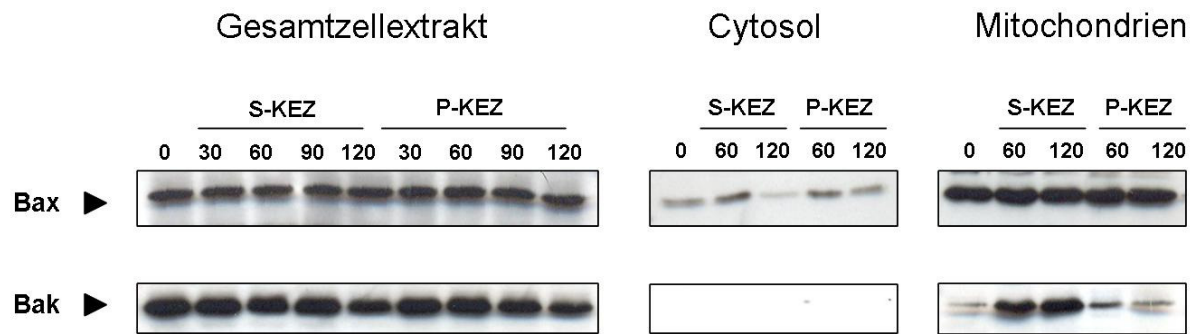


Abbildung 4.12: Regulation pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine. Aus S- und P-KEZ wurden Gesamtzellextrakte gewonnen sowie cytosolische und mitochondriale Fraktionen isoliert und auf die Mengen der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak untersucht. Pro Spur wurden jeweils 30 µg Protein aufgetragen. Beide Proteine waren nach der Zellisolation in den Mitochondrien lokalisiert. Während der Verlust der Zellverankerung zu einem Anstieg des mitochondrialen Bak-Anteils führte, blieben die Mengen an Bax in den Mitochondrien unabhängig von der Behandlung der Zellen konstant.

4.3.3 BH-3-only-Proteine werden durch die Zellaggregation nicht beeinflusst

Pro-apoptotische BH-3-only-Proteine besitzen keine intrinsische Fähigkeit zur Induktion des Zelltods, sondern wirken vielmehr als „Schalter“, durch die der Zelle Stress signalisiert werden kann. In S- und P-KEZ wurden daher aus der Gruppe der BH-3-only-Proteine die „Sensoren“ Bad und Bik, sowie die „Aktivatoren“ Bid und Bim untersucht (Abbildung 4.13).

Bad und Bik konnten sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien nachgewiesen werden. Der Verlust der Zellverankerung führte in S-KEZ zu einer schwachen Abnahme der Mengen an Bad. Die Abnahme betraf dabei in gleichem Maße den cytosolischen wie auch den mitochondrialen Anteil des Proteins. Die Pelletinkubation führte dagegen zu keiner Veränderung der Proteinmengen und intrazellulären Lokalisation von Bad. Auch der Phosphorylierungszustand des Moleküls wurde durch die unterschiedlichen Behandlungen der Zellen nicht beeinflusst. In P-KEZ wurden in den Cytosol- und Mitochondrien-Fractionen leicht reduzierte Level an Bik beobachtet, während die Mengen in S-KEZ weitgehend konstant blieben.

Von den drei bekannten Bim-Isoformen BimEL, BimL und BimS wird in KEZ nur BimEL exprimiert. BimEL sowie Bid waren überwiegend in den Mitochondrien

lokalisiert. Die Menge und intrazelluläre Verteilung von BimEL wurde durch die Inkubationen in Suspension bzw. im Pellet nicht beeinflusst. Der Verlust der Zellverankerung führte dagegen in S-KEZ zu einer starken Reduktion von mitochondrialem Bid nach 120 min. Zum gleichen Zeitpunkt wurde in den S-KEZ-Gesamtzelllysaten ein zusätzliches Signal von etwa 15 kDa beobachtet. In P-KEZ wurden dagegen keine Veränderungen der Menge und Lokalisation von Bid beobachtet.

Diese Daten belegen, dass die Mengen und intrazellulären Lokalisationen der *BH3-only*-Proteine durch die Aufrechterhaltung bzw. den Verlust der Zell-Zell-Verankerung nur geringfügig beeinflusst werden.

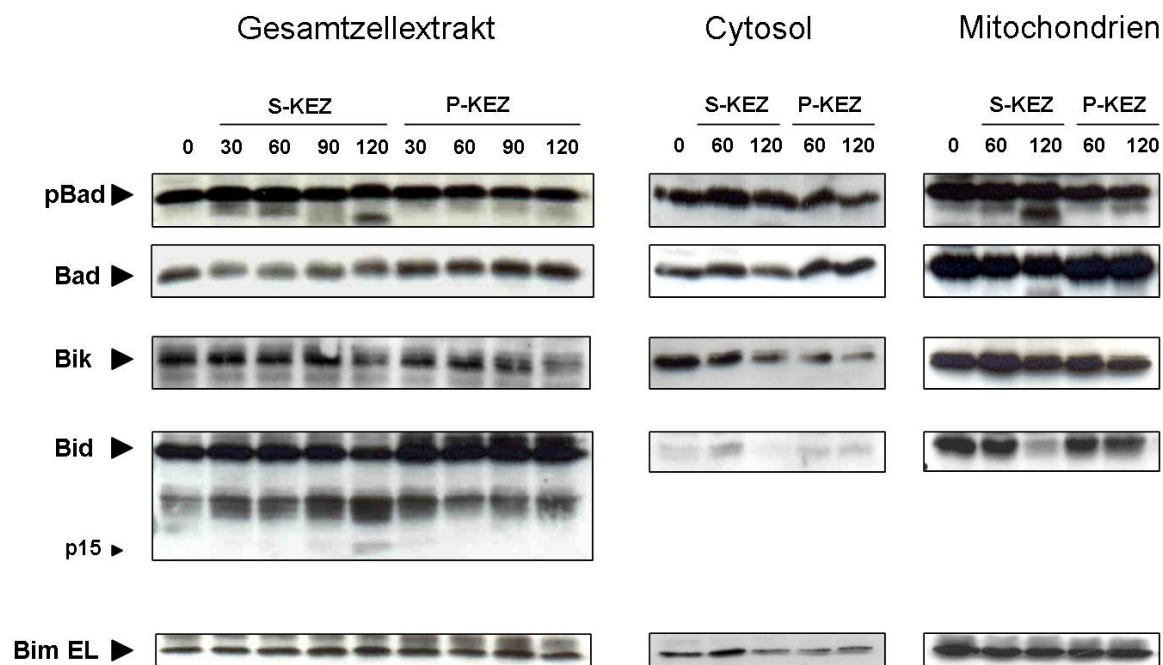


Abbildung 4.13: Regulation pro-apoptotischer BH3-only-Proteine. Aus S- und P-KEZ wurden Gesamtzellextrakte gewonnen sowie cytosolische und mitochondriale Fraktionen isoliert und auf die Mengen der pro-apoptotischen BH3-only-Proteine Bad, Bik, Bid und Bim untersucht. Pro Spur wurden jeweils 30 µg Protein aufgetragen. Durch die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten blieben die Mengen und intrazellulären Lokalisationen der Proteine in P-KEZ im Vergleich mit frisch isolierten Zellen unverändert. Während in S-KEZ Bik und BimEL ebenfalls unbeeinflusst blieben, wurde hier eine schwache Abnahme von Bad sowie eine starke Reduktion von mitochondrialem Bid beobachtet.

4.4 Überlebenssignale in P-KEZ

4.4.1 Untersuchung der Aktivierung von relevanten Signalpfaden in P-KEZ

Um zu klären, über welche intrazellulären Signalwege Zell-Zell-Kontakte in P-KEZ den beobachteten anti-apoptotischen Effekt vermitteln, wurden eine Reihe von Signalproteinen, die für das Überleben von Epithelzellen eine wichtige Rolle spielen, auf ihre Aktivierung in P-KEZ überprüft.

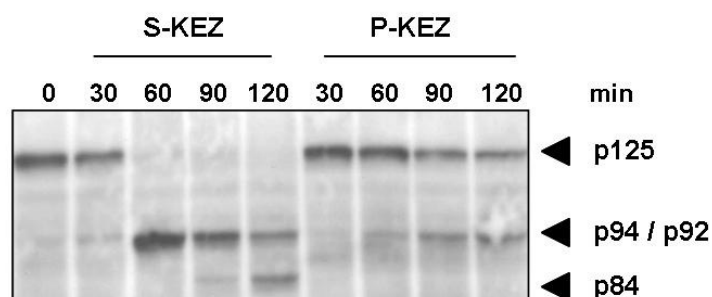
4.4.1.1 Der anti-apoptotische Effekt in P-KEZ ist unabhängig von FAK

Die *Focal Adhesion Kinase* (FAK) ist ein wichtiges Signalmolekül bei der Transduktion anti-apoptotischer Signale nach Bindung von Integrinen an die extrazelluläre Matrix. Die Aktivierung von FAK erfolgt über die Phosphorylierung an Tyr397. Die Induktion von Anoikis nach Verlust des Zell-Matrix-Kontakts führt zur aufeinander folgenden Prozessierung von FAK durch zwei Mitglieder der Caspase-3-Familie (54). Um herauszufinden, ob diese wichtige Kinase auch für den Zell-Zell-Kontakt-vermittelten anti-apoptotischen Effekt von Bedeutung ist, wurden Zellextrakte aus S- und P-KEZ mittels Western Blot auf ihren Gehalt an FAK untersucht (Abbildung 4.14 A). In S-KEZ kam es zu einer vollständigen Prozessierung des Proteins: Innerhalb der ersten 30 bis 60 min nach Verlust der Zellverankerung wurden 94/92-kDa-Fragmente detektiert, nach 120 min war außerdem auch ein 84-kDa-Fragment nachweisbar. Die FAK-Prozessierung zu p94/p92 in P-KEZ hingegen war selbst nach 120 min unvollständig und das p84-Fragment konnte zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Natives FAK (p125) war darüber hinaus in P-KEZ nach 120 min noch in deutlichen Mengen vorhanden, während es in S-KEZ bereits nach 60 min vollständig zu p94/p92 abgebaut war.

Um zu ermitteln, ob durch den Erhalt der Zell-Zell-Kontakte neben der FAK-Prozessierung auch die über dieses Protein vermittelten intrazellulären Signale beeinflusst werden, wurde der Phosphorylierungsstatus von FAK Tyr397 untersucht. Da die Menge des nativen Proteins in S-KEZ aufgrund der Caspase-abhängigen Spaltung bereits nach 60 min deutlich reduziert war (Abbildung 4.14 A), wurde die FAK-Phosphorylierung nur während der ersten 60 min verfolgt, um Effekte der

Proteindegradation auf die quantitative Untersuchung der Phosphorylierung zu vermeiden (Abbildung 4.14 B). Die Zellaggregation führte in P-KEZ bereits innerhalb der ersten 20 min der Inkubation zu einer raschen Dephosphorylierung von FAK Tyr397 und nach 60 min waren nur noch schwache Signale der phosphorylierten Form nachweisbar. In S-KEZ blieb dieses Signal dagegen während der ersten 50 min konstant hoch. Der beobachtete Verlust der FAK Tyr397-Phosphorylierung in P-KEZ deutet somit auf eine negative Kreuzregulation zwischen Zell-Zell-Kontakt- und Zell-Matrix-Kontakt-vermittelten Signalen hin.

A FAK



B pFAK³⁹⁷

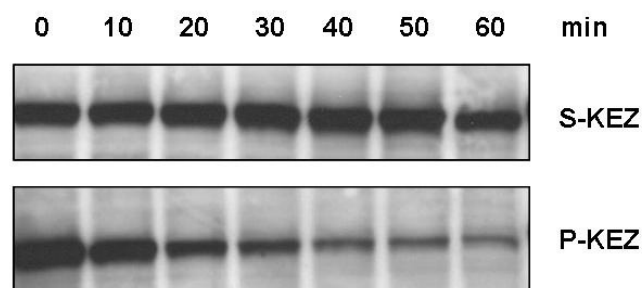


Abbildung 4.14: Anti-apoptotische Signale in P-KEZ sind FAK-unabhängig. Zellextrakte aus S- und P-KEZ wurden mittels Western Blot auf (A) FAK und (B) FAK-Phosphorylierung untersucht. Das native FAK-Protein (p125) war in S-KEZ zwei aufeinander folgenden Spaltungen ausgesetzt, welche zur Bildung von 94/92- und 84-kDa-Fragmenten führten. In P-KEZ wurde dieser Abbau nicht beobachtet. Vielmehr fand in P-KEZ eine rasche Dephosphorylierung von FAK Tyr397 statt.

4.4.1.2 Akt bleibt in P-KEZ konstant aktiviert

PI-3K/Akt-abhängige Signale sind für das Überleben von Epithelzellen von großer Bedeutung und spielen gerade im Zusammenhang mit Adhäsions-vermittelter Signaltransduktion eine wichtige Rolle. Dies wurde in einer Reihe von verschiedenen experimentellen Ansätzen beschrieben (36; 68-70; 86; 88). Inwieweit dieser wichtige Signalweg für die Vermittlung des in P-KEZ beobachteten anti-apoptotischen Effekts von Bedeutung ist, wurde im Folgenden untersucht. Die Aktivierung des PI3-K/Akt-Pfads wurde anhand der Phosphorylierung des Effektormoleküls Akt mittels Western Blot analysiert (Abbildung 4.15). Nach Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte wurde während der gesamten Inkubationsdauer in P-KEZ eine gleichmäßig hohe Phosphorylierung von Akt Ser473 und Thr308 nachgewiesen, während in S-KEZ über 120 min eine langsame Abnahme der phosphospezifischen Signale beobachtet wurde. In Zellen mit bestehenden Zell-Zell-Kontakten blieb daher der Akt-Signalweg aktiviert, während nach Verlust der Zellverankerung eine kontinuierliche Deaktivierung stattfand.

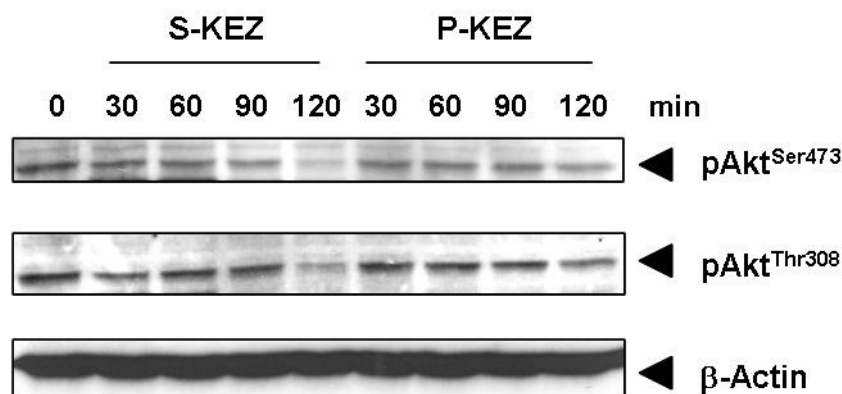


Abbildung 4.15: Akt bleibt in P-KEZ aktiviert. In Zellextrakten aus S- und P-KEZ wurde die Aktivierung von Akt anhand der Phosphorylierung an Thr308 und Ser473 nachgewiesen. In S-KEZ nahm die Phosphorylierung an beiden Aminosäuren ab; in P-KEZ blieb der Phosphorylierungszustand hingegen konstant.

4.4.1.3 Die KEZ-Aggregation induziert eine transiente Aktivierung von EGFR

Für humane Keratinozyten und Plattenepithelzellen wurde kürzlich ein Signalweg beschrieben, bei dem via Zell-Zell-Kontakte der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor, EGFR, aktiviert wird. Dieser Mechanismus trägt zum Überleben der Zellen in Abwesenheit von Zell-Matrix-Adhäsion bei (90; 92; 93). Es wurde deshalb überprüft, ob der Verlust von Zell-Matrix-Kontakten mit Hilfe dieses Signalpfads auch in P-KEZ kompensiert werden kann. In P-KEZ-Zellextrakten wurde hierzu mittels Western Blot die EGFR-Phosphorylierung ermittelt (Abbildung 4.16). In frisch isolierten KEZ lag der Rezeptor in phosphorylierter Form vor. Direkt nach der Zellaggregation nahm die Phosphorylierung von EGFR sehr stark zu, fiel jedoch nach etwa 120 min wieder zurück auf das Ausgangsniveau. Als Folge der Zellaggregation wurde neben dem Anstieg der EGFR-Phosphorylierung auch eine leichte Erhöhung der Gesamtmenge an EGFR beobachtet. Die Zellaggregation zu P-KEZ bewirkt demzufolge eine transiente Aktivierung des EGFR.

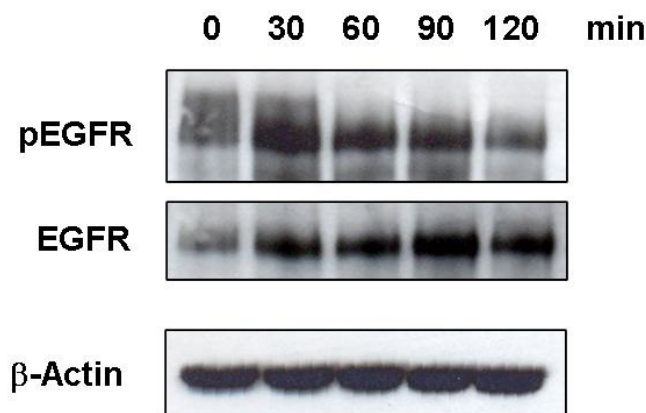


Abbildung 4.16: Transiente Aktivierung des EGFR in P-KEZ. In Zellextrakten aus P-KEZ wurden Gesamtmenge und Phosphorylierung des EGFR untersucht. Die Zellaggregation führte zu einem transienten Anstieg der EGFR-Phosphorylierung.

4.4.1.4 Mitglieder der MAPK-Familie werden durch die Zellaggregation unterschiedlich beeinflusst

In unterschiedlichen experimentellen Ansätzen wurde nachgewiesen, dass auch die Familie der MAP-Kinasen im Zusammenhang mit Zell-Zell-Kontakt-vermittelter Signaltransduktion von Bedeutung ist (71; 86; 90; 92; 93). Um beurteilen zu können, ob Vertreter dieser Proteinfamilie für das Überleben von P-KEZ ebenfalls eine Rolle spielen, wurde der Phosphorylierungsstatus von JNK, Erk1/2 und p38 MAPK im Western Blot bestimmt (Abbildung 4.17). Alle drei untersuchten Kinasen lagen direkt nach der KEZ-Isolation in phosphoryliertem Zustand vor. Der Anteil an pJNK nahm während der Pellet-Inkubation bereits nach 60 min sehr stark ab, dagegen war bei der Menge von p-p38 MAPK nur ein leichter Rückgang zu beobachten. Direkt nach der Zellaggregation erfolgte, ähnlich wie bei EGFR, ein starker transienter Anstieg der Mengen an pErk1/2, die nach 60 min jedoch wieder auf das Ausgangsniveau zurückgingen und später noch weiter abnahmen.

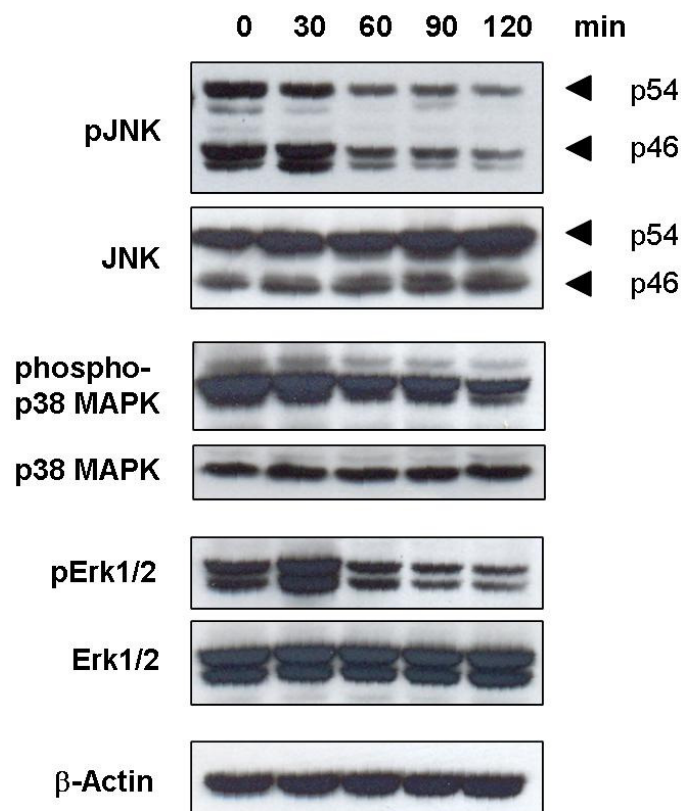


Abbildung 4.17: Aktivierung von MAP-Kinasen in P-KEZ. In P-KEZ-Zellextrakten wurden die Phosphorylierungszustände von JNK, Erk1/2 und p38 MAPK bestimmt. Im Laufe der Pellet-Inkubation nahm die JNK-Phosphorylierung leicht ab, während die Level von p-p38 MAPK weitgehend konstant blieben. Bei Erk1/2 wurde als Folge der Aggregation eine transiente Zunahme der Phosphorylierung beobachtet, die jedoch rasch wieder auf das Ausgangsniveau zurückging.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die Aktivität von MAP-Kinasen für das Zell-Zell-Kontakt-vermittelte Überleben von KEZ allenfalls eine transiente Rolle spielt.

