Untersuchungen zur Rolle des BH3-only Proteins Bid bei der Stress-induzierten Apoptose in Karzinomzelllinien

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Barbara Auschrat

geboren in Frankfurt/Main

Mainz, 2008

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis		I
Abkürzungsverzeichnis		III
I.	Einleitung	1
1	Mechanismen des programmierten Zelltods	1
2	Caspasen	3
3	Der extrinsische Apoptoseweg	7
4	Der intrinsische Apoptoseweg	12
5	Calpaine	24
6	Apoptoseresistenz und Kanzerogenese	25
II.	Zielsetzung	31
III.	Material und Methoden	32
1	Material	32
2	Methoden	40
IV.	Ergebnisse	73
1	Generierung stabiler Bid *knock down*- und Kontrollzelllinien	73
2	Der *knock down* von Bid verringert die Caspaseaktivität und die Zelltodrate nach Todesrezeptor-Stimulation	78
3	Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin	83
4	Proteasominhibition	84
5	Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER)	85
6	Synergie Tunicamycin-TRAIL	88
7	Gentoxische Agenzien	94
V.	Diskussion	120
1	Bid vermittelt die Todesrezeptor-induzierte Apoptose in HeLa-Zellen	120
2	Die Staurosporin-induzierte Apoptose in HeLa-Zellen ist Bid-unabhängig	122
3	Keine Apoptoseresistenz Bid-depletierter Zellen bei Proteasominhibition	124
4	Bid beeinflusst die ER Stress-induzierte Apoptose in HeLa-Zellen nicht	126
5	ER Stress sensitiviert HeLa-Zellen für die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose	129
6	Topoisomerase-Inhibitoren	131
7	Oxaliplatin	137
VI.	Zusammenfassung	150
VII.	Literatur	153

VIII. Anhang 180
Veröffentlichungen 180
Posterpräsentationen 180

Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\Psi_M$	mitochondriales Membranpotential
A	Adenin
Abb	Abbildung
AIDS	*aquired immune deficiency syndrome*
AIF	*apoptosis-inducing factor*
APAF-1	*apoptotic-protease activating factor-1*
APS	Amoniumperoxodisulfat
ARF	*ADP-ribosylation factor*
AS	Aminosäure
ATM	*ataxia telangiectasia mutant*
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	*ATM and RAD3-related*
Bad	*Bcl-2 antagonist of cell death*
Bak	*Bcl-2 antagonist/Killer*
Bax	*Bcl-2 associated X protein*
Bbc3	*Bcl-2 binding component 3*
Bcl-2	*B-cell lymphoma-2*
Bcl-X_L	*B-cell lymphoma-X large*
BH1-4	Bcl-2 Homologie-Domänen 1 – 4
BFA	Brefeldin A
Bid	*BH3-interacting domain death agonist*
Bik	*Bcl-2 interacting killer*
Bim	*Bcl-2 interacting mediator*
BIR	*Baculovirus IAP repeat*
BiP	*binding protein*
BLAST	*basic local alignment search tool*
Bmf	*Bcl-2 modifying factor*
BNIP3	*Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3*
Bod	*Bcl-2 related ovarian death gene*
Bok	*Bcl-2 related ovarian killer*
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CDK	*cyclin dependent kinase*

ca.	zirca
c-FLIP	*cellular FLICE-inhibitory protein*
Calpain	*calcium-dependent papain-like cysteine protease*
Capn	Calpain
CARD	*caspase recruitment domain*
Caspase	Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Protease
CFP	*cyan fluorescent