4.4.1.5 In P-KEZ werden Src-abhängige Signale partiell herunterreguliert

Untersuchungen an der Rattenepithelzelllinie IEC-18 zeigten, dass die Src-Kinase eine wichtige Rolle für das Überleben intestinaler Epithelzellen spielt (105; 120; 121). Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen der aufrecht erhaltenen Zell-Zell-Kontakte auf den Aktivierungszustand dieses Signalproteins in P-KEZ untersucht (Abbildung 4.18). Auch Src lag in frisch isolierten Zellen in phosphorylierter Form vor. Der Phosphorylierungszustand des Proteins blieb während der ersten 60 min der Pelletinkubation stabil. 90 und 120 min nach der Zellaggregation wurde eine leichte Abnahme der Src-Phosphorylierung beobachtet, jedoch kam es zu keiner vollständigen Deaktivierung des Proteins. Ähnlich wie bei FAK – allerdings nicht im gleichen Ausmaß und zudem zeitlich verzögert – führte die Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte also zu einer partiellen Herunterregulation Src-abhängiger Signale.

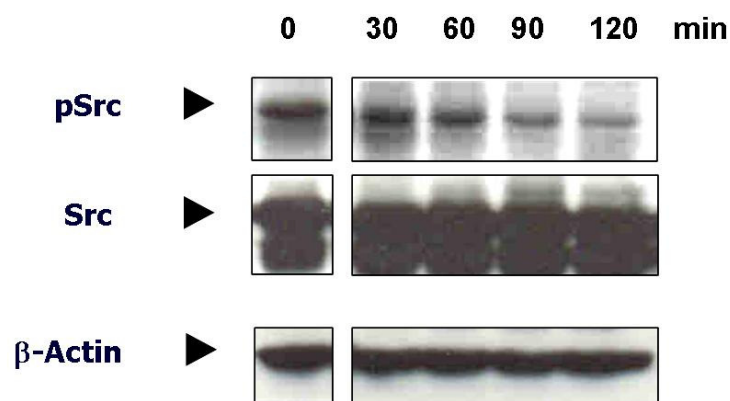


Abbildung 4.18: Die Pelletinkubation führt zur teilweisen Dephosphorylierung von Src. In Zellextrakten aus P-KEZ wurde die Phosphorylierung von Src Tyr416 untersucht. Während der ersten 60 min nach der Zellaggregation blieb der Phosphorylierungszustand konstant. Zu den späteren Zeitpunkten wurde eine leichte Abnahme der Src-Phosphorylierung beobachtet.

4.4.1.6 Die NF- κ B-Aktivität wird durch die Zellaggregation nicht beeinflusst

Neueste Untersuchungen zeigen, dass auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B in intestinalen Epithelzellen einen anti-apoptotischen Effekt vermitteln kann (111; 112). Um herauszufinden, ob die aufrecht erhaltenen Zell-Zell-Kontakte in P-KEZ möglicherweise zu einer verstärkten Aktivierung von NF- κ B führen, wurden Zellkernextrakte aus P-KEZ hergestellt. Mittels ELISA wurde anschließend die Aktivierung von NF- κ B anhand der nukleären Mengen an p65 bestimmt. In frisch isolierten Zellen lag der Transkriptionsfaktor in aktivierter Form vor; der Wert der NF- κ B-Aktivität betrug zum Zeitpunkt der Isolation etwa 60% im Vergleich zur Positivkontrolle (Abbildung 4.19). In Folge der Zellaggregation sowie der nachfolgenden Pelletinkubation wurde jedoch kein weiterer Anstieg der Aktivität beobachtet. Die Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Verankerung verursachte somit keine verstärkte Aktivierung von NF- κ B; die Aktivität des Transkriptionsfaktors blieb jedoch über die Dauer der Inkubation konstant hoch.

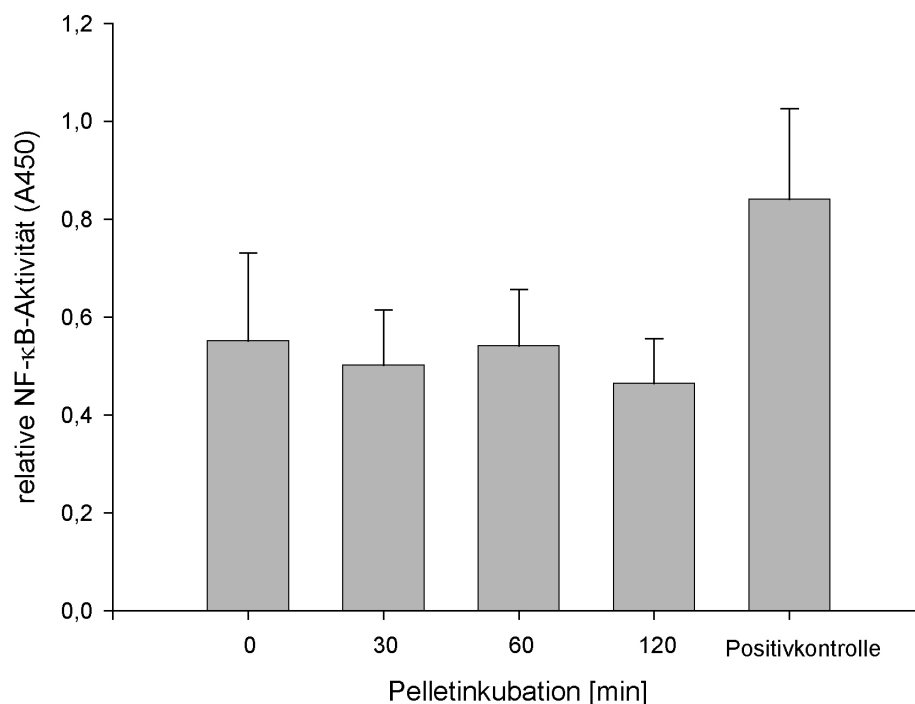


Abbildung 4.19: Die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten induziert keine zusätzliche Aktivierung von NF- κ B. Aus P-KEZ wurden Zellkernextrakte gewonnen, in welchen mittels ELISA die Mengen von NF- κ B (p65) bestimmt wurden. Die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten hatte keinen Einfluss auf die NF- κ B-Aktivität. Als Positivkontrolle wurde ein vom Hersteller mitgelieferter Jurkat-Zellkernextrakt verwendet.

4.4.2 Blockierung aktivierter Signalpfade in P-KEZ mittels spezifischer Inhibitoren

In Abschnitt 4.4.1 konnte nachgewiesen werden, dass in P-KEZ eine Reihe von Signalmolekülen in aktivierter Form vorliegen, somit also entsprechende Überlebenspfade „eingeschaltet“ sind. Es musste nun ermittelt werden, welche dieser aktivierten Signalwege für den anti-apoptotischen Effekt der Zell-Zell-Kontakte tatsächlich verantwortlich sind. Zu diesem Zweck wurden spezifische pharmakologische Inhibitoren eingesetzt, welche jeweils zentrale Moleküle der betreffenden Überlebenspfade blockieren. Frisch isolierte KEZ wurden mit ansteigenden Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren für 10 min bei RT vorinkubiert, bevor die Zentrifugation zum Pellet erfolgte. Die Pellets wurden anschließend jeweils zwei Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle wurden KEZ verwendet, die in Abwesenheit von Inhibitoren und ohne vorherige Zellaggregation zwei Stunden als Zellsuspension inkubiert wurden.

4.4.2.1 Der anti-apoptotische Effekt in P-KEZ ist MAPK-unabhängig

Die Familie der MAP-Kinasen spielt für die Proliferation und das Überleben von Zellen eine entscheidende Rolle. Als Folge der Zellaggregation wurde in P-KEZ unter anderem eine starke transiente Aktivierung von Erk1/2 beobachtet (Abbildung 4.17). Um zu bestimmen, ob die so erreichte MAPK-vermittelte Signaltransduktion für das Überleben von P-KEZ eine Rolle spielt, wurde der Inhibitor U0126 eingesetzt. Dieses Molekül hemmt die Kinaseaktivität von MEK, welches innerhalb der MAPK-Kaskade für die Aktivierung von Erk1/2 verantwortlich ist. Die Blockierung MEK/Erk-abhängiger Signale führte zu keiner Steigerung der Apoptoserate in P-KEZ. Die ermittelten Caspase-3-Aktivitäten wiesen keine Unterschiede zu den unbehandelten Zellen auf und waren unabhängig von der U0126-Dosis signifikant geringer als die der Positivkontrolle (Abbildung 4.20). Dieses Ergebnis zeigt, dass die durch Zell-Zell-Kontakte induzierte anti-apoptotische Signaltransduktion nicht über den MAPK-Pfad vermittelt wird.

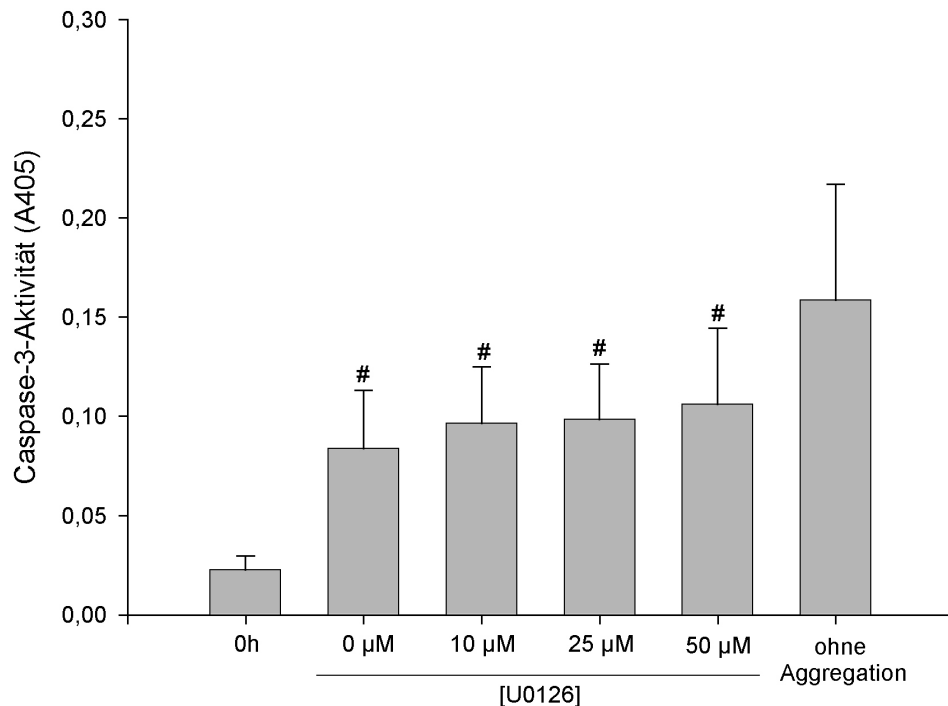


Abbildung 4.20: MAPK-abhängige Signale spielen für das Überleben von P-KEZ keine Rolle. Frisch isolierte KEZ wurden mit ansteigenden Konzentrationen des MEK-Inhibitors U0126 behandelt, zu Pellets zentrifugiert und zwei Stunden inkubiert. Die Gegenwart von U0126 hatte keinen Einfluss auf das Apoptoseverhalten der Zellen. 0h: frisch isolierte KEZ; Positivkontrolle: KEZ ohne Aggregation nach 120 min; n=12; #p<0,05 im Vergleich zur Positivkontrolle.

4.4.2.2 EGFR-vermittelte Signale wirken in P-KEZ anti-apoptotisch

Um zu überprüfen, ob die durch die Aggregation induzierte EGFR-Aktivierung (Abbildung 4.16) zum Überleben der Zellen beiträgt, wurden EGFR-abhängige Signale in P-KEZ mit Hilfe des Inhibitors Tyrphostin AG1478 blockiert. Die Gegenwart des EGFR-Kinase-Inhibitors führte in P-KEZ zu einem dosisabhängigen Anstieg der Caspase-3-Aktivität (Abbildung 4.21). Allerdings wurden selbst mit der höchsten eingesetzten Dosis von Tyrphostin AG1478 (50 µM) keine signifikant erhöhten Aktivitäten gegenüber den unbehandelten Zellen erreicht. Dennoch war infolge der EGFR-Blockierung eine Tendenz hin zu einer Steigerung der Apoptose erkennen: Während die Behandlung mit 10 µM des Inhibitors im Vergleich zur Positivkontrolle noch signifikant geringere Caspase-3-Aktivitäten lieferte, waren die ermittelten Aktivitäten nach Inkubation mit 25 und 50 µM Tyrphostin AG1478 im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr signifikant. Somit konnte gezeigt werden, dass

EGFR-abhängige Signale in P-KEZ zwar anti-apoptotisch wirken, jedoch nur einen geringen Beitrag zum Überleben der Zellen leisten.

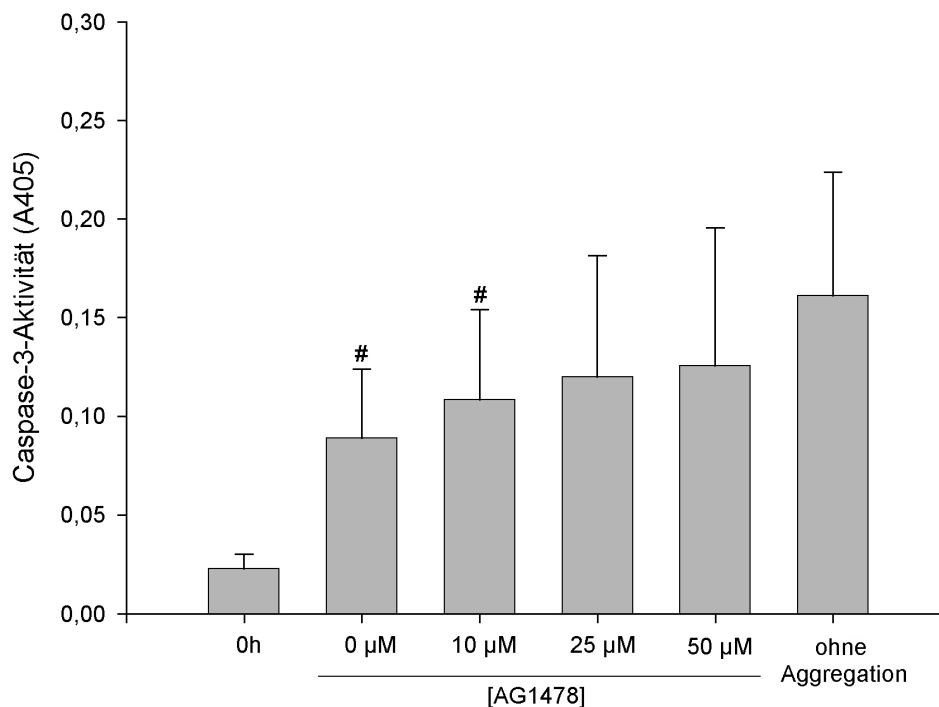


Abbildung 4.21: Die Hemmung der EGFR-Kinase-Aktivität führt zur Steigerung der Caspase-3-Aktivität. Frisch isolierte KEZ wurden mit ansteigenden Konzentrationen Tyrphostin AG1478 behandelt, zu Pellets zentrifugiert und zwei Stunden inkubiert. In Gegenwart des EGFR-Kinase-Inhibitors wurde eine dosisabhängige Zunahme der Caspase-3-Aktivität beobachtet. 0h: frisch isolierte KEZ; Positivkontrolle: KEZ ohne Aggregation nach 120 min; n=12; #p<0,05 im Vergleich zur Positivkontrolle.

4.4.2.3 PI-3K-vermittelte Signale tragen zum Überleben von P-KEZ bei

Neben der MAPK-Kaskade zählt der PI-3K/Akt-Pfad zu den wichtigsten zellulären Signalwegen im Zusammenhang mit Überleben und Proliferation. In Folge der Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten zwischen KEZ wurde eine konstant hohe Aktivierung von Akt beobachtet (Abbildung 4.15). Zur Hemmung des PI-3K/Akt-Pfades in P-KEZ wurde der PI-3K-spezifische Inhibitor LY294002 verwendet. LY294002 wirkte dem anti-apoptotischen Effekt der Zell-Zell-Kontakt-vermittelten Überlebenssignale entgegen: In Gegenwart des Inhibitors wurde ein dosisabhängiger Anstieg der Caspase-3-Aktivität beobachtet. Konzentrationen von 30 und 60 µM LY294002 bewirkten eine signifikant höhere Caspase-3-Aktivierung im Vergleich zu unbehandelten KEZ (Abbildung 4.22). Dennoch konnte durch die Hemmung des

PI-3K-abhängigen Signalpfads keine Caspase-3-Aktivität erreicht werden, die mit der in den nicht-aggregierten Kontrollzellen vergleichbar war. Diese Daten deuten darauf hin, dass PI-3K-vermittelte Signale für die Apoptosehemmung in P-KEZ von Bedeutung sind, dass außer PI-3K/Akt aber auch noch andere Signalwege an der Übertragung Zell-Zell-Kontakt-vermittelter Überlebenssignale beteiligt sein müssen.

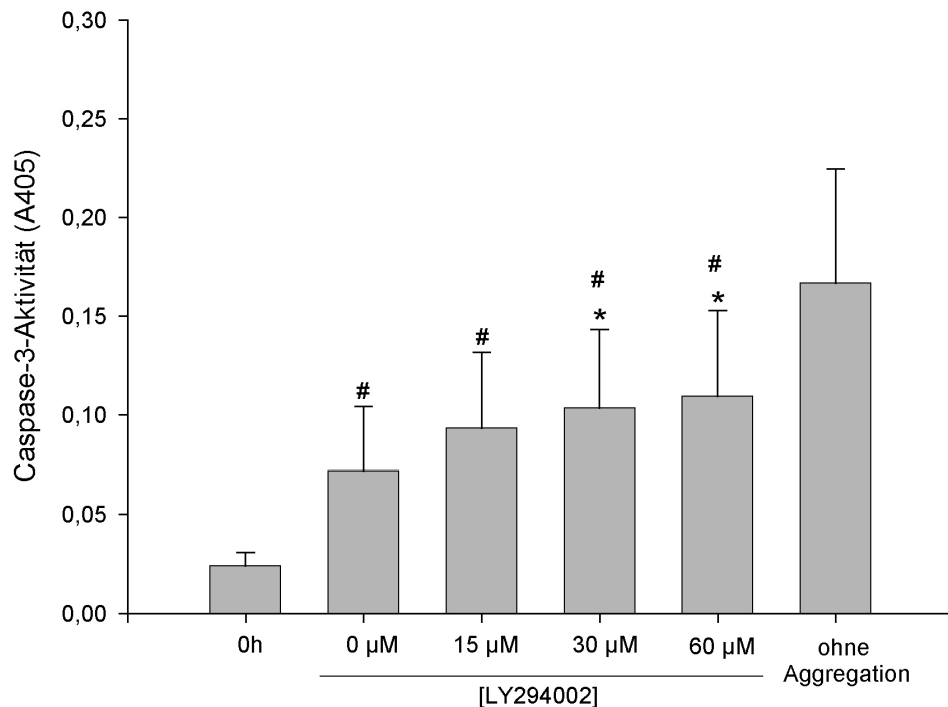


Abbildung 4.22: Die Hemmung von PI-3K wirkt dem anti-apoptotischen Effekt in P-KEZ entgegen. Frisch isolierte KEZ wurden mit ansteigenden Konzentrationen des PI-K-Inhibitors LY294002 behandelt, zu Pellets zentrifugiert und zwei Stunden inkubiert. LY294002 verursachte eine dosisabhängige Zunahme der Caspase-3-Aktivität. 0h: frisch isolierte KEZ; Positivkontrolle: KEZ ohne Aggregation nach 120 min; n=14; *p<0,05 im Vergleich zu unbehandelten Zellen; #p<0,05 im Vergleich zur Positivkontrolle.

4.4.2.4 Src-vermittelte anti-apoptotische Signale sind essentiell für das Überleben von P-KEZ

Als nächstes wurde die Beteiligung von Src an der Vermittlung anti-apoptotischer Signale in P-KEZ untersucht, da die Aktivität dieser Kinase unter anderem für das Überleben von Kolonkarzinomzellen in Abwesenheit von Zell-Matrix-Kontakten eine wesentliche Rolle spielt (104). In P-KEZ ging die Src-Phosphorylierung zwar im Verlauf der Pelletinkubation leicht zurück, jedoch wurde keine vollständige Deaktivierung des Moleküls beobachtet (Abbildung 4.18). Um Src-abhängige Signale zu blockieren, wurden KEZ vor der Aggregation mit dem Src-spezifischen Inhibitor

PP1 behandelt. Die Gegenwart von PP1 führte zu einem starken, dosisabhängigen Anstieg der Apoptoserate in P-KEZ (Abbildung 4.23). Die Inkubation mit 50 μM des Inhibitors induzierte in P-KEZ eine Zunahme der Caspase-3-Aktivität um mehr als 70%. Die Apoptoserate war in diesen Zellen gegenüber den unbehandelten Zellen signifikant erhöht ($p=0,004$) und vergleichbar mit der Apoptoserate in den nicht-aggregierten Kontrollen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Src-vermittelten anti-apoptotischen Signale für das Überleben der P-KEZ von entscheidender Bedeutung sind.

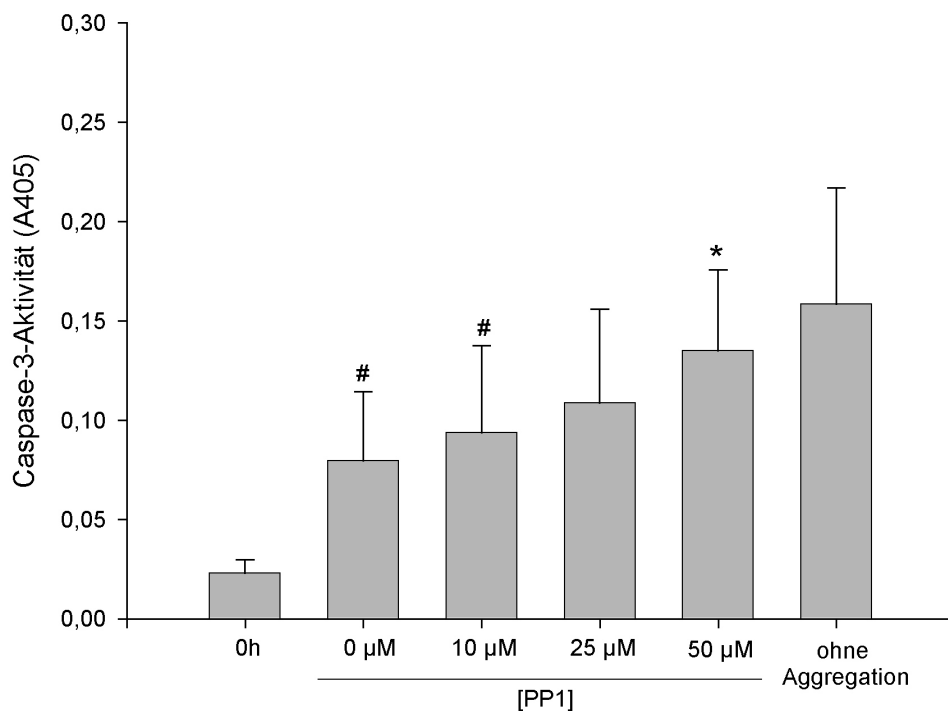


Abbildung 4.23: Apoptoseinduktion in P-KEZ durch Hemmung Src-abhängiger Signale. Frisch isolierte KEZ wurden mit ansteigenden Konzentrationen des Src-spezifischen Inhibitors PP1 behandelt, zu Pellets zentrifugiert und zwei Stunden inkubiert. PP1 verursachte eine starke, dosisabhängige Zunahme der Caspase-3-Aktivität. 0h: frisch isolierte KEZ; Positivkontrolle: KEZ ohne Aggregation nach 120 min; $n=10$; * $p<0,05$ im Vergleich zu unbehandelten Zellen; # $p<0,05$ im Vergleich zur Positivkontrolle.

Zusammengefasst zeigen die durchgeführten Inhibitorexperimente, dass der Zell-Zell-Kontakt-vermittelte anti-apoptotische Effekt nicht auf der Aktivität eines einzelnen Signalwegs beruht, sondern dass mehrere verschiedene Signalfade für das Überleben von P-KEZ verantwortlich sind. Während MAP-Kinasen für das Zell-Zell-Kontakt-vermittelte Überleben keine Rolle spielen, scheinen Src-abhängige Signale von essentieller Bedeutung zu sein.

4.5 Induktion von Überlebenspfaden als transienter Schutzmechanismus vor Anoikis

4.5.1 Der Verlust der Zellverankerung induziert die Aktivierung bestimmter Überlebenspfade und Transkriptionsfaktoren

In Kapitel 4.4.1 wurde die Aktivierung verschiedener Signalmoleküle in P-KEZ untersucht. Analoge Western Blots wurden von Zellextrakten aus S-KEZ angefertigt und mit den Ergebnissen der P-KEZ verglichen. Interessanterweise ergab diese Gegenüberstellung, dass fast alle untersuchten Überlebenspfade in S-KEZ deutlich stärker aktiviert waren als in P-KEZ: Western Blots gegen die aktivierten Signalproteine EGFR, JNK, p38 MAPK, Erk und Src in S-KEZ zeigten, dass der Verlust der Zellverankerung bei allen untersuchten Kinasen eine starke Zunahme der Phosphorylierung induzierte (Abbildung 4.24). Maximale Phosphorylierungen von EGFR, Erk1/2 und JNK wurden nach 60 min detektiert, während die Level von pSrc und p-p38 MAPK auch zu späteren Zeitpunkten noch weiter anstiegen.

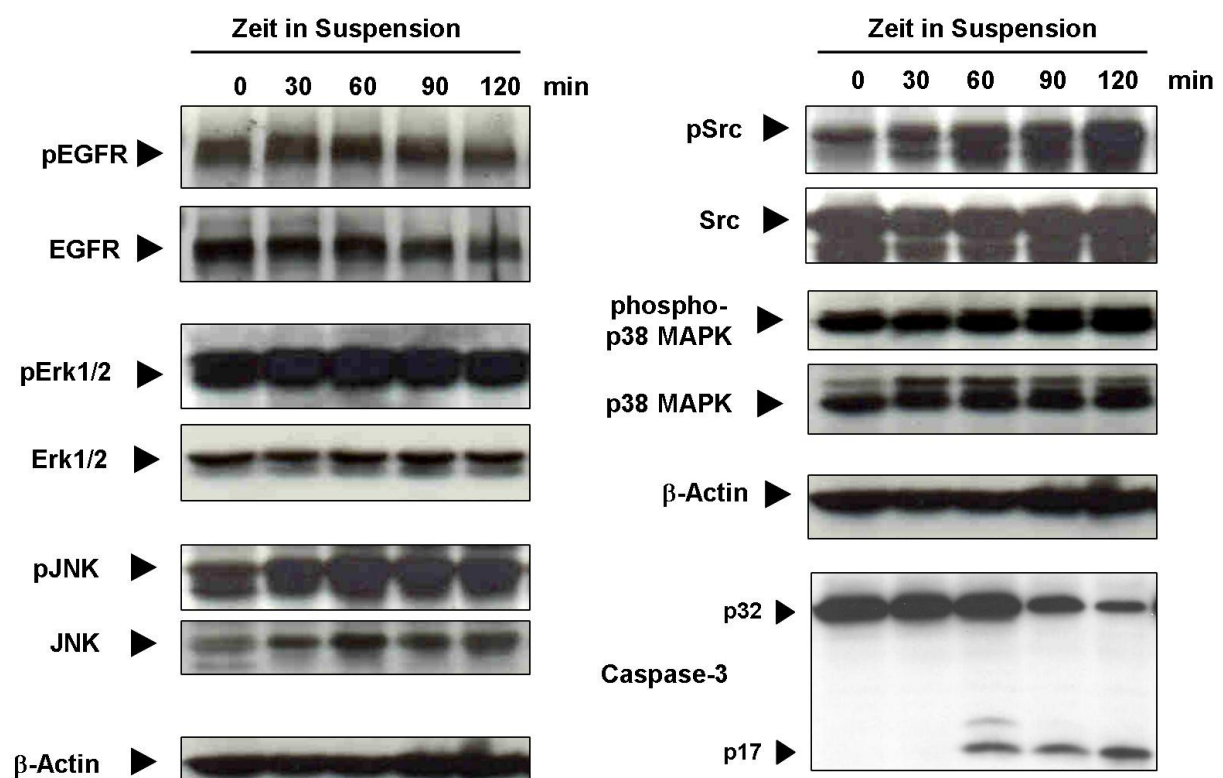


Abbildung 4.24: Aktivierung von Kinasen nach Verlust der Zellverankerung. In Zellextrakten aus S-KEZ wurden die Mengen an pSrc, p-p38 MAPK, pEGFR, pErk1/2 und pJNK mittels Western Blot bestimmt. Der Verlust der Zellverankerung führte in allen untersuchten Kinasen zu einer starken Zunahme der Phosphorylierung. Die Aktivierung der Kinasen fand dabei vor der vollständigen Prozessierung von Caspase-3 statt.

Bemerkenswert hierbei ist, dass die initiale Aktivierung dieser Kinasen zu einem Zeitpunkt erfolgte, zu dem Caspase-3 noch nicht vollständig prozessiert war.

Weiterhin wurde in S-KEZ auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B bestimmt. Hierzu wurden Zellkernextrakte aus S-KEZ gewonnen und mittels ELISA auf ihren Gehalt an p65 untersucht. Unmittelbar nach Verlust der Zellverankerung konnte ein signifikanter, zeitabhängiger Anstieg der NF- κ B-Aktivität beobachtet werden (Abbildung 4.25 A). Bereits innerhalb der ersten 30 min nahm die Aktivität des Transkriptionsfaktors um 60% zu und betrug nach 120 min Suspensionskultur das 2,5-fache des Ausgangswertes.

Bei der Untersuchung der Aktivierung verschiedener Kinasen in S-KEZ wurde unter anderem eine schnelle und starke Aktivierung von JNK beobachtet (Abbildung 4.24). Ein Substrat dieser Kinase ist c-Jun, ein weiterer Transkriptionsfaktor, welcher durch eine JNK-abhängige Phosphorylierung aktiviert wird. Um die Aktivität von JNK funktionell zu bestätigen, wurden die intrazellulären Mengen an phospho-c-Jun in S-KEZ mittels ELISA bestimmt. Die Aktivierung von c-Jun erfolgte im Vergleich zu NF- κ B zeitlich versetzt (Abbildung 4.25 B): Während der Phosphorylierungszustand des Proteins innerhalb der ersten 60 min der Inkubation weitgehend unverändert

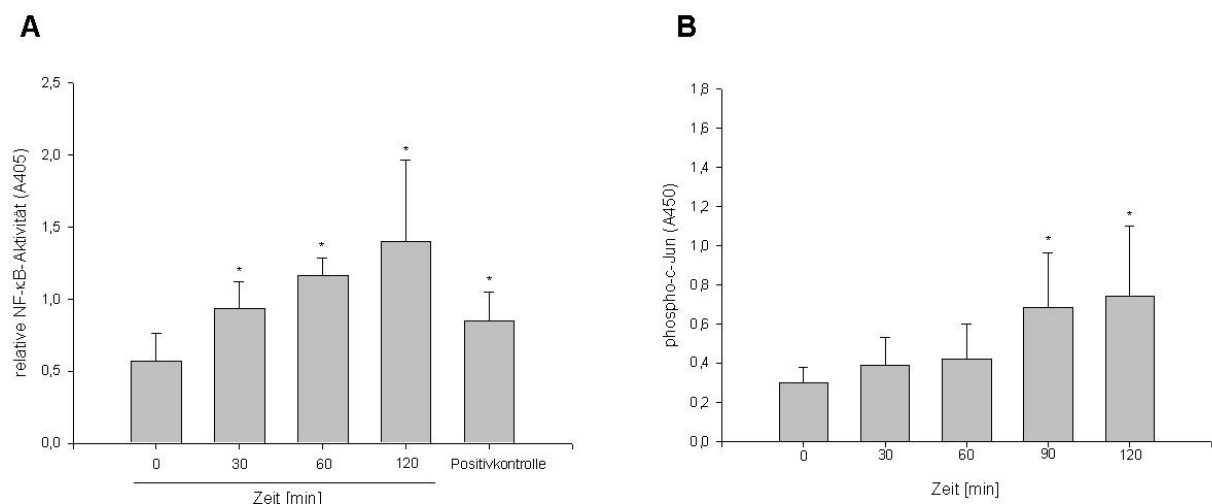


Abbildung 4.25: Der Verlust der Zellverankerung triggert die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. (A) In Zellkernextrakten, die aus S-KEZ gewonnen wurden, wurde der Gehalt an NF- κ B p65 ermittelt. Als Positivkontrolle wurde ein vom Hersteller mitgelieferter Jurkat-Zellkernextrakt verwendet. Die Induktion von Anoikis führte in S-KEZ zu einem zeitabhängigen Anstieg der NF- κ B-Aktivität. $n=4$; * $p<0,01$ im Vergleich zum Zeitpunkt der Isolation (0 min). (B) In Gesamtzellextrakten aus S-KEZ wurde die Phosphorylierung von c-Jun mittels ELISA bestimmt. 90 min nach Verlust der Zellverankerung waren die Level an p-c-Jun signifikant erhöht. $n=6$; * $p<0,001$.

blieb, wurde zu den späteren Zeitpunkten ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung um das 1,3- (nach 90 min) bzw. 2,5-fache (nach 120 min) im Vergleich zum Ausgangswert beobachtet.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass der Verlust der Zellverankerung in KEZ nicht ausschließlich pro-apoptotische Effekte induziert, sondern parallel auch eine starke Aktivierung zahlreicher Überlebenspfade verursacht.

4.5.2 Der Verlust der Zellverankerung führt zur verstärkten Sekretion von Wachstumsfaktoren

In Abschnitt 4.5.1 wurde in S-KEZ unter anderem eine Aktivierung des EGF-Rezeptors nachgewiesen. Eine Ursache dafür könnte die erhöhte Sekretion von Liganden wie EGF und TGF- α sein, die an diesen Rezeptor binden und ihn dadurch aktivieren. Um dies zu überprüfen, wurden in S-KEZ-Überständen mittels ELISA die Mengen an EGF und TGF- α bestimmt. Beide Wachstumsfaktoren wurden nach Induktion von Anoikis in erhöhten Mengen sezerniert (Abbildung 4.26). Die Freisetzung großer Mengen an TGF- α aus S-KEZ erfolgte dabei bereits direkt nach Verlust der Zellverankerung, so dass die TGF- α -Konzentration im Medium schon nach 30 min Suspensionskultur um das 40-fache angestiegen war und nach 120 min den 150-fachen Wert der Ausgangskonzentration erreichte (Abbildung 4.26 A). Ein signifikanter Anstieg der EGF-Sekretion konnte dagegen erst nach 90 min Suspensionskultur beobachtet werden (Abbildung 4.26 B). Die Zunahme der EGF-Konzentration um das 2,4-fache während der gesamten Inkubationsdauer war zudem deutlich geringer als der Anstieg der TGF- α -Mengen.

Durch die Induktion von Anoikis wird demzufolge eine verstärkte Freisetzung von Wachstumsfaktoren getriggert. Die beobachtete Aktivierung des EGFR in S-KEZ ist daher vermutlich auf die erhöhten Konzentrationen stimulierender Liganden im Medium zurückzuführen.

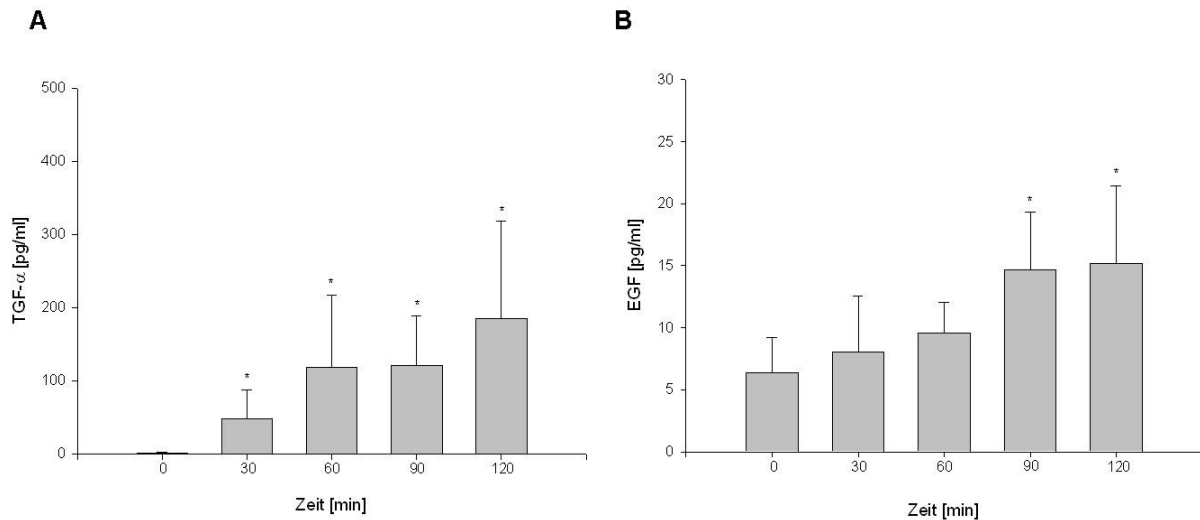


Abbildung 4.26: Der Verlust der Zellverankerung induziert die Sekretion von Wachstumsfaktoren. In S-KEZ-Zellüberständen wurde mittels ELISA der Gehalt an (A) TGF- α und (B) EGF gemessen. 90 min nach Verlust der Zellverankerung erfolgte ein starker Anstieg der EGF-Sekretion, während die Freisetzung großer Mengen TGF- α aus S-KEZ bereits direkt nach Induktion von Anoikis einsetzte. $n=6$; * $p<0,05$.

4.5.3 Die Wiederherstellung physiologischer Zell-Kontakte verhindert den Fortschritt von Anoikis

Vor kurzem wurde in IEC-18-Zellen nach Verlust der Zellverankerung ebenfalls die Aktivierung von Src sowie des Transkriptionsfaktors NF- κ B beobachtet (105; 111). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Mechanismus den Zellen als kurzzeitiger Schutz vor Anoikis dient.

Im Folgenden sollte nun nachgewiesen werden, dass auch primäre humane KEZ aufgrund der beobachteten Aktivierung bestimmter Überlebenspfade transient vor Anoikis geschützt sind. Hierzu wurde ein experimenteller Ansatz gewählt, bei dem die Zellen zunächst in Suspension inkubiert wurden, um den Verlust der Zell-Zell-Adhäsion zu induzieren. Zu bestimmten Zeitpunkten (0, 30 und 60 min) nach Verlust der Zellverankerung wurden KEZ-Aliquots entnommen und zu Pellets zentrifugiert, um physiologische Zell-Zell-Kontakte wieder herzustellen. Diese Zellpellets wurden dann je eine weitere Stunde inkubiert. Als Kontrollen wurden jeweils Zellen analysiert, die zum Zeitpunkt der Aggregation bzw. nach einer weiteren Stunde in Suspensionskultur gewonnen wurden. Die Zelllysate aller Proben wurden auf ihre Caspase-3-Aktivitäten untersucht. Durch die Rekonstitution von Zell-Zell-Kontakten

konnte der Fortschritt von Anoikis in KEZ signifikant gehemmt werden (Abbildung 4.27 A). Die Caspase-3-Aktivitäten in den Zellpellets, die nach 30 bzw. 60 min generiert wurden, waren nach der darauf folgenden einstündigen Inkubation nur leicht erhöht gegenüber dem Zeitpunkt der Aggregation, jedoch jeweils signifikant geringer als die Aktivitäten aus KEZ, welche die gleiche Zeit vollständig in Suspension inkubiert worden waren.

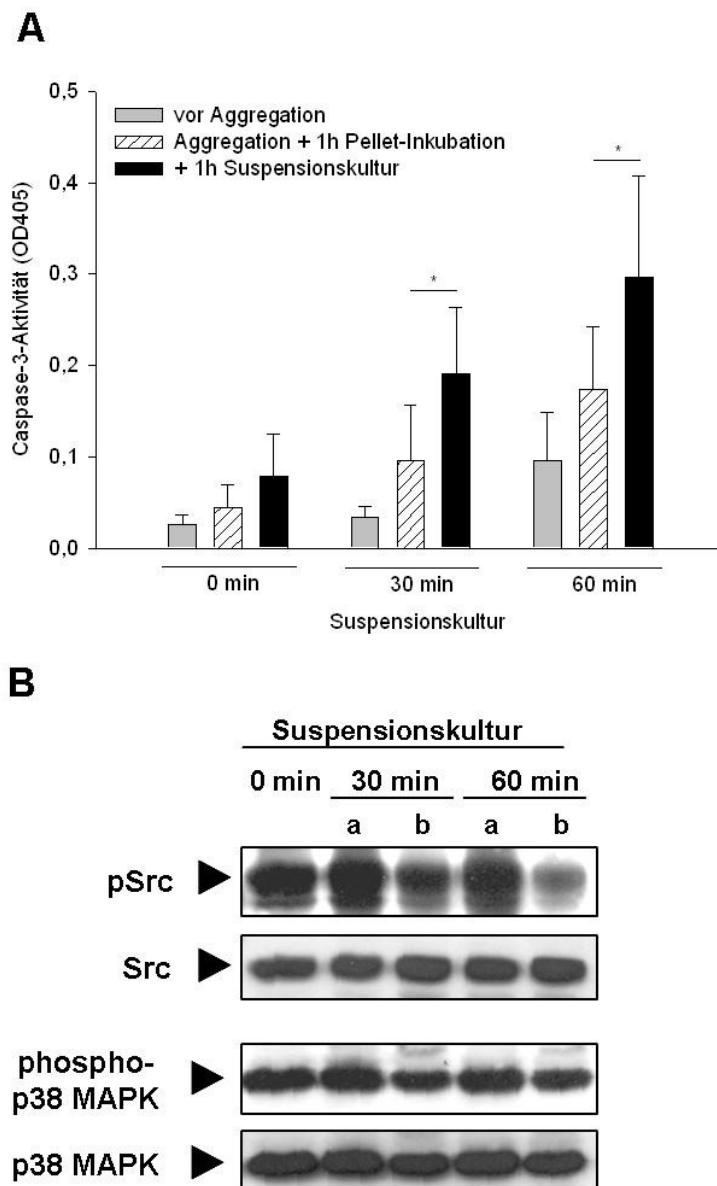


Abbildung 4.27: Die Wiederherstellung von Zell-Zell-Kontakten blockiert den Fortschritt von Anoikis. Ausgehend von einer S-KEZ-Kultur wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Aliquots zu Pellets zentrifugiert, welche dann eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert wurden. Als Kontrollen wurden KEZ zum Zeitpunkt der Aggregation sowie nach einer weiteren Stunde in S-KEZ-Kultur untersucht. (A) Durch Wiederherstellung von Zell-Zell-Kontakten wurde der Fortschritt von Anoikis effektiv blockiert. $n=9$; $*p<0,05$. (B) Nach Rekonstitution von Zell-Zell-Kontakten kam es darüber hinaus zu einem Rückgang der Phosphorylierung von Src und p38 MAPK. a: vor Aggregation; b: nach Aggregation und 1h Pelletinkubation.

Zudem wurde untersucht, ob die Rekonstitution der Zell-Zell-Kontakte die in Abschnitt 4.5.1 beobachtete Aktivierung von Überlebenspfaden beeinflusst. Hierzu wurden in den gewonnenen Zellextrakten die Phosphorylierung von Src und p38 MAPK anhand von Western Blots ermittelt. Nach Wiederherstellung der Zell-Zell-Kontakte kam es zu einer deutlichen Abnahme der Mengen an pSrc und p-p38 MAPK (Abbildung 4.27 B). Im Vergleich waren die in Abbildung 4.27 B beobachteten Phosphorylierungszustände nach Rekonstitution der Zell-Zell-Kontakte auch jeweils deutlich geringer als in S-KEZ zu analogen Zeitpunkten (90 und 120 min) (Abbildung 4.24).

Innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls nach Induktion von Anoikis kann demnach durch die Wiederherstellung physiologischer Zell-Zell-Kontakte die Hyperaktivierung von Signalmolekülen rückgängig gemacht werden. Darüber hinaus ist es innerhalb dieses Zeitraums möglich, den Fortschritt der apoptotische Kaskade zu blockieren.

4.5.4 Die Inhibition von Src hebt den Anoikis-blockierenden Effekt von Zell-Zell-Kontakten auf und beschleunigt Apoptose

Um aufzuklären, in welchem Maß die Hyperaktivierung von Kinasen zum transienten Überleben in S-KEZ beiträgt, wurde ein analoger Versuchsansatz wie in Abschnitt 4.5.3 gewählt. Der Suspensionskultur wurde jedoch der Src-spezifische Inhibitor PP1 zugefügt, um Src-abhängige Signale zu blockieren und damit den Effekt von hyperaktiviertem Src zu neutralisieren. Durch die Hemmung der Src-Kinaseaktivität wurde das Apoptoseverhalten der Zellen stark beeinflusst (Abbildung 4.28): Die Inkubation mit PP1 führte zu deutlich gesteigerten Apoptoseraten in S-KEZ (Abbildung 4.28) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 4.27), so dass die Caspase-3-Aktivität in Gegenwart des Inhibitors nach 60 min Suspensionskultur 45% höher war als in den Zellen, die ohne PP1 inkubiert worden waren. Darüber hinaus wurde der Anoikis-blockierende Effekt rekonstituierter Zell-Zell-Kontakte durch die Inhibition von Src vollständig aufgehoben: In Gegenwart von PP1 konnte durch die Zellaggregation keine Blockierung des Fortschritts der KEZ-Apoptose mehr erreicht werden. Während die Rekonstitution von Zell-Zell-Kontakten in Abwesenheit des Src-Inhibitors zu signifikant geringeren Caspase-3-Aktivitäten führte als in den S-KEZ-Kontrollen (Abbildung 4.27), waren die nach der Pelletinkubation ermittelten

Caspase-3-Aktivitäten in Anwesenheit von PP1 ebenso hoch wie in den Zellen, die die gleiche Zeit in Suspension inkubiert worden waren (Abbildung 4.28). Die Hemmung Src-abhängiger Signale bewirkt somit eine Beschleunigung der KEZ-Apoptose und verhindert zudem die Zell-Zell-Kontakt-vermittelte Blockierung der apoptotischen Kaskade. Die Hyperaktivierung von Src scheint daher in KEZ stark zum transienten Anoikisschutz unmittelbar nach Verlust der Zellverankerung beizutragen.

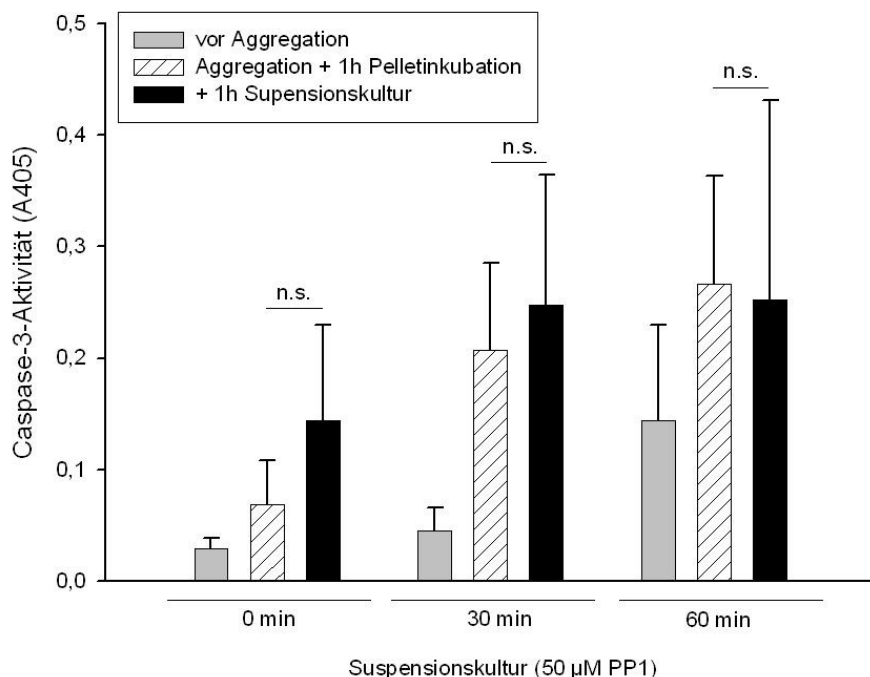


Abbildung 4.28: Die Inhibition von Src wirkt dem protektiven Effekt rekonstituierter Zell-Zell-Kontakte entgegen. KEZ wurden als Suspensionskultur in Gegenwart des Src-spezifischen Inhibitors PP1 (50 μ M) inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquots zu Pellets zentrifugiert, welche dann eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert wurden. Als Kontrollen wurden KEZ zum Zeitpunkt der Aggregation sowie nach einer weiteren Stunde in S-KEZ-Kultur untersucht. In Gegenwart des Src-Inhibitors war eine Blockierung des Fortschritts von Anoikis durch Wiederherstellung von Zell-Zell-Kontakten nicht mehr möglich. $n=4$.

5 Diskussion

5.1 Zell-Zell-Kontakte als Überlebensfaktor für primäre humane Kolonepithelzellen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass neben der in den letzten Jahren gut charakterisierten Zell-Matrix-Verankerung auch die Zell-Zell-Kontakte für das Überleben primärer humaner KEZ von entscheidender Bedeutung sind. Es wurde nachgewiesen, dass in Abwesenheit von Zell-Matrix-Kontakten durch die alleinige Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Adhäsion zwischen KEZ die Induktion von Anoikis vollständig blockiert werden kann.

Dass die Zellverankerung einen Überlebensfaktor für adhärente Zellen darstellt, wurde erstmals von Frisch *et al.* (34; 122) gezeigt. Es folgten zahlreiche Studien, bei denen Anoikis in einer Vielzahl von Zelltypen beobachtet wurde. Die meisten dieser Untersuchungen konzentrierten sich dabei auf die Charakterisierung der Überlebenssignalfade, die über die Zell-Matrix-Verankerung vermittelt werden. Dennoch deuten auch einige Daten aus murinen Epithelzellen und humanen Plattenepithelkarzinomzellen darauf hin, dass Zell-Zell-Kontakte in der Lage sind, unabhängig von Zell-Matrix-Kontakten Apoptose zu verhindern (38; 123; 124). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nun auch erstmals an primären humanen KEZ nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung des Apoptoseverhaltens nach Verlust der Zellverankerung gibt es zahlreiche Modelle. Üblicherweise werden nicht-transformierte, immortalisierte Zelllinien wie IEC-18 (105; 121) und MDCK (34; 88) oder Karzinomzelllinien (93; 104) verwendet, während es nur wenige Studien an primären Zellen gibt (36; 51; 55; 125). In den üblichen Modellen intestinaler Epithelzellen wie IEC-18 wird Apoptose allerdings erst einige Stunden nach Verlust der Zellverankerung detektiert (76), während Kolonkarzinomzelllinien (z.B. Caco-2 oder HT-29) nach Verankerungsverlust überhaupt keine Apoptose zeigen, wenn der Verankerungsverlust nicht mit einer Serumdepletion gekoppelt ist (126). Primäre humane KEZ unterliegen dagegen

innerhalb von drei Stunden nach Verlust der Zellverankerung zu über 95% der Apoptose (127). Die Exekution von Anoikis wurde bisher in keiner anderen humanen Primärzelllinie in einer derartigen Schnelligkeit beschrieben. Eine ähnlich frühe Aktivierung der apoptotischen Kaskade wurde nur in primären intestinalen Epithelzellen der Maus beobachtet (125). Diese Daten stimmen mit der schnellen Erneuerung des intestinalen Epithels *in vivo* überein. Um primäre humane KEZ zu kultivieren ist es deshalb nötig, die KEZ-Krypten unmittelbar nach ihrer Isolation in einer mit Kollagen beschichteten Kulturschale auszusäen, um die Induktion von Anoikis durch eine rasche Wiederherstellung von Zell-Matrix-Kontakten zu blockieren (113; 114).

Die Untersuchung der Bedeutung von Zell-Zell-Kontakten für das Überleben primärer humaner KEZ erwies sich als experimentell schwieriger als die bisher publizierten Methoden zur Charakterisierung der Zell-Matrix-Verankerung, da humane KEZ-Krypten sehr schnell in Einzelzellen zerfallen, so dass die innerhalb der Krypten bestehenden Zell-Zell-Kontakte bereits kurze Zeit nach der Isolation verloren gehen. Da das Apoptoseverhalten der KEZ *in Abwesenheit von Zell-Matrix-Effekten* untersucht werden sollte, war es nicht möglich, die frisch isolierten KEZ-Krypten in Kollagen-beschichteten Kulturschalen auszusäen, wie dies für andere Modelle beschrieben wurde (113; 114). Daher war die Entwicklung eines neuen experimentellen Ansatzes nötig, mit Hilfe dessen es möglich ist, den Zell-Zell-Kontakt zwischen KEZ über mehrere Stunden aufrecht zu erhalten, ohne dass die Zellen Bindungen zu Bestandteilen der extrazellulären Matrix ausbilden können. Dies wurde durch die vorsichtige Zentrifugation der Krypten zu Zellaggregaten/Pellets erreicht. Die Stabilisierung der Zell-Zell-Kontakte innerhalb der Krypten erfolgte somit auf rein mechanische Weise. Ein ähnliches Modell wurde vor kurzem von Maldonado *et al.* gewählt, um die Wechselwirkungen zwischen Lymphozyten und dendritischen Zellen zu untersuchen (128). Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen von P-KEZ konnte bestätigt werden, dass die Zell-Zell-Kontakte unter den gewählten experimentellen Bedingungen intakt bleiben. Darüber hinaus zeigten immunhistochemische Färbungen, dass die Krypten durch den Isolationsprozess vollständig von Bestandteilen der extrazellulären Matrix abgelöst wurden.

Erfolgte eine Inkubation der isolierten Krypten in Suspensionskultur, kam es zu einem raschen Zerfall in Einzelzellen und dem damit verbundenen Verlust der Zell-

Zell-Kontakte. Die S-KEZ wiesen dann alle charakteristischen Merkmale apoptotischer Zellen auf. So wurde ein Schrumpfen der Zellen, die Ausbildung von *apoptotic bodies*, die Kondensation des Chromatins sowie die Fragmentierung der DNA beobachtet. Zudem fand die für KEZ charakteristische hierarchische Prozessierung (53) der Initiatorcaspasen-2, -9 und -8 sowie der Effektorcaspasen-7 und -3 statt.

Wurden dagegen die Zell-Zell-Kontakte zwischen KEZ aufrechterhalten, konnte weder morphologisch noch auf molekularer Ebene Apoptose nachgewiesen werden: So blieben in P-KEZ Anzeichen auf Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung sowie die Bildung von *apoptotic bodies* aus und auch die Zellmorphologie blieb erhalten. Ferner wurde durch die Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte die charakteristische hierarchische Aktivierung von Caspasen (53) nahezu vollständig blockiert. Während in S-KEZ nach einer Stunde Suspensionskultur zunehmende Mengen prozessierter Effektorcaspasen nachweisbar waren, blieb eine Aktivierung der Caspasen-7 und -3 in P-KEZ vollständig aus und auch die Prozessierung von Initiatorcaspasen – ein früher Prozess im Verlauf der KEZ-Anoikis – war in P-KEZ bereits blockiert. Die Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte bewirkt somit die Inhibition der Aktivierung der apoptotischen Kaskade *upstream* der Aktivierung von Initiatorcaspasen.

An dieser Stelle war es wichtig, zu überprüfen, ob es durch die Aggregation und die anschließende Inkubation der Zellpellets zur Induktion einer anderen Zelltodform kommt. Zwar gab es aufgrund der elektronenmikroskopischen Aufnahmen keinerlei Hinweise auf ein nekrotisches Absterben der Zellen, dennoch sollte dies funktionell bestätigt werden. Aus diesem Grund wurde getestet, ob die Induktion von Anoikis auch nach einer zweistündigen Pelletinkubation noch möglich war. Die Induktion des Zell-Zell-Kontakt-Verlusts durch Resuspendieren der P-KEZ und anschließende Suspensionskultur führte in PS-KEZ zu einer ähnlich starken Caspase-3-Aktivierung wie in frisch isolierten Zellen. Dagegen kam es durch eine längere Inkubation von P-KEZ (drei und vier Stunden) zu keiner signifikanten Steigerung der Caspase-3-Aktivität. KEZ unterliegen demnach erst dann der Anoikis, wenn neben der Zell-Matrix-Verankerung auch der Zell-Zell-Kontakt verloren geht. Diese Daten zeigen damit nicht nur, dass die Zellaggregation in KEZ zu keiner nicht-apoptotischen Form des Zelltods führt, sondern unterstreichen darüber hinaus die essentielle Bedeutung des Zell-Zell-Kontakts für das Überleben der KEZ.

5.2 Bedeutung von Adhäsionsproteinen für das Überleben von Kolonepithelzellen

Nachdem auf morphologischer und molekularer Ebene die Hemmung von Anoikis durch den Erhalt von Zell-Zell-Kontakten nachgewiesen wurde, sollten die Komponenten der Zell-Zell-Verankerung, die für diesen Effekt verantwortlich sind, genauer charakterisiert werden. Dabei galt das Interesse in erster Linie den *adherens junction*-Proteinen E-Cadherin und β -Catenin, da die Ausbildung stabiler *adherens junctions* bei der Entstehung von Zell-Zell-Kontakten das primäre Ereignis darstellt. Erst nach der Aggregation von E-Cadherin-Molekülen erfolgt die Formation und Stabilisierung anderer Zell-Zell-Kontakt-vermittelnder Strukturen wie *tight junctions*, *gap junctions* und Desmosomen (115-118).

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass Cadherine für die Kontrolle des Zellüberlebens eine wichtige Rolle spielen, indem sie intrazellulär Überlebenssignale weiterleiten (88; 129) und Zellen vor Anoikis schützen (36; 38). So zeigten Kantak und Kramer, dass Cadherin-vermittelte interzelluläre Adhäsionen einen kompensatorischen Mechanismus darstellen, welcher in oralen Plattenepithelkarzinomzellen Anoikis verhindert und ein Zell-Matrix-verankerungsunabhängiges Wachstum fördert. Ist die E-Cadherin-Expression in diesen Zellen gehemmt, kommt es in Abwesenheit von Zell-Matrix-Kontakten zur Apoptose (38). Auch primäre proximale Tubuluszellen der Maus lagern sich nach Verlust der Zell-Matrix-Verankerung zu multizellulären Aggregaten zusammen und sind dann durch einen Cadherin-abhängigen Mechanismus vor Apoptose geschützt. Wird die E-Cadherin-Bindung mittels eines inhibierenden Peptids unterbunden, führt dies zur Blockierung der Zellaggregation sowie zu einer erhöhten Apoptoserate (36). Kürzlich wurde gezeigt, dass die E-Cadherin-Bindung auch zum Überleben primärer intestinaler Epithelzellen der Maus beiträgt. Hier scheint der Verlust der E-Cadherin-vermittelten Adhäsion sogar an der Induktion von Anoikis beteiligt zu sein, da die E-Cadherin-Moleküle aus den Zell-Zell-Kontakten verschwinden, bevor es zur Aktivierung von Effektorcaspasen kommt. Darüber hinaus hatte die Modulation der E-Cadherin-Bindung in den murinen intestinalen Epithelzellen einen direkten Einfluss auf die Apoptoserate (125). Trotz dieser Fortschritte gelang bisher keiner Arbeitsgruppe der Nachweis, dass die E-Cadherin-Bindung alleine für das Überleben der jeweiligen Zellen ausreichend ist.

Um zu bestätigen, dass die E-Cadherin-Bindung auch für das Überleben primärer humaner KEZ von Bedeutung ist, wurde in zwei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen die homophile Wechselwirkung der E-Cadherin-Moleküle moduliert.

Die Gegenwart von löslichem, Fc-konjugiertem E-Cadherin in einer KEZ-Suspensionskultur führte zu einer signifikanten Abnahme der Apoptoserate. Allerdings konnte durch die alleinige Bindung von E-Cadherin keine vollständige Hemmung von Anoikis erreicht werden, wie dies in P-KEZ der Fall war. In einem analogen Experiment wurde durch Zugabe von E-Cadherin-Fc zu einer Suspensionskultur intestinaler Mausepithelzellen eine Reduktion der Apoptoserate um fast 50% erzielt, jedoch kam es auch hier zu keiner vollständigen Inhibition von Anoikis (125). In Abwesenheit von funktionellem E-Cadherin können andere interzelluläre Adhäsionsstrukturen nicht ausgebildet und stabilisiert werden (78). In P-KEZ, wo prinzipiell alle Zell-Zell-Kontakt-vermittelnden Strukturen erhalten blieben, wurde Anoikis nahezu vollständig inhibiert. Dagegen kam es in S-KEZ in Gegenwart von E-Cadherin-Fc lediglich zur Ausbildung von E-Cadherin-Bindungen, während die anderen Zell-Zell-Adhäsionen verloren gingen. Dies führte zwar zu einer Erhöhung der Überlebensrate, jedoch nicht zur vollständigen Blockierung der Apoptose. Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgende Schlussfolgerung ziehen: Intakte E-Cadherin-Bindungen spielen für das Überleben von KEZ eine wichtige Rolle und sind an der Kontrolle von Anoikis beteiligt. Dennoch ist die alleinige E-Cadherin-Wechselwirkung nicht ausreichend um die Zelle vollständig vor Anoikis zu schützen. Möglicherweise existieren also noch weitere, E-Cadherin-unabhängige Mechanismen, die die KEZ-Apoptose in Abwesenheit von Zell-Matrix-Kontakten verhindern.

Trotz allem konnte in einem umgekehrten Ansatz durch die Blockierung der E-Cadherin-Bindung keine Steigerung der Apoptoserate erzielt werden. Vielmehr wurden in Gegenwart des blockierenden Antikörpers tendenziell geringere Caspase-Aktivitäten gemessen als in den unbehandelten Zellen. Grund dafür könnte möglicherweise eine zu geringe Antikörperkonzentration sein. Bei einer zu hohen Verdünnung des Antikörpers bindet jedes Antikörpermolekül nicht nur eine monomere inaktive Form von E-Cadherin, sondern zwei Moleküle E-Cadherin und verursacht dadurch eine laterale Dimerisierung sowie das Clustern von E-Cadherin-Molekülen, wodurch es zu einer ungewollten E-Cadherin-Aktivierung kommen kann (130; 131). Bemerkenswert an den erhaltenen Daten ist jedoch, dass die Caspase-3-Aktivität in den unbehandelten Zellen vergleichbar war mit P-KEZ nach zwei Stunden

Inkubation, obwohl die Zellen in diesem Experiment vor der Aggregation vereinzelt und damit die vorhandenen E-Cadherin-Bindungen unterbrochen worden waren. Dies deutet darauf hin, dass durch die Zellaggregation nicht nur bestehende Zell-Zell-Kontakte aufrechterhalten, sondern auch interzelluläre Wechselwirkungen zwischen Einzelzellen rekonstituiert werden können.

E-Cadherin ist intrazellulär über β -Catenin mit dem Actin-Cytoskelett verbunden (78). Die Aktivierung der apoptotischen Kaskade führt unter anderem zu einer Caspase-abhängigen Spaltung von β -Catenin (119; 125), die auch in S-KEZ beobachtet wurde. Da in P-KEZ infolge der aufrecht erhaltenen Zell-Zell-Kontakte die Caspasen-Aktivierung inhibiert war, konnte dementsprechend keine Spaltung von β -Catenin beobachtet werden, so dass konstant hohe Mengen an intaktem β -Catenin für die Ausbildung von *adherens junctions* zur Verfügung standen. Darüber hinaus blieb in P-KEZ auch der Aktivierungszustand des Moleküls erhalten, während in S-KEZ eine rasche Deaktivierung beobachtet wurde. β -Catenin ist nicht nur für die strukturelle Organisation und Funktion der Cadherine von Bedeutung, sondern stellt daneben auch eine zentrale Komponente des Wnt-Signalwegs dar (132). Bei den so genannten „Wnts“ handelt es sich um sezernierte Lipid-modifizierte Signalproteine, die unterschiedliche Entwicklungsprozesse der Zelle kontrollieren und dabei sowohl Transkriptions- als auch Zelladhäsionsprozesse beeinflussen. β -Catenin wirkt innerhalb des Wnt-Signalfads als Co-Faktor der Transkription (132). Die Stabilisierung von aktivem β -Catenin durch Zellaggregation könnte daher auch die Transduktion von Wnt-abhängigen Signalen beeinflussen.

Möglicherweise tragen zum verbesserten Überleben aggregierter KEZ neben Zell-Zell-Kontakt-abhängigen Signalen auch Zelladhäsions-unabhängige Faktoren bei. Beispielsweise könnten lösliche Faktoren, die von KEZ sezerniert werden und aufgrund der großen Zelldichte im Pellet hohe lokale Konzentrationen erreichen, auto- bzw. parakrin zur Stimulation anti-apoptotischer Signalwege führen.

Vor kurzem wurde beschrieben, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als *second messenger*-Moleküle eine Kommunikation zwischen der Zell-Verankerung und dem Actin-Cytoskelett vermitteln können (133). Daher wäre denkbar, dass der mechanische Stress, dem die Zellen in Suspension ausgesetzt sind, zur vermehrten Bildung von ROS führt. Dies könnte z.B. durch die Freisetzung lysosomaler Bestandteile erfolgen, die auch bei verschiedenen anderen Apoptoseformen

beobachtet wurde (134), unter anderem bei der p53-abhängigen Apoptose (135). Die freigesetzten lysosomalen Enzyme fördern die Bildung von ROS (134), welche wiederum den apoptotischen Prozess beschleunigen (136). Durch Chelatierung von lysosomalem Eisen kann die Zelle dagegen vor durch oxidativen Stress induzierten Schäden geschützt werden (137; 138). Die Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 kann in verschiedenen adhärenz Zelltypen unter anderem durch den Verlust der Zellverankerung getriggert werden (127). Möglicherweise existiert in KEZ ein intrazellulärer Mechanismus, der durch Umwandlung mechanischer Signale in oxidativen Stress eine Anoikis-verstärkende Wirkung hat. In diesem Modell würden dann die mechanische Stabilisierung der KEZ sowie der geringere Sauerstoffpartialdruck innerhalb des Zellpellets im Vergleich zur Suspension der Verstärkung apoptotischer Stimuli durch ROS in P-KEZ entgegenwirken.

5.3 Einfluss von Zell-Zell-Kontakten auf die Regulation pro- und anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die subzelluläre Lokalisation einer Reihe von Bcl-2-Proteinen erstmals im Zusammenhang mit Anoikis primärer humaner KEZ untersucht. Die Entscheidung einer Zelle in Apoptose zu gehen oder nicht wird in erster Linie durch die Bilanz pro- und anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie beeinflusst. Durch die Regulation bestimmter Bcl-2-Proteine könnten Zell-Zell-Kontakt-vermittelte Überlebenssignale daher das Apoptoseverhalten der Zelle kontrollieren.

Die Aktivität der einzelnen Bcl-2-Proteine kann über verschiedene Mechanismen reguliert werden, unter anderem auf der Ebene der Transkription oder durch posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung, proteolytische Spaltung etc.) (17). Eine wichtige Rolle bei der Aktivierung bestimmter Mitglieder dieser Proteinfamilie spielt die intrazelluläre Translokation aus dem Cytosol in die äußere Membran der Mitochondrien. Daher wurde die subzelluläre Verteilung bestimmter Bcl-2-Proteine in S- und P-KEZ untersucht, um aufzuklären, inwiefern Zell-Zell-Kontakt-vermittelte Signale die Regulation dieser Proteine kontrollieren.

Die *BH3-only*-Proteine stellen die Sensoren zellulären Stresses dar. Auf der Ebene der *BH3-only*-Proteine konnten hinsichtlich Menge und intrazellulärer Lokalisation

keine bedeutenden Unterschiede zwischen frisch isolierten, S- und P-KEZ festgestellt werden. Die erhaltenen Ergebnisse zur zellulären Lokalisation sind ähnlich den Beobachtungen, die in Brustepithelzellen gemacht wurden (139). Bid war in S-KEZ nach 120 min nur noch in geringen Mengen nachweisbar. Im Western Blot der Gesamtzelllysate wurde zum gleichen Zeitpunkt ein zusätzliches Signal von etwa 15 kDa detektiert. Dies entspricht der trunkierten Form des Proteins (tBid), die durch eine Caspase-8-abhängige Prozessierung entsteht (140). Da Caspase-8 nach 120 min Suspensionskultur vollständig aktiviert ist, scheint der Abbau von Bid eine Folge der Caspase-8-Aktivität zu sein. Die bereits im Western Blot beobachtete und im Vergleich zu den anderen Caspasen verzögerte Aktivierung von Caspase-8 wurde damit anhand der proteolytischen Spaltung von Bid noch einmal funktionell bestätigt.

Bereits direkt nach der Isolation waren Bid und das pro-apoptotische Multidomänenprotein Bax fast ausschließlich in den Mitochondrien zu finden, obwohl diese beiden Proteine in normalen, nicht-apoptotischen Zellen eigentlich hauptsächlich im Cytosol lokalisiert sind und erst nach Eintreffen eines apoptotischen Stimulus in die Mitochondrien wandern. Die Translokation von Bid und Bax wird jedoch durch den Verlust FAK-abhängiger Signale getriggert und erfolgt dann sehr schnell innerhalb von 10 – 15 min (139; 141). Möglicherweise war der Isolationsprozess der KEZ als Trigger für die Translokation von Bid und Bax ausreichend, so dass bereits in den frisch isolierten Zellen relativ hohe mitochondriale Mengen beider Proteine beobachtet wurden. In P-KEZ erfolgt zudem eine rasche Dephosphorylierung von FAK, wodurch eine Freisetzung von Bax ins Cytosol, wie sie in Brustepithelzellen nach Wiederherstellung von Zell-Matrix-Kontakten beobachtet wurde (142), vermutlich verhindert wird. Für die Redistribution von Bax reichen die Zell-Zell-Kontakt-vermittelten Signale alleine somit nicht aus.

Die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran kann nur in Anwesenheit der pro-apoptotischen Multidomänenproteine Bax und Bak erfolgen (17; 18). In Gegenwart von Überlebenssignalen wird ihre porenbildende Fähigkeit durch Bindung an anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2 und Bcl-xL antagonisiert (143). Das Mengenverhältnis pro- und anti-apoptotischer Faktoren in den Mitochondrien ist daher von entscheidender Bedeutung für das Schicksal einer Zelle. Durch ein hohes Bcl-2/Bax-Verhältnis wird demzufolge das Überleben von Zellen begünstigt (144) und eine Bcl-2-Überexpression bietet einen effektiven Schutz vor Anoikis (34). Die Transformation von IEC-18-Zellen mit onkogenem Ras-Protein führt nach Induktion

von Anoikis zu einer Hemmung der Bak-Expression; dieser Mechanismus trägt zur Anoikis-Resistenz dieser Zellen bei (145). Die Abnahme des Bcl-2/Bax-Verhältnisses korreliert dagegen mit einer erhöhten Apoptoserate (93). Dies ist auch im Verlauf der Anoikis bei KEZ der Fall: In S-KEZ nimmt das Verhältnis (Bcl-2, Bcl-xL)/(Bax, Bak) aufgrund (1) der Freisetzung von Bcl-2 aus den Mitochondrien ins Cytosol, (2) der leichten Abnahme der mitochondrialen Anteile von Bcl-xL, (3) des konstant hohen Levels an Bax sowie (4) der erhöhten Mengen an Bak stark ab. Dadurch überwiegen die pro-apoptotischen Faktoren und es kommt letztendlich zur Freisetzung von Cytochrom c ins Cytosol (127). In P-KEZ bleiben dagegen die mitochondrialen Mengen an Bcl-2, Bcl-xL, Bax und Bak und damit auch das Verhältnis anti-/pro-apoptotischer Faktoren konstant im Vergleich zum Zeitpunkt der Isolation. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Zell-Zell-Kontakt-vermittelte Überlebenssignale die Freisetzung von Bcl-2 aus sowie die Anreicherung von Bak in den Mitochondrien verhindern und damit die Level anti- und pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine in einem ausgewogenen Verhältnis halten.

Wie das Zusammenspiel der Bcl-2-Proteine innerhalb der äußeren Mitochondrienmembran genau funktioniert, ist im Einzelnen noch nicht geklärt (18). Die Aktivierung pro-apoptotischer Proteine bzw. die Deaktivierung anti-apoptotischer Proteine erfolgt vermutlich über *BH3-only*-Proteine. Zwar waren hinsichtlich der Menge und Lokalisation der untersuchten Vertreter keine Unterschiede zwischen S- und P-KEZ feststellbar; möglicherweise resultiert die Verschiebung des Proteinverhältnisses aber durch veränderte Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Mitgliedern der Bcl-2-Familie.

5.4 Signaltransduktion in P-KEZ

Um aufzuklären, über welchen Signalweg der anti-apoptotische Effekt der aufrecht erhaltenen Zell-Zell-Kontakte vermittelt wird, wurden eine Reihe von Überlebenspfaden untersucht, die in Epithelzellen von Bedeutung sind.

Die Analyse des Aktivierungszustands verschiedener Kinasen in P-KEZ ergab eine konstant hohe Phosphorylierung von Akt und p38 MAPK, eine transiente Aktivierung von EGFR und Erk1/2, eine leicht reduzierte, aber deutlich nachweisbare Src-Phosphorylierung sowie eine kontinuierliche Dephosphorylierung von JNK und FAK.

FAK wird nach Induktion von KEZ-Anoikis durch die sequentielle proteolytische Aktivität von Caspase-3 und Caspase-6 koordiniert gespalten (54). In P-KEZ wurde die Aktivierung von Caspase-3 durch die aufrecht erhaltenen Zell-Zell-Kontakte blockiert. Dementsprechend war in P-KEZ auch die Proteolyse von FAK gehemmt, während es in S-KEZ nach etwa einer Stunde Suspensionskultur zur Spaltung des Moleküls kam. Die beobachtete Abnahme der FAK-Phosphorylierung in S-KEZ nach 60 min ist daher nicht auf eine aktive Dephosphorylierung zurückzuführen, sondern eine Folge der proteolytischen Spaltung des nativen Proteins. Im Gegensatz dazu wurde in P-KEZ direkt nach der Zellaggregation eine rasche Abnahme des Phosphorylierungssignals beobachtet. Da in P-KEZ jedoch nur eine minimale Prozessierung von FAK nach 90 bis 120 min erfolgte, kann die proteolytische Spaltung von FAK als Ursache für die verminderte Phosphorylierung des Moleküls 20 min nach Aggregation ausgeschlossen werden. Folglich stellt die Dephosphorylierung von FAK in P-KEZ einen aktiven Prozess dar. Dessen Induktion kann allerdings nicht der Verlust der FAK-stimulierenden Integrinbindung an die extrazelluläre Matrix sein, da diese in S-KEZ ebenso wenig vorhanden war wie in P-KEZ und die FAK-Phosphorylierung in S-KEZ wesentlich länger stabil blieb. Es scheint demnach eine negative Kreuzregulation zwischen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakt-vermittelten Signalen zu existieren. Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass FAK nicht aktiv an der Transduktion von Überlebenssignalen via Zell-Zell-Kontakte beteiligt ist und offensichtlich andere Signalfade den Verlust der FAK-abhängigen Signale in P-KEZ kompensieren.

Eine solche Funktion könnte der PI-3K/Akt-Signalweg erfüllen, da an diesem Punkt des intrazellulären Signalnetzwerks viele Pfade zusammenlaufen und unter anderem auch FAK-abhängige Signale weitergeleitet werden (68-70). Darüber hinaus scheint dieser Überlebenspfad sehr stark mit Zell-Zell-Kontakt-vermittelten Signalen assoziiert zu sein: Der Verlust der Zell-Matrix-Verankerung induziert in murinen proximalen Tubuluszellen die Aggregation der Zellen, wodurch PI3-K aktiviert wird und die Zellen vor Anoikis geschützt werden. Die spezifische Hemmung PI3-K-abhängiger Signale blockiert dagegen den Überlebensseffekt der Zellaggregation (36). In Caco-2-Zellen, einer Kolonkarzinomzelllinie, ist die Aktivierung von PI3-K von entscheidender Bedeutung für die Integrität der *adherens junctions* und deren Assoziation mit dem Actin-Cytoskelett, da in diesen Zellen durch die Ausbildung von *adherens junctions* zwischen benachbarten Zellen eine PI3-K-abhängige Aktivierung

von Akt induziert wird (86). Darüber hinaus konnten Pece *et al.* (88) die physikalische Assoziation von PI3-K und dem *adherens junctions*-Proteinkomplex nachweisen. Diese Verknüpfung ermöglicht der Zelle eine *outside-in*-Signaltransduktion von *adherens junctions* über PI3-K und Akt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen ähnliche Schlussfolgerungen für KEZ zu. Der Verlust der Zellverankerung führte in S-KEZ zu einem starken Rückgang der Akt-Phosphorylierung, während der Aktivierungszustand dieses Moleküls bei aufrecht erhaltenen Zell-Zell-Kontakten stabil blieb. Zusammen stützen diese Ergebnisse die Beobachtung dieser Arbeit, dass durch die Aufrechterhaltung von KEZ-Zell-Zell-Kontakten PI3-K/Akt-abhängige Signale getriggert werden.

Ein weiterer Signalweg, der häufig mit Zellüberleben assoziiert ist, ist der Ras-MEK-MAPK-Pfad: In immortalisierten Granulosazellen führt die Auflösung Calcium-abhängiger Zell-Kontakte zu einer erhöhten Apoptoserate sowie zur Deaktivierung von Akt und MEK (146). Die Expression von onkogenem Ras-Protein in der Rattenepithelzelllinie IEC-18 schützt die Zellen in PI3-K-unabhängiger aber MAPK-abhängiger Weise vor Anoikis (97). Darüber hinaus könnten EGFR-abhängige Überlebenssignale eine Rolle spielen: Die E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion zwischen Plattenepithelkarzinomzellen führt zur spezifischen Aktivierung des EGFR sowie einer *downstream* Aktivierung des Erk/MAPK-Signalwegs. In Abwesenheit von Zell-Matrix-Kontakten dient dieser Mechanismus den Zellen als kompensatorisches Überlebenssignal (93). Erst kürzlich wurde die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Src als potentiell Schlüssel-molekül des E-Cadherin/PI3-K-Signalwegs identifiziert (106). Die anti-apoptotische Aktivität dieser Kinase spielt zudem eine entscheidende Rolle für das Überleben von Kolonkarzinomzellen, wenn diese keine Kontakte zur extrazellulären Matrix ausbilden können (104; 105). Übereinstimmend mit diesen vorhergehenden Beobachtungen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der aktivierte Zustand der Signalmoleküle EGFR, Erk1/2 und Src in KEZ erhalten bleibt, solange die Zellen intakte Zell-Zell-Kontakte ausbilden können.

Zur Identifizierung der aktiv an der Zell-Zell-Kontakt-vermittelten anti-apoptotischen Signaltransduktion beteiligten Überlebenspfade wurden spezifische pharmakologische Inhibitoren eingesetzt. Durch die spezifische Hemmung der einzelnen Signalfade wurde das Apoptoseverhalten von P-KEZ in unterschiedlichem Maß beeinflusst. Bemerkenswert ist, dass bei den durchgeführten Inhibitor-experimenten allein aufgrund der zeitlich verzögerten Zellaggregation die Caspase-3-Aktivität selbst

in den unbehandelten Zellen um das Vierfache anstieg. Diese Zunahme wird vermutlich durch den schnellen Zerfall der KEZ-Krypten verursacht und trägt daher in bestimmtem Maß zur Verfälschung funktioneller Differenzen zwischen Inhibitor-behandelten und -unbehandelten Zellen bei. Trotz dieser Einschränkung zeigen die Inhibitorexperimente klar, dass MEK/Erk-abhängige Signale für das Zell-Zell-Kontakt-vermittelte Überleben keine Rolle spielen. Im Gegensatz dazu tragen sowohl EGFR als auch PI3-K zur anti-apoptotischen Signaltransduktion in P-KEZ bei, da die Gegenwart der Inhibitoren Tyrphostin AG1478 und LY294002 den anti-apoptotischen Effekt der KEZ-Aggregation jeweils dosisabhängig reduzierte. Dennoch waren die gesteigerten Caspase-3-Aktivitäten in Gegenwart des EGFR-Inhibitors nicht signifikant höher als in den unbehandelten Kontrollen und nach Inkubation mit dem PI3-K-Inhibitor immer noch signifikant geringer als in den nicht-aggregierten Kontrollen. Dies deutet darauf hin, dass neben EGFR und PI3-K noch weitere Signalpfade an der Vermittlung des Zell-Zell-Kontakt-abhängigen anti-apoptotischen Effekts beteiligt sind.

Die Hemmung Src-abhängiger Signale hatte den stärksten Effekt auf das Überleben von P-KEZ. Auch hier wurde ein dosisabhängiger Anstieg der Apoptoserate beobachtet; im Gegensatz zur Inhibition von EGFR und PI3-K waren die Caspase-3-Aktivitäten nach Inhibition von Src jedoch im Vergleich zu den unbehandelten Zellen stark erhöht und lagen im Bereich der nicht-aggregierten Kontrollen. Dies zeigt, dass Src ein wichtiger Vermittler des Zell-Zell-Kontakt-abhängigen Überlebens von KEZ ist. Es ist bekannt, dass Src in *adherens junctions* zwischen Epithelzellen akkumuliert (147). Pang *et al.* charakterisierten Src als ein Schlüsselmolekül des E-Cadherin/PI3-K-Signalwegs (106). Auch die Daten der vorliegenden Arbeit deuten auf einen Mechanismus hin, bei dem Zell-Zell-Kontakte via Src und PI3-K Überlebenssignale ins Zellinnere transportieren, da sowohl die Hemmung von Src als auch von PI3-K den protektiven Effekt der KEZ-Aggregation neutralisierte. Die Tatsache, dass die Blockierung von Src zu einer stärkeren Apoptoseinduktion führte als die Hemmung von PI3-K deutet darauf hin, dass im Zusammenhang mit Zell-Zell-Kontakt-getriggelter Signaltransduktion PI3-K nicht das einzige *downstream*-Effektormolekül ist, welches von Src aktiviert wird. Möglicherweise tragen also noch weitere Src-abhängige Signale zum Überleben von P-KEZ bei. Solange adhärenzte Zellen Kontakte zur extrazellulären Matrix ausbilden, liegt Src außerdem mit FAK assoziiert vor (148). Der Verlust der Zell-Matrix-Verankerung und die damit verbundene FAK-

Dephosphorylierung führen zur Auflösung der Src/FAK-Komplexe (104). Die beobachtete Abnahme der Src-Phosphorylierung in P-KEZ könnte daher den Anteil der verlorenen FAK-Signale auf die Aktivierung von Src widerspiegeln. Somit scheint Src ein Schlüsselmolekül des Zell-Adhäsions-vermittelten Überlebens zu sein, welches Signale koordiniert, die von Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakten stammen. Die Ergebnisse zur Signaltransduktion in P-KEZ sind in Abbildung 5.1 zusammengefasst.

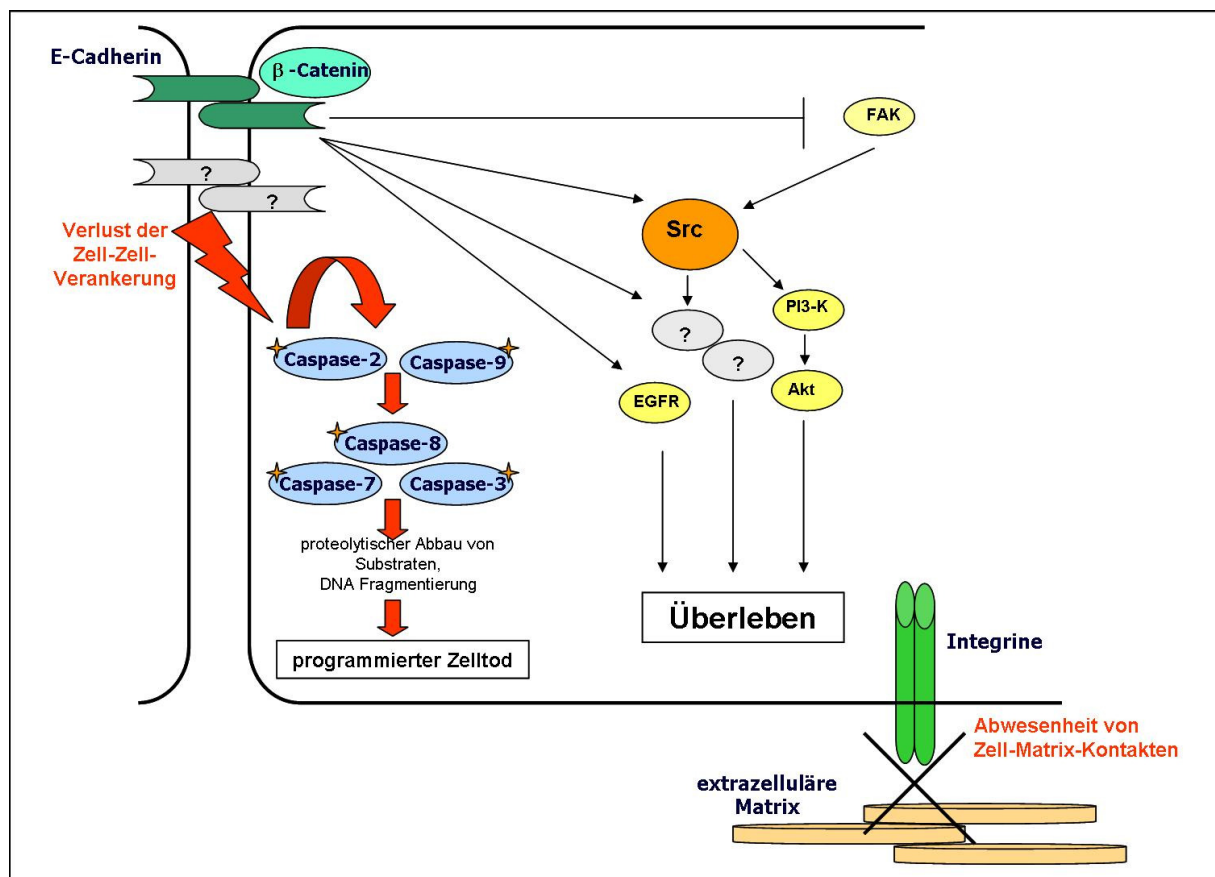


Abbildung 5.1: Zell-Zell-Kontakt-vermitteltes Überleben und Anoikis in P-KEZ. Zell-Zell-Kontakt-vermittelte Überlebenssignale sind in der Lage, den Verlust der Zell-Matrix-Verankerung zu kompensieren. Durch die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten zwischen KEZ bleibt der Aktivierungsstatus von Src, PI3-K, Akt, EGFR und β-Catenin erhalten. Dagegen kommt es zur Deaktivierung von FAK, die sich downstream auch auf den Phosphorylierungszustand von Src auswirkt. Nur wenn zusätzlich zur Zell-Matrix-Adhäsion auch die Zell-Zell-Verankerung verloren geht, erfolgt eine schnelle Induktion von Anoikis.

5.5 Induktion von Überlebenspfaden als transienter Schutzmechanismus vor Anoikis

Während der Verlust der Zellverankerung in normalen Epithelzellen zu einer schnellen Induktion von Apoptose führt, sind Karzinomzellen (Krebszellen mit epithelialeem Ursprung) weitgehend anoikisresistent. Die damit verbundene Überwindung der Verankerungsabhängigkeit stellt daher einen wichtigen Schritt der malignen Transformation dar. Eine Reihe von Daten belegen, dass die Anoikisresistenz eine essentielle Voraussetzung für die Tumorprogression darstellt: (1) Tumorzellen sind anoikisresistent und können im Gegensatz zu nicht-malignen Zellen in Abwesenheit von Zell-Matrix-Kontakten als Zellaggregate überleben und proliferieren (149). (2) Die Transformation mit Onkogenen wie Ras (75; 76; 97; 145), β -Catenin (150) und EGFR (151) verleiht nicht-malignen Epithelzellen Anoikisresistenz. (3) Der Verlust von Onkogenen wie Ras in Karzinomzellen inhibiert dagegen *in vivo* deren Karzinogenität und Anoikisresistenz (76; 152). Die Anoikisresistenz von Karzinomzellen könnte demzufolge als neues Tumor-spezifisches therapeutisches Target genutzt werden. Jedoch sind die molekularen Mechanismen, die das Apoptoseverhalten von Epithelzellen nach Verlust der Zellverankerung kontrollieren, bisher nur unzureichend verstanden. Von ihrer Aufklärung verspricht man sich deshalb neue Erkenntnisse hinsichtlich epithelialer Homöostase und Karzinogenese (112).

Eine zentrales Thema ist in diesem Zusammenhang die Frage nach dem *point-of-no-return*, also nach dem Zustand der Zelle, der irreversibel zum Eintritt in die apoptotische Kaskade führt (153). Während man lange Zeit davon ausging, dass die Aktivierung der Caspase-Kaskade irreversibel sei (153), zeigen neuere Studien, dass durch den Verlust der Zellverankerung nicht ausschließlich pro-apoptotische, sondern auch eine Reihe von anti-apoptotischen Signalen getriggert werden und dass in erster Linie das Verhältnis dieser Signale für die Regulation des Apoptoseverhaltens verantwortlich ist (105; 111; 112; 142; 149; 154). In intestinalen Rattenepithelzellen wurde direkt nach Verlust der Zellverankerung sowohl ein transienter Anstieg der Src-Aktivität (105), als auch eine deutliche Stimulation der NF- κ B-Aktivität beobachtet, welche durch die verstärkte Expression anti-apoptotischer Moleküle einen „Anti-Anoikis-Effekt“ vermittelt (111; 112; 149). Aufgrund dieser Mechanismen sind IEC-18-Zellen transient vor Apoptose geschützt.

Im Rahmen der Untersuchung aktivierter Signalfade in S-KEZ wurde nun auch erstmals in primären humanen KEZ die Aktivierung einer Reihe von Signalmolekülen nach Verlust der Zellverankerung nachgewiesen. Neben der bereits in anderen Anoikis-Modellen beschriebenen Aktivierung von p38 MAPK (126; 155), Src (105), NF- κ B (111; 112) und der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β (156), wurde auch eine Induktion von EGFR, Erk1/2, JNK und c-Jun sowie eine erhöhte Sekretion der Wachstumsfaktoren EGF und TGF- α beobachtet.

Alle untersuchten Kinasen lagen unmittelbar nach der Isolation in phosphoryliertem Zustand vor. Inwiefern der Isolationsprozess alleine die Phosphorylierung der einzelnen Moleküle beeinflusste, konnte nicht ermittelt werden. Es ist allerdings denkbar, dass es aufgrund der mechanischen Beanspruchung der Zellen während der Isolation bereits zu einer mäßigen bis starken Aktivierung bestimmter Stress-assoziierten Signalmoleküle kam, so dass der Phosphorylierungszustand zum Zeitpunkt „Null“ nicht dem einer KEZ in der Mukosa entsprach. Dennoch führte die Inkubation in Suspensionskultur zu einer weiteren starken Aktivierung der Proteine. Auffallend ist, dass die initiale Aktivierung der untersuchten Moleküle in S-KEZ zeitlich vor der vollständigen Prozessierung von Caspase-3 stattfand. Am schnellsten erfolgte die Aktivierung von EGFR, Erk1/2 und JNK, so dass die stärksten Phosphorylierungen dieser Proteine bereits nach 60 min nachweisbar waren, jedoch danach wieder zurückgingen. Im Gegensatz dazu wurde bei Src und p38 MAPK über 120 min ein kontinuierlicher Anstieg der Phosphorylierung beobachtet. Die Kinetik der Src-Phosphorylierung in S-KEZ unterscheidet sich allerdings deutlich von entsprechenden Untersuchungen in IEC-18-Zellen nach Verlust der Zellverankerung. Während in S-KEZ über die Dauer der Inkubation eine gleichmäßige Zunahme der Phosphorylierung beobachtet wurde, fand in IEC-18-Zellen bereits 45 min nach Verankerungsverlust ein Rückgang der Aktivierung statt (105); nach vier Stunden war keine Aktivität mehr nachweisbar (121). Rosen *et al.* zeigten, dass die Src-Kinaseaktivität in IEC-18-Zellen nach Verlust der Zellverankerung durch exogenes TGF- α getriggert werden kann und die Zellen über diesen Mechanismus vor Anoikis geschützt sind (121). Da der Src-Phosphorylierungszustand in S-KEZ mit der TGF- α -Konzentration im Medium korreliert, existiert möglicherweise ein autokriner Loop, bei dem das von den Zellen sezernierte TGF- α zur Aktivierung der zelleigenen Src-Kinasen führt (Abbildung 5.2).

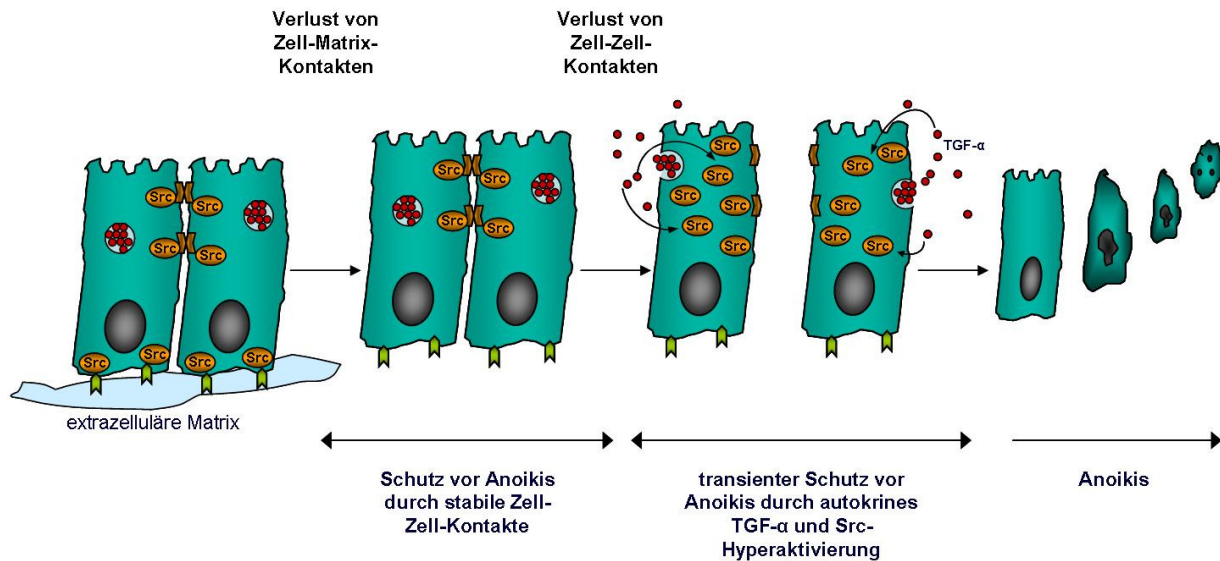


Abbildung 5.2: Bedeutung von Src für Zellkontakt-vermitteltes Überleben. Im normalen Zellverband der KEZ-Krypte vermittelt Src Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakt-abhängige Überlebenssignale. Der Verlust von Zell-Matrix-Kontakten kann durch Zell-Zell-Kontakt-vermittelte Signaltransduktion via Src vollständig kompensiert werden. In Abwesenheit von Zell-Matrix-Kontakten führt der zusätzliche Verlust der Zell-Zell-Adhäsion zu einer Hyperaktivierung von Src, die zum Teil durch autokrin wirkendes TGF- α hervorgerufen wird und zum transienten Schutz vor Anoikis beiträgt. Kommt es in einem bestimmten Zeitintervall zu keiner Rekonstitution physiologischer Zellkontakte, erfolgt der irreversible Eintritt in die Apoptose.

Die Aktivierung von p38 MAPK nach dem Verlust der Zellverankerung scheint eine pro-apoptotische Funktion zu besitzen. In humanen und murinen intestinalen Epithelzelllinien wurde nach Verlust der Zellverankerung eine vergleichbare Aktivierung von p38 MAPK beobachtet (126; 155) wie in S-KEZ und es wurde nachgewiesen, dass das Protein an der *downstream* Aktivierung von Caspasen sowie der Degradation zellulärer Strukturen beteiligt ist (126; 157). Die Rolle von JNK im Zusammenhang mit Apoptose wird hingegen kontrovers diskutiert. In MDCK- und IEC-18-Zellen wurde nach Verlust der Zellverankerung eine ähnlich starke Aktivierung von JNK beobachtet wie in S-KEZ (122; 158; 159). Frisch *et al.* (122) wiesen nach, dass die JNK-Aktivierung an der Induktion von Anoikis von MDCK-Zellen beteiligt ist, wohingegen Khwaja und Downward sowie Krestow *et al.* (158; 159) zeigten, dass die Aktivität dieser Kinase für die Induktion von Anoikis weder nötig noch ausreichend ist. Im Gegensatz dazu werden den Aktivitäten von EGFR, Erk1/2, NF- κ B und Src ausschließlich überlebensfördernde Eigenschaften zugeschrieben. Die schnelle Aktivierung von NF- κ B und Src scheint sogar eine

entscheidende Rolle für das transiente Überleben von IEC-18-Zellen direkt nach Verankerungsverlust zu spielen, da durch die Hemmung beider Moleküle die Apoptose nach Verankerungsverlust jeweils stark beschleunigt wird (105; 111). Die alleinige Inhibition der Src-Kinaseaktivität war in S-KEZ ebenfalls mit einer Neutralisation des transienten Anoikisschutzes verbunden. Die Inkubation mit PP1 führte bereits nach einer Stunde zu verstärkten Apoptoseraten in S-KEZ im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die vorliegende Arbeit zeigt darüber hinaus, dass aufgrund der transienten Aktivierung bestimmter Überlebenspfade auch primäre humane KEZ unmittelbar nach Verlust der Zellverankerung für einen kurzen Zeitraum vor Anoikis geschützt sind. Innerhalb dieses Intervalls kann durch die Wiederherstellung physiologischer Zellkontakte der Fortschritt der KEZ-Apoptose blockiert und darüber hinaus die Hyperphosphorylierung bestimmter Kinasen rückgängig gemacht werden. Die Hemmung Src-abhängiger Signale wirkte auch diesem Effekt entgegen, so dass in Gegenwart des Src-Inhibitors die Rekonstitution von Zell-Zell-Kontakten keinen Einfluss mehr auf den Fortschritt der Apoptose hatte. Diese Beobachtung kann durch zwei denkbare Mechanismen erklärt werden: (1) Durch die Hemmung der Src-Kinaseaktivität wird die Hyperaktivierung des Moleküls verhindert bzw. deren Effekte auf das Zellüberleben außer Kraft gesetzt. Fehlende bzw. verminderte Src-Aktivität ist assoziiert mit erhöhten Apoptoseraten (104; 121) und auch in S-KEZ wird die Apoptose durch den Src-Inhibitor beschleunigt. In Gegenwart von PP1 könnte der apoptotische Prozess in S-KEZ folglich bereits so weit fortgeschritten sein, dass der „*point-of-no-return*“ bereits nach 30 min überschritten ist und somit auch durch die Rekonstitution von Zellkontakten kein protektiver Effekt mehr erzielt werden kann. (2) In Abschnitt 4.4.2.4 konnte gezeigt werden, dass die Src-Aktivität für die Vermittlung Zell-Zell-Kontakt-vermittelter Überlebenssignale von entscheidender Bedeutung ist. Da diese nach Wiederherstellung von Zell-Zell-Kontakten in Gegenwart von PP1 nicht weitergeleitet werden können, schreitet die apoptotische Kaskade weiter fort. Die erhaltenen Daten sind somit ein weiterer Nachweis dafür, dass Src ein essentieller Bestandteil der Zell-Zell-Kontakt-vermittelten Signaltransduktion ist (Abbildung 5.2).

Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass die durch den Verlust der Zellverankerung induzierten anti-apoptotischen Mechanismen den Beginn des apoptotischen Prozesses verzögern. Dieser transiente Anoikisschutz erlaubt das Überleben der Zelle, sofern diese innerhalb eines kurzen Zeitraums nach Verlust der

Zellverankerung wieder Zell-Kontakte ausbilden kann (142; 154). Für bestimmte physiologische Vorgänge wie z.B. die Zytokinese sich teilender Zellen oder Wundheilungsprozesse kann dieser transiente Schutz vor Anoikis von entscheidender Bedeutung sein (105; 111). Die exakten molekularen Mechanismen, die diesen kurzzeitigen Apoptoseschutz vermitteln, sind jedoch weiterhin unklar. Ihre Aufklärung gibt möglicherweise auch Aufschluss über potentielle Kontrollpunkte der KEZ-Apoptose, mit deren Kenntnis der Anoikisresistenz kolorektaler Karzinome bereits im Vorkrebsstadium entgegen gewirkt werden kann (111).

5.6 Pathophysiologische Relevanz

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind für die Pathologie von Erkrankungen des Kolons, speziell für chronisch entzündliche Darmerkrankungen und Kolonkarzinome, von besonderer Bedeutung.

Bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) unterscheidet man im Wesentlichen zwei Formen: Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Die Ätiologie beider Erkrankungen ist noch weitgehend unklar. In der Mukosa von CED-Patienten findet man signifikant erhöhte KEZ-Apoptoseraten (160-162). Diese erhöhte Menge an *in situ*-Apoptose ist mit einem hohen Grad an *tight junction*-Abnormalitäten assoziiert (163-165). Chimäre Mäuse, deren intestinale Epithelzellen eine dominant-negative N-Cadherin-Form exprimieren, weisen einen Morbus Crohn-ähnlichen Phänotyp sowie erhöhte Apoptoseraten der Epithelzellen auf (37; 124). Obwohl bisher noch nicht nachgewiesen wurde, dass Anoikis der Grund für die gesteigerten Apoptoseraten bei CED ist, kann man dennoch spekulieren, dass die erhöhte Aktivität von Metalloproteasen bei CED (166; 167) zum Verlust der *tight junction*-Integrität und damit zur Destabilisierung der Zell-Zell-Kontakte beiträgt, wodurch die Epithelzell-apoptose verstärkt wird. Gesteigerte Apoptosefrequenzen und veränderte *tight junction*-Strukturen tragen gemeinsam zur Störung der epithelialen Barrierefunktion bei CED bei. Folglich sind Zell-Zell-Kontakt-vermittelte Überlebenssignale auch bei CED relevant. Um zu klären, ob die Apoptoserate in der CED-Mukosa durch Stabilisierung der interzellulären Kontakte zwischen Epithelzellen reduziert werden kann, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

Während Epithelzellen in der Mukosa von CED-Patienten erhöhte Apoptoseraten aufweisen, sind Karzinomzellen anoikisresistent und können daher auch nach der Ablösung von der extrazellulären Matrix überleben und *secondary sites* besiedeln. Orale Plattenepithelkarzinomzellen bilden multizelluläre Aggregate aus, in denen die Zell-Zell-Kontakte alleine eine Umgebung schaffen, die Anoikis verhindert und sogar Zellproliferation ermöglicht (93). Anoikissensitive intestinale Epithelzellen der Ratte überleben verankerungsunabhängig, wenn sie mit der Kinase TrkB transformiert werden. Die so entstehenden Anoikis-unterdrückenden Zellen bilden nach Verlust der Zell-Matrix-Verankerung ebenfalls große Sphäroid-Aggregate. Diese Beobachtungen zeigen deutlich, dass Zell-Zell-Kontakte und die von ihnen getriggerten Signalwege eine entscheidende Rolle bei der Entstehung metastasierender Tumore spielen. Ein besseres Verständnis des Zell-Zell-Kontakt-vermittelten Überlebens könnte daher die Grundlage neuer Krebstherapien darstellen.

6 Zusammenfassung

Innerhalb einer Krypte bilden primäre humane Kolonepithelzellen (KEZ) stabile Kontakte zur extrazellulären Matrix sowie zu den benachbarten Zellen aus. Der Verlust dieser Zellverankerung führt in KEZ jedoch zur schnellen Induktion einer speziellen Form von Apoptose, die als Anoikis bezeichnet wird. Während die Rolle von Zell-Matrix-Kontakten für das Überleben von KEZ in den letzten Jahren sehr gut charakterisiert wurde, war die Bedeutung der Zell-Zell-Adhäsion in diesem Zusammenhang bislang noch völlig unklar.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb der Einfluss der Zell-Zell-Verankerung auf das Apoptoseverhalten bzw. das Überleben primärer humaner KEZ untersucht werden.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Zell-Zell-Verankerung einen wichtigen Überlebensfaktor für primäre humane KEZ darstellt. Die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten innerhalb der KEZ-Krypte wurde durch Zellaggregation mittels Zentrifugation erreicht. Durch die Aggregation blieben die Zellmorphologie sowie die Zell-Zell-Kontakt-vermittelnden Strukturen der KEZ erhalten. Trotz Abwesenheit von Zell-Matrix-Kontakten wurde durch die alleinige Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Verankerung die apoptotische Kaskade vollständig blockiert, so dass es weder zur Aktivierung von Caspasen noch zur DNA-Fragmentierung kam.

Es wurde überprüft, inwieweit Proteine des *adherens junctions*-Komplexes an der Regulation von KEZ-Anoikis und -Überleben beteiligt sind. Hier zeigte sich, dass durch die Bindung von löslichem E-Cadherin die Apoptoseraten in KEZ signifikant reduziert werden können, dass die E-Cadherin-Bindung alleine jedoch nicht für eine vollständige Hemmung von Anoikis ausreichend ist. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass durch die Aufrechterhaltung von KEZ-Zell-Zell-Kontakten der proteolytische Abbau von β -Catenin sowie dessen Deaktivierung effektiv gehemmt wird.

Auf der Ebene der Bcl-2-Proteine konnte festgestellt werden, dass der vollständige Verlust der Zellverankerung zur Freisetzung von Bcl-2 aus den Mitochondrien, zu einer leichten Abnahme der mitochondrialen Mengen an Bcl-xL sowie einer starken

Anreicherung von Bak in den Mitochondrien führt. Demzufolge kommt es zu einer starken Abnahme des (Bcl-2, Bcl-xL)/(Bax, Bak)-Verhältnisses in der äußeren Mitochondrienmembran. Durch die Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte zwischen KEZ bleibt das Verhältnis anti- und pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine in den Mitochondrien dagegen unverändert.

Die Untersuchung einzelner Signalmoleküle in KEZ mit aufrecht erhaltenen Zell-Zell-Kontakten ergab unter anderem eine konstante Aktivierung von Akt, eine transient erhöhte Aktivierung von Erk1/2, eine leicht abnehmende Phosphorylierung von Src sowie eine kontinuierliche Dephosphorylierung von FAK. Durch Inhibition Src- und PI3-K-abhängiger Signale wurde der anti-apoptotische Effekt der Zellaggregation neutralisiert, während die Hemmung MEK/Erk-abhängiger Signale keine Auswirkung auf das KEZ-Überleben hatte. Dies deutet darauf hin, dass Src- und PI3-K-abhängige Signalwege an der Vermittlung des Zell-Zell-Kontakt-abhängigen Überlebens beteiligt sind, wohingegen MEK- und FAK-abhängige Signale in diesem Zusammenhang keine Rolle spielen. Darüber hinaus wurde die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Src als Schlüsselmolekül der Zellkontakt-vermittelten Signaltransduktion identifiziert.

Der vollständige Verlust der Zellverankerung führt in KEZ parallel zur Aktivierung der apoptotischen Kaskade auch zur Induktion einer Reihe von anti-apoptotischen Signalwegen. So wurde nach Verlust jeglicher Zellkontakte in KEZ eine starke Aktivierung von Kinasen und Transkriptionsfaktoren sowie eine erhöhte Sekretion von Wachstumsfaktoren beobachtet. Aufgrund dieser Mechanismen scheinen die Zellen unmittelbar nach Verankerungsverlust transient vor Anoikis geschützt zu sein und überleben, sofern innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls physiologische Zellkontakte wiederhergestellt werden.

Zusammengefasst zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass stabile Zell-Zell-Kontakte eine essentielle Rolle für das Überleben primärer humaner KEZ spielen.

7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Integrität der KEZ-Zell-Zell-Verankerung der Verlust von Zell-Matrix-Kontakten vollständig kompensiert und Anoikis effektiv blockiert werden kann. Die Zell-Zell-Adhäsion stellt somit einen wichtigen Überlebensfaktor für KEZ dar.

Durch die homophile Bindung von E-Cadherin alleine konnte Anoikis in KEZ zwar signifikant reduziert, jedoch nicht vollständig inhibiert werden. In künftigen Experimenten gilt es nun herauszufinden, ob neben E-Cadherin noch weitere Zell-Zell-Kontakt-vermittelnde Strukturen an der anti-apoptotischen Signaltransduktion in aggregierten KEZ beteiligt sind. Für weitere Untersuchungen sind dabei zunächst die Komponenten der *tight junctions* von Interesse. Außerdem soll die Rolle von Integrinen, die an der lateralen Membran lokalisiert sind, im Zusammenhang mit Zell-Zell-Kontakt-vermitteltem Überleben aufgeklärt werden.

Die Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Kinase Src ein zentrales Signalmolekül des Zell-Adhäsions-vermittelten Überlebens ist. In weiteren Schritten soll nun der genaue Signaltransduktionsweg von Zell-Zell-Kontakten über Src und PI3-K aufgeklärt werden. Darüber hinaus muss untersucht werden, ob neben PI3-K noch andere *downstream* Effektormoleküle existieren, die Zell-Zell-Kontakt-abhängig von Src aktiviert werden. Zusätzlich wäre es interessant, zu analysieren, über welche molekularen Mechanismen die Zelle Signale koordiniert, die von Kontakten zur extrazellulären Matrix und zu benachbarten Zellen vermittelt werden. In diesem Zusammenhang soll unter anderem geklärt werden, ob der Fortschritt der Apoptose innerhalb eines 60 min-Intervalls nach Induktion von Anoikis durch die Wiederherstellung physiologischer Zell-Matrix-Kontakte in ähnlicher Weise blockiert werden kann wie dies durch Rekonstitution von Zell-Zell-Kontakten möglich war. Der Einfluss Src-abhängiger Signale soll dann in einem analogen Versuchsansatz in Gegenwart des Src-Inhibitors PP1 ermittelt werden.

Die Verschiebung des Verhältnisses anti- und pro-apoptotischer Vertreter der Bcl-2-Familie in der äußeren Mitochondrienmembran ist ein entscheidender Prozess für die Induktion der apoptotischen Kaskade. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass diese Verlagerung durch aufrecht erhaltene Zell-Zell-Kontakte verhindert wird. Es muss nun aufgeklärt werden, welche molekularen Verbindungen zwischen Zell-Adhäsionsmolekülen und der Bcl-2-Familie bestehen und mit Hilfe welcher Mechanismen das mitochondriale Verhältnis anti- und pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine aufrecht erhalten werden kann.

Im Rahmen dieser Untersuchungen soll darüber hinaus auch getestet werden, inwieweit Vertreter der Proteinfamilie der *inhibitors of apoptosis proteins* (IAP) an der Regulation von KEZ-Anoikis beteiligt sind.

Die KEZ, die für diese Arbeit verwendet wurden, wurden ausschließlich aus gesunden Darmabschnitten, die nicht karzinomatös verändert oder von Divertikeln durchzogen waren, gewonnen. Weitere Untersuchungen sollen nun klären, ob der Zell-Zell-Kontakt für das Überleben von KEZ aus CED- und Tumorgewebe eine ebenso wichtige Rolle spielt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine starke Aktivierung bestimmter Überlebenspfade KEZ unmittelbar nach Verlust der Zellverankerung als transienter Schutzmechanismus vor Apoptose dient. Durch Hemmung Src-abhängiger Signale wurde dieser Effekt aufgehoben. In zukünftigen Experimenten soll nun der Anteil der einzelnen hyperaktivierten Moleküle am transienten Anoikisschutz in KEZ ermittelt werden. Hierzu sollen weitere Inhibitoren eingesetzt und deren Einfluss auf das Apoptoseverhalten von S-KEZ untersucht werden. Interessant wäre dabei unter anderem die Inhibition von NF- κ B, die Neutralisation von EGF und TGF- α mittels spezifischer Antikörper oder auch die Verwendung von „Breitspektrum-Tyrosinkinaseinhibitoren“ wie Herbimycin oder Genistein.

Nicht zuletzt kann das in der vorliegenden Arbeit entwickelte „Pellet-Modell“ als alternative Methode für KEZ-Stimulationsversuche verwendet werden. Dies hat den Vorteil, dass die Zellen sofort stimuliert werden können und nicht, wie bei dem herkömmlichen Kulturverfahren in beschichteten Zellkulturschalen erst für mehrere Stunden adhären müssen.

8 Literaturverzeichnis

1. Feldman RA, Boland CR. In: Gastroenterology and Hepatology; The Comprehensive Visual Reference. Volume 2, Colon, Rectum and Anus 1992;16.
2. Booth C, Potten CS. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. J Clin Invest 2000;105:1493-1499.
3. Caspary WF, Strater J. Darmkrankheiten; Klinik, Diagnostik und Therapie. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 1999.
4. Goke M, Podolsky DK. Regulation of the mucosal epithelial barrier. Baillieres Clin Gastroenterol 1996;10:393-405.
5. Yamada T. 1. Textbook of Gastroenterology. J B Lippincott Company, Philadelphia 1995; 2nd edition.
6. Tidball CS. The nature of the intestinal epithelial barrier. Am J Dig Dis 1971;16:745-767.
7. Hata Y, Ota S, Nagata T, Uehara Y, Terano A, Sugimoto T. Primary colonic epithelial cell culture of the rabbit producing prostaglandins. Prostaglandins 1993;45:129-141.
8. Kinugasa T, Kuroki M, Yamanaka T, Matsuo Y, Oikawa S, Nakazato H, Matsuoka Y. Non-proteolytic release of carcinoembryonic antigen from normal human colonic epithelial cells cultured in collagen gel. Int J Cancer 1994;58:102-107.
9. Vidrich A, Ravindranath R, Farsi K, Targan S. A method for the rapid establishment of normal adult mammalian colonic epithelial cell cultures. In Vitro Cell Dev Biol 1988;24:188-194.
10. Potten CS, Allen TD. Ultrastructure of cell loss in intestinal mucosa. J Ultrastruct Res 1977;60:272-277.
11. Potten CS. The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice. Cancer Metastasis Rev 1992;11:179-195.
12. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 1992;119:493-501.

13. Strater J, Koretz K, Gunthert AR, Moller P. In situ detection of enterocytic apoptosis in normal colonic mucosa and in familial adenomatous polyposis. *Gut* 1995;37:819-825.
14. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207-2216.
15. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:725-731.
16. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 1999;274:11549-11556.
17. Martin SS, Vuori K. Regulation of Bcl-2 proteins during anoikis and amorphosis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1692:145-157.
18. Reddig PJ, Juliano RL. Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24:425-439.
19. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87:171.
20. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326 (Pt 1):1-16.
21. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997;91:443-446.
22. Salvesen GS, Abrams JM. Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene* 2004;23:2774-2784.
23. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002;9:459-470.
24. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-1316.
25. Adams JM, Cory S. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:715-720.
26. Shi Y. Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* 2004;117:855-858.
27. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:17907-17911.

28. Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* 1996;380:723-726.
29. Greidinger EL, Miller DK, Yamin TT, Casciola-Rosen L, Rosen A. Sequential activation of three distinct ICE-like activities in Fas-ligated Jurkat cells. *FEBS Lett* 1996;390:299-303.
30. Grossmann J, Mohr S, Lapentina EG, Fiocchi C, Levine AD. Sequential and rapid activation of select caspases during apoptosis of normal intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 1998;274:G1117-G1124.
31. Martins LM, Kottke T, Mesner PW, Basi GS, Sinha S, Frigon N, Jr., Tatar E, Tung JS, Bryant K, Takahashi A, Svingen PA, Madden BJ, McCormick DJ, Earnshaw WC, Kaufmann SH. Activation of multiple interleukin-1beta converting enzyme homologues in cytosol and nuclei of HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:7421-7430.
32. Orth K, O'Rourke K, Salvesen GS, Dixit VM. Molecular ordering of apoptotic mammalian CED-3/ICE-like proteases. *J Biol Chem* 1996;271:20977-20980.
33. Meredith JE, Jr., Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* 1993;4:953-961.
34. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994;124:619-626.
35. Aoshiba K, Rennard SI, Spurzem JR. Cell-matrix and cell-cell interactions modulate apoptosis of bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 1997;272:L28-L37.
36. Bergin E, Levine JS, Koh JS, Lieberthal W. Mouse proximal tubular cell-cell adhesion inhibits apoptosis by a cadherin-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278:F758-F768.
37. Hermiston ML, Gordon JI. In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1995;129:489-506.
38. Kantak SS, Kramer RH. E-cadherin regulates anchorage-independent growth and survival in oral squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 1998;273:16953-16961.
39. Douma S, Van Laar T, Zevenhoven J, Meuwissen R, Van Garderen E, Peeper DS. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* 2004;430:1034-1039.
40. Parise LV, Lee J, Juliano RL. New aspects of integrin signaling in cancer. *Semin Cancer Biol* 2000;10:407-414.
41. Ruoslahti E, Reed JC. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 1994;77:477-478.

42. Ruoslahti E. How cancer spreads. *Sci Am* 1996;275:72-77.
43. Ruoslahti E. Integrins as signaling molecules and targets for tumor therapy. *Kidney Int* 1997;51:1413-1417.
44. Schwartz MA. Signaling by integrins: implications for tumorigenesis. *Cancer Res* 1993;53:1503-1506.
45. Boudreau N, Sympton CJ, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995;267:891-893.
46. Werb Z, Sympton CJ, Alexander CM, Thomasset N, Lund LR, MacAuley A, Ashkenas J, Bissell MJ. Extracellular matrix remodeling and the regulation of epithelial-stromal interactions during differentiation and involution. *Kidney Int Suppl* 1996;54:S68-S74.
47. Vitale M, Di Matola T, Bifulco M, Casamassima A, Fenzi G, Rossi G. Apoptosis induced by denied adhesion to extracellular matrix (anoikis) in thyroid epithelial cells is p53 dependent but fails to correlate with modulation of p53 expression. *FEBS Lett* 1999;462:57-60.
48. Strater J, Wedding U, Barth TF, Koretz K, Elsing C, Moller P. Rapid onset of apoptosis in vitro follows disruption of beta 1-integrin/matrix interactions in human colonic crypt cells. *Gastroenterology* 1996;110:1776-1784.
49. Haake AR, Polakowska RR. Cell death by apoptosis in epidermal biology. *J Invest Dermatol* 1993;101:107-112.
50. Tamada Y, Takama H, Kitamura T, Yokochi K, Nitta Y, Ikeya T, Matsumoto Y. Identification of programmed cell death in normal human skin tissues by using specific labelling of fragmented DNA. *Br J Dermatol* 1994;131:521-524.
51. Re F, Zanetti A, Sironi M, Polentarutti N, Lanfranccone L, Dejana E, Colotta F. Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. *J Cell Biol* 1994;127:537-546.
52. McGill G, Shimamura A, Bates RC, Savage RE, Fisher DE. Loss of matrix adhesion triggers rapid transformation-selective apoptosis in fibroblasts. *J Cell Biol* 1997;138:901-911.
53. Grossmann J, Walther K, Artinger M, Kiessling S, Scholmerich J. Apoptotic signaling during initiation of detachment-induced apoptosis ("anoikis") of primary human intestinal epithelial cells. *Cell Growth Differ* 2001;12:147-155.
54. Grossmann J, Artinger M, Grasso AW, Kung HJ, Scholmerich J, Fiocchi C, Levine AD. Hierarchical cleavage of focal adhesion kinase by caspases alters signal transduction during apoptosis of intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2001;120:79-88.
55. Grossmann J, Walther K, Artinger M, Rummele P, Woenckhaus M, Scholmerich J. Induction of apoptosis before shedding of human intestinal epithelial cells. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1421-1428.

56. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999;285:1028-1032.
57. Meredith JE, Jr., Winitz S, Lewis JM, Hess S, Ren XD, Renshaw MW, Schwartz MA. The regulation of growth and intracellular signaling by integrins. *Endocr Rev* 1996;17:207-220.
58. Ruoslahti E. Integrin signaling and matrix assembly. *Tumour Biol* 1996;17:117-124.
59. Schwartz MA. Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol* 2001;11:466-470.
60. Schwartz MA, Ginsberg MH. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol* 2002;4:E65-E68.
61. Hannigan GE, Dedhar S. Protein kinase mediators of integrin signal transduction. *J Mol Med* 1997;75:35-44.
62. Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:5192-5196.
63. Schaller MD. The focal adhesion kinase. *J Endocrinol* 1996;150:1-7.
64. Almeida EA, Ilic D, Han Q, Hauck CR, Jin F, Kawakatsu H, Schlaepfer DD, Damsky CH. Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase. *J Cell Biol* 2000;149:741-754.
65. Cardone MH, Salvesen GS, Widmann C, Johnson G, Frisch SM. The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell* 1997;90:315-323.
66. Chen Q, Kinch MS, Lin TH, Burrridge K, Juliano RL. Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1994;269:26602-26605.
67. Cobb BS, Schaller MD, Leu TH, Parsons JT. Stable association of pp60src and pp59fyn with the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase, pp125FAK. *Mol Cell Biol* 1994;14:147-155.
68. Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennstrom S, Warne PH, Downward J. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J* 1997;16:2783-2793.
69. Khwaja A, Lehmann K, Marte BM, Downward J. Phosphoinositide 3-kinase induces scattering and tubulogenesis in epithelial cells through a novel pathway. *J Biol Chem* 1998;273:18793-18801.
70. Khwaja A. Akt is more than just a Bad kinase. *Nature* 1999;401:33-34.
71. Le Gall M, Chambard JC, Breitmayer JP, Grall D, Pouyssegur J, Obberghen-Schilling E. The p42/p44 MAP kinase pathway prevents apoptosis induced by anchorage and serum removal. *Mol Biol Cell* 2000;11:1103-1112.

72. Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD, Akiyama SK, Yamada KM. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol* 1995;131:791-805.
73. Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, Yamada KM. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol* 1996;135:1633-1642.
74. Oktay M, Wary KK, Dans M, Birge RB, Giancotti FG. Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to Jun NH2-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle. *J Cell Biol* 1999;145:1461-1469.
75. Rak J, Mitsuhashi Y, Erdos V, Huang SN, Filmus J, Kerbel RS. Massive programmed cell death in intestinal epithelial cells induced by three-dimensional growth conditions: suppression by mutant c-H-ras oncogene expression. *J Cell Biol* 1995;131:1587-1598.
76. Rosen K, Rak J, Leung T, Dean NM, Kerbel RS, Filmus J. Activated Ras prevents downregulation of Bcl-X(L) triggered by detachment from the extracellular matrix. A mechanism of Ras-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* 2000;149:447-456.
77. Aberle H, Schwartz H, Kemler R. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem* 1996;61:514-523.
78. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996;84:345-357.
79. Pullan S, Wilson J, Metcalfe A, Edwards GM, Goberdhan N, Tilly J, Hickman JA, Dive C, Streuli CH. Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. *J Cell Sci* 1996;109 (Pt 3):631-642.
80. Abbi S, Guan JL. Focal adhesion kinase: protein interactions and cellular functions. *Histol Histopathol* 2002;17:1163-1171.
81. Alahari SK, Reddig PJ, Juliano RL. Biological aspects of signal transduction by cell adhesion receptors. *Int Rev Cytol* 2002;220:145-184.
82. Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:262-267.
83. Kulik G, Klippel A, Weber MJ. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol* 1997;17:1595-1606.
84. Marte BM, Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci* 1997;22:355-358.

85. Murga C, Laguinde L, Wetzker R, Cuadrado A, Gutkind JS. Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinasegamma. *J Biol Chem* 1998;273:19080-19085.
86. Laprise P, Chailier P, Houde M, Beaulieu JF, Boucher MJ, Rivard N. Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 2002;277:8226-8234.
87. Scheid MP, Woodgett JR. Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett* 2003;546:108-112.
88. Pece S, Chiariello M, Murga C, Gutkind JS. Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex. *J Biol Chem* 1999;274:19347-19351.
89. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:127-137.
90. Jost M, Huggett TM, Kari C, Rodeck U. Matrix-independent survival of human keratinocytes through an EGF receptor/MAPK-kinase-dependent pathway. *Mol Biol Cell* 2001;12:1519-1527.
91. Bill HM, Knudsen B, Moores SL, Muthuswamy SK, Rao VR, Brugge JS, Miranti CK. Epidermal growth factor receptor-dependent regulation of integrin-mediated signaling and cell cycle entry in epithelial cells. *Mol Cell Biol* 2004;24:8586-8599.
92. Pece S, Gutkind JS. Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. *J Biol Chem* 2000;275:41227-41233.
93. Shen X, Kramer RH. Adhesion-mediated squamous cell carcinoma survival through ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor. *Am J Pathol* 2004;165:1315-1329.
94. Anderson P. Kinase cascades regulating entry into apoptosis. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997;61:33-46.
95. Lavin MF, Watters D, Song Q. Role of protein kinase activity in apoptosis. *Experientia* 1996;52:979-994.
96. Howe AK, Aplin AE, Juliano RL. Anchorage-dependent ERK signaling-- mechanisms and consequences. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:30-35.
97. McFall A, Ulku A, Lambert QT, Kusa A, Rogers-Graham K, Der CJ. Oncogenic Ras blocks anoikis by activation of a novel effector pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 2001;21:5488-5499.
98. Biscardi JS, Tice DA, Parsons SJ. c-Src, receptor tyrosine kinases, and human cancer. *Adv Cancer Res* 1999;76:61-119.

99. Irby RB, Yeatman TJ. Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* 2000;19:5636-5642.
100. Schlessinger J. New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis. *Cell* 2000;100:293-296.
101. Collett MS, Brugge JS, Erikson RL, Lau AF, Krzyzek RA, Faras AJ. The src gene product of transformed and morphologically reverted ASV-infected mammalian cells. *Nature* 1979;281:195-198.
102. Oppermann H, Levinson AD, Varmus HE, Levintow L, Bishop JM. Uninfected vertebrate cells contain a protein that is closely related to the product of the avian sarcoma virus transforming gene (src). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:1804-1808.
103. Wei L, Yang Y, Zhang X, Yu Q. Altered regulation of Src upon cell detachment protects human lung adenocarcinoma cells from anoikis. *Oncogene* 2004;23:9052-9061.
104. Windham TC, Parikh NU, Siwak DR, Summy JM, McConkey DJ, Kraker AJ, Gallick GE. Src activation regulates anoikis in human colon tumor cell lines. *Oncogene* 2002;21:7797-7807.
105. Loza-Coll MA, Perera S, Shi W, Filmus J. A transient increase in the activity of Src-family kinases induced by cell detachment delays anoikis of intestinal epithelial cells. *Oncogene* 2005;24:1727-1737.
106. Pang JH, Kraemer A, Stehbens SJ, Frame MC, Yap AS. Recruitment of phosphoinositide 3-kinase defines a positive contribution of tyrosine kinase signaling to E-cadherin function. *J Biol Chem* 2005;280:3043-3050.
107. Neurath MF, Becker C, Barbulescu K. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 1998;43:856-860.
108. Hiscott J, Kwon H, Genin P. Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *J Clin Invest* 2001;107:143-151.
109. Mellits KH, Mullen J, Wand M, Armbruster G, Patel A, Connerton PL, Skelly M, Connerton IF. Activation of the transcription factor NF-kappaB by *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* 2002;148:2753-2763.
110. Sakurai H, Suzuki S, Kawasaki N, Nakano H, Okazaki T, Chino A, Doi T, Saiki I. Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway. *J Biol Chem* 2003;278:36916-36923.
111. Yan SR, Joseph RR, Rosen K, Reginato MJ, Jackson A, Allaire N, Brugge JS, Jobin C, Stadnyk AW. Activation of NF-kappaB following detachment delays apoptosis in intestinal epithelial cells. *Oncogene* 2005;24:6482-6491.
112. Toruner M, Fernandez-Zapico M, Sha JJ, Pham L, Urrutia R, Egan LJ. Antianoikis effect of nuclear factor-kappaB through up-regulated expression of osteoprotegerin, BCL-2, and IAP-1. *J Biol Chem* 2006;281:8686-8696.

113. Grossmann J, Walther K, Artinger M, Kiessling S, Steinkamp M, Schmautz WK, Stadler F, Bataille F, Schultz M, Scholmerich J, Rogler G. Progress on isolation and short-term ex-vivo culture of highly purified non-apoptotic human intestinal epithelial cells (IEC). *Eur J Cell Biol* 2003;82:262-270.
114. Rogler G, Daig R, Aschenbrenner E, Vogl D, Schlottmann K, Falk W, Gross V, Scholmerich J, Andus T. Establishment of long-term primary cultures of human small and large intestinal epithelial cells. *Lab Invest* 1998;78:889-890.
115. Cereijido M, Shoshani L, Contreras RG. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G477-G482.
116. Fujimoto J, Ichigo S, Hirose R, Sakaguchi H, Tamaya T. Suppression of E-cadherin and alpha- and beta-catenin mRNA expression in the metastatic lesions of gynecological cancers. *Eur J Gynaecol Oncol* 1997;18:484-487.
117. Jongen WM, Fitzgerald DJ, Asamoto M, Piccoli C, Slaga TJ, Gros D, Takeichi M, Yamasaki H. Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca²⁺ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J Cell Biol* 1991;114:545-555.
118. Lampe PD, Nguyen BP, Gil S, Usui M, Olerud J, Takada Y, Carter WG. Cellular interaction of integrin alpha3beta1 with laminin 5 promotes gap junctional communication. *J Cell Biol* 1998;143:1735-1747.
119. Steinhilber U, Badock V, Bauer A, Behrens J, Wittman-Liebold B, Dorken B, Bommert K. Apoptosis-induced cleavage of beta-catenin by caspase-3 results in proteolytic fragments with reduced transactivation potential. *J Biol Chem* 2000;275:16345-16353.
120. Coll ML, Rosen K, Ladeda V, Filmus J. Increased Bcl-xL expression mediates v-Src-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells. *Oncogene* 2002;21:2908-2913.
121. Rosen K, Coll ML, Li A, Filmus J. Transforming growth factor-alpha prevents detachment-induced inhibition of c-Src kinase activity, Bcl-XL down-regulation, and apoptosis of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:37273-37279.
122. Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E, Chan-Hui PY. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 1996;134:793-799.
123. Bates RC, Buret A, van Helden DF, Horton MA, Burns GF. Apoptosis induced by inhibition of intercellular contact. *J Cell Biol* 1994;125:403-415.
124. Hermiston ML, Gordon JI. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* 1995;270:1203-1207.
125. Fouquet S, Lugo-Martinez VH, Faussat AM, Renaud F, Cardot P, Chambaz J, Pincon-Raymond M, Thenet S. Early loss of E-cadherin from cell-cell contacts is involved in the onset of Anoikis in enterocytes. *J Biol Chem* 2004;279:43061-43069.

126. Vachon PH, Harnois C, Grenier A, Dufour G, Bouchard V, Han J, Landry J, Beaulieu JF, Vezina A, Dydensborg AB, Gauthier R, Cote A, Drolet JF, Lareau F. Differentiation state-selective roles of p38 isoforms in human intestinal epithelial cell anoikis. *Gastroenterology* 2002;123:1980-1991.
127. Grossmann J. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis* 2002;7:247-260.
128. Maldonado RA, Irvine DJ, Schreiber R, Glimcher LH. A role for the immunological synapse in lineage commitment of CD4 lymphocytes. *Nature* 2004;431:527-532.
129. Kovacs EM, Ali RG, McCormack AJ, Yap AS. E-cadherin homophilic ligation directly signals through Rac and phosphatidylinositol 3-kinase to regulate adhesive contacts. *J Biol Chem* 2002;277:6708-6718.
130. Briehner WM, Yap AS, Gumbiner BM. Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin. *J Cell Biol* 1996;135:487-496.
131. Ozawa M, Kemler R. The membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain prevents dimerization and negatively regulates adhesion activity. *J Cell Biol* 1998;142:1605-1613.
132. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004;303:1483-1487.
133. Fiaschi T, Cozzi G, Raugei G, Formigli L, Ramponi G, Chiarugi P. Redox regulation of beta-actin during integrin-mediated cell adhesion. *J Biol Chem* 2006;281:22983-22991.
134. Zhao M, Antunes F, Eaton JW, Brunk UT. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur J Biochem* 2003;270:3778-3786.
135. Yuan XM, Li W, Dalen H, Lotem J, Kama R, Sachs L, Brunk UT. Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:6286-6291.
136. Baregamian N, Song J, Jeschke MG, Evers BM, Chung DH. IGF-1 protects intestinal epithelial cells from oxidative stress-induced apoptosis. *J Surg Res* 2006;136:31-37.
137. Kurz T, Gustafsson B, Brunk UT. Intralysosomal iron chelation protects against oxidative stress-induced cellular damage. *FEBS J* 2006;273:3106-3117.
138. Tenopoulou M, Doulias PT, Barbouti A, Brunk U, Galaris D. Role of compartmentalized redox-active iron in hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis. *Biochem J* 2005;387:703-710.
139. Valentijn AJ, Zouq N, Gilmore AP. Anoikis. *Biochem Soc Trans* 2004;32:421-425.

140. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94:491-501.
141. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997;139:1281-1292.
142. Gilmore AP, Metcalfe AD, Romer LH, Streuli CH. Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J Cell Biol* 2000;149:431-446.
143. Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:437-444.
144. Mackey TJ, Borkowski A, Amin P, Jacobs SC, Kyprianou N. bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with prostate cancer. *Urology* 1998;52:1085-1090.
145. Rosen K, Rak J, Jin J, Kerbel RS, Newman MJ, Filmus J. Downregulation of the pro-apoptotic protein Bak is required for the ras-induced transformation of intestinal epithelial cells. *Curr Biol* 1998;8:1331-1334.
146. Peluso JJ, Pappalardo A, Fernandez G. E-cadherin-mediated cell contact prevents apoptosis of spontaneously immortalized granulosa cells by regulating Akt kinase activity. *Biol Reprod* 2001;64:1183-1190.
147. Tsukita S, Oishi K, Akiyama T, Yamanashi Y, Yamamoto T, Tsukita S. Specific proto-oncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. *J Cell Biol* 1991;113:867-879.
148. Defilippi P, Bozzo C, Volpe G, Romano G, Venturino M, Silengo L, Tarone G. Integrin-mediated signal transduction in human endothelial cells: analysis of tyrosine phosphorylation events. *Cell Adhes Commun* 1994;2:75-86.
149. Liu Z, Li H, Wu X, Yoo BH, Yan SR, Stadnyk AW, Sasazuki T, Shirasawa S, Lacasse EC, Korneluk RG, Rosen KV. Detachment-induced upregulation of XIAP and cIAP2 delays anoikis of intestinal epithelial cells. *Oncogene* 2006.
150. Orford K, Orford CC, Byers SW. Exogenous expression of beta-catenin regulates contact inhibition, anchorage-independent growth, anoikis, and radiation-induced cell cycle arrest. *J Cell Biol* 1999;146:855-868.
151. Reginato MJ, Mills KR, Paulus JK, Lynch DK, Sgroi DC, Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol* 2003;5:733-740.
152. Liu Z, Li H, Derouet M, Filmus J, Lacasse EC, Korneluk RG, Kerbel RS, Rosen KV. ras Oncogene triggers up-regulation of cIAP2 and XIAP in intestinal epithelial cells: epidermal growth factor receptor-dependent and -independent mechanisms of ras-induced transformation. *J Biol Chem* 2005;280:37383-37392.

153. Liston P, Fong WG, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* 2003;22:8568-8580.
154. Wang P, Valentijn AJ, Gilmore AP, Streuli CH. Early events in the anoikis program occur in the absence of caspase activation. *J Biol Chem* 2003;278:19917-19925.
155. Rosen K, Shi W, Calabretta B, Filmus J. Cell detachment triggers p38 mitogen-activated protein kinase-dependent overexpression of Fas ligand. A novel mechanism of Anoikis of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002;277:46123-46130.
156. Waterhouse CC, Joseph RR, Stadnyk AW. Endogenous IL-1 and type II IL-1 receptor expression modulate anoikis in intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* 2001;269:109-116.
157. Deschesnes RG, Huot J, Valerie K, Landry J. Involvement of p38 in apoptosis-associated membrane blebbing and nuclear condensation. *Mol Biol Cell* 2001;12:1569-1582.
158. Khwaja A, Downward J. Lack of correlation between activation of Jun-NH2-terminal kinase and induction of apoptosis after detachment of epithelial cells. *J Cell Biol* 1997;139:1017-1023.
159. Krestow JK, Rak J, Filmus J, Kerbel RS. Functional dissociation of anoikis-like cell death and activity of stress activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;260:48-53.
160. Hagiwara C, Tanaka M, Kudo H. Increase in colorectal epithelial apoptotic cells in patients with ulcerative colitis ultimately requiring surgery. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:758-764.
161. Marini M, Bamias G, Rivera-Nieves J, Moskaluk CA, Hoang SB, Ross WG, Pizarro TT, Cominelli F. TNF-alpha neutralization ameliorates the severity of murine Crohn's-like ileitis by abrogation of intestinal epithelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8366-8371.
162. Strater J, Wellisch I, Riedl S, Walczak H, Koretz K, Tandara A, Krammer PH, Moller P. CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997;113:160-167.
163. Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermuller N, Otto HF, Autschbach F. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G216-G228.
164. Marin ML, Greenstein AJ, Geller SA, Gordon RE, Aufses AH, Jr. A freeze fracture study of Crohn's disease of the terminal ileum: changes in epithelial tight junction organization. *Am J Gastroenterol* 1983;78:537-547.
165. Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, Riecken EO, Schulzke JD. Altered tight junction structure contributes to the impaired

- epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1999;116:301-309.
166. Louis E, Ribbens C, Godon A, Franchimont D, De Groote D, Hardy N, Boniver J, Belaiche J, Malaise M. Increased production of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by inflamed mucosa in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2000;120:241-246.
167. von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000;47:63-73.

9 Anhang

Teile der vorliegenden Arbeit wurden als Posterbeiträge auf Kongressen oder in wissenschaftlichen Zeitschriften vorgestellt. Die Titel der Publikationen sind im Folgenden aufgelistet:

Posterbeiträge

1. **C. Hofmann**, M. Artinger, B. Federhofer, T. Vogt, G. Rogler, J. Schölmerich, J. Grossmann, Ephrin-A1-mediated Eph A2 stimulation at cell-cell contacts induces „inside-out“ FAK phosphorylation modifying survival signaling and anchorage dependence in primary normal and neoplastic human intestinal epithelial cell (IEC). *Digestive Disease Week, New Orleans, Louisiana, USA (2004)*
2. **C. Hofmann**, M. Artinger, J. Grossmann, J. Schölmerich, G. Rogler, F. Obermeier, Cell-cell contacts are involved in the activation of important Akt-dependent anti-apoptotic survival signaling pathways in colonic epithelial cells. *Digestive Disease Week, Chicago, Illinois, USA (2005)*
3. **C. Hofmann**, M. Artinger, J. Grossmann, J. Schölmerich, G. Rogler, F. Obermeier, Zell-Zell-Kontakte verhindern Anoikis in primären humanen Kolonepithelzellen durch Ligand-unabhängige Aktivierung des *Epidermal Growth Factor* Rezeptors (EGFR). *60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Köln (2005)*
4. **C. Hofmann**, M. Artinger, J. Grossmann, J. Schölmerich, G. Rogler, F. Obermeier, Zell-Zell-Kontakte verhindern Anoikis in primären humanen Kolonepithelzellen durch Ligand-unabhängige Aktivierung des *Epidermal Growth Factor* Rezeptors (EGFR). *33. Kongress der der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e.V., Amberg (2005)*
5. **C. Hofmann**, M. Artinger, J. Grossmann, J. Schölmerich, G. Rogler, F. Obermeier, Activation of survival kinases and NF- κ B delays anoikis in primary human colonic epithelial cells. *Reisestipendium zum 4th International Meeting on Inflammatory Bowel Diseases "On the way to new therapies", Capri, Italien (2006)*
6. **C. Hofmann**, M. Artinger, J. Grossmann, J. Schölmerich, G. Rogler, F. Obermeier, Influence of cell-cell contacts on survival of primary human colonic epithelial cells and regulation of Bcl-2 family proteins. *Digestive Disease Week, Los Angeles, Kalifornien, USA (2006)*

7. **C. Hofmann**, M. Artinger, J. Grossmann, J. Schölmerich, G. Rogler, F. Obermeier, Activation of survival kinases and NF- κ B delays anoikis in primary human colonic epithelial cells. *Digestive Disease Week, Los Angeles, Kalifornien, USA (2006)*
8. M. Hausmann, **C. Hofmann**, S. Kiessling, W. Falk, J. Schölmerich, H. Herfarth, G. Rogler, Translocation of Bmf during anoikis in primary intestinal epithelial cells. *Digestive Disease Week, Los Angeles, Kalifornien, USA (2006)*
9. **C. Hofmann**, M. Artinger, J. Grossmann, J. Schölmerich, G. Rogler, F. Obermeier, Einfluss von Zell-Zell-Kontakten auf das Überleben primärer humaner Kolonepithelzellen und die Regulation von Bcl-2-Proteinen. *61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Hannover (2006)*
10. **C. Hofmann**, M. Artinger, J. Grossmann, J. Schölmerich, G. Rogler, F. Obermeier, Die Aktivierung von "Überlebenskinasen" und NF- κ B verzögert Anoikis in primären humanen Kolonepithelzellen. *61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Hannover (2006)*
11. M. Hausmann, **C. Hofmann**, S. Kiessling, W. Falk, J. Schölmerich, H. Herfarth, G. Rogler, Translokation von Bmf bei Anoikis in primären intestinalen Epithelzellen. *61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Hannover (2006)*
12. **C. Hofmann**, M. Artinger, J. Grossmann, J. Schölmerich, G. Rogler, F. Obermeier, Einfluss von Zell-Zell-Kontakten auf das Überleben primärer humaner Kolonepithelzellen und die Regulation von Bcl-2-Proteinen. *34. Kongress der der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e.V., Rosenheim (2006)*
13. M. Hausmann, **C. Hofmann**, S. Kiessling, W. Falk, J. Schölmerich, H. Herfarth, G. Rogler, Translokation von Bmf bei Anoikis in primären intestinalen Epithelzellen. *34. Kongress der der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e.V., Rosenheim (2006)*

Vorträge

1. **C. Hofmann**, M. Artinger, K. Walther, B. Federhofer, J. Schölmerich, F. Obermeier, G. Rogler, J. Grossmann, Zell-Zell-Kontakte aktivieren wichtige FAK-unabhängige anti-apoptotische Überlebenssignalpfade in primären intestinalen Epithelzellen (IEZ). *59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Präsidentensitzung, Leipzig (2004)*

Originalarbeiten

1. **Hofmann C**, Obermeier F, Artinger M, Hausmann M, Falk W, Schoelmerich J, Rogler G, Grossmann J, Cell-cell contacts prevent anoikis in primary human colonic epithelial cells. *Akzeptiert bei Gastroenterology*.
2. **Hofmann C**, Falk W, Rogler G, Schoelmerich J, Obermeier F, Activation of distinct survival pathways following loss of cell anchorage delays anoikis in primary human colonic epithelial cells. *In Vorbereitung*.

Originalarbeiten ohne Bezug zur vorliegenden Arbeit

1. Zellmeier S, **Hofmann C**, Thomas S, Wiegert T, Schumann W., Identification of sigma(V)-dependent genes of Bacillus subtilis. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Dec 15;253(2):221-9.
2. Wild PJ, Krieg RC, Seidl J, Stoehr R, Reher K, **Hofmann C**, Louhelainen J, Rosenthal A, Hartmann A, Pilarsky C, Bosserhoff AK, Knuechel R., RNA expression profiling of normal and tumor cells following photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in vitro. *Mol Cancer Ther*. 2005 Apr;4(4):516-28.
3. Obermeier F, Dunger N, Strauch UG, **Hofmann C**, Bleich A, Grunwald N, Hedrich HJ, Aschenbrenner E, Schlegelberger B, Rogler G, Scholmerich J, Falk W., CpG motifs of bacterial DNA essentially contribute to the perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2005 Sep;129(3):913-27.

Danksagung

Zum Gelingen meiner Dissertation haben viele Leute beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken möchte.

Allem voran gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Jürgen Schölmerich für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Gerhard Rogler für seine bereitwillige Unterstützung und Förderung meiner Dissertation, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie die hervorragende wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Richard Warth danke ich für seine Bereitschaft, die fakultätsinterne Betreuung und Vertretung dieser Arbeit zu übernehmen und für sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Besonders danken möchte ich Herrn PD Dr. Florian Obermeier für seine stetige Diskussionsbereitschaft, die Aufmunterung bei Rückschlägen, seine vielen hilfreichen Anregungen sowie für seine wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Werner Falk danke ich für seine stets offene Tür, seine Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke den Mitarbeitern der Chirurgie sowie Herrn Prof. Dr. Dobroschke für die Bereitstellung von primärem Darmgewebe. Außerdem danke ich den Mitarbeitern der Pathologie sowie den Pathologen Dr. Kohler, Dr. Wiesinger und Dr. Zimmermann für den Zuschnitt der Darmpräparate.

Bei allen Arbeitskolleg(inn)en aus dem Forschungsbau H1 möchte ich mich für die nette und produktive Zusammenarbeit bedanken. Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Rogler danke ich für das angenehme Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft. Mein

spezieller Dank geht an Monika Artinger für die Einweihung in die Geheimnisse der Epithelzellisolation sowie an Jessica Bauer, Andrea Dirmeier, Manuela Gunckel, Christian Huy, und allen anderen, die immer ein offenes Ohr für die Probleme bei der Durchführung meiner Experimente hatten und mich mit unzähligen hilfreichen Tipps, Anregungen und gelegentlich auch materiellen Dingen (Kuchen, Schoki, etc...) versorgt haben. Ein ganz herzliches Dankeschön geht an Julia Brenmoehl, Katrin Menzel und Dr. Elisabeth Schnoy für ihre Freundschaft und ihre stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft nicht nur die Arbeit betreffend.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken, ohne deren großartigen Rückhalt mein Studium nicht möglich und diese Arbeit nicht entstanden wäre. Ihre stetige Unterstützung und Hilfe, ihre Aufmunterungen und ihr großes Interesse an meiner Arbeit haben entscheidend zu deren Gelingen beigetragen. Ein großes Dankeschön geht an meine Schwester Kathrin für ihr kritisches und hilfreiches Korrekturlesen.

Nicht zuletzt danke ich Martin für's Zuhören und Mutmachen, für seine Hilfe, wenn mein Computer mal wieder nicht so wollte wie ich, sowie für seine Geduld und Unterstützung, besonders in den schwierigen Phasen dieser Arbeit.

Vielen Dank!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitates gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 28.11.2006

(Claudia Hofmann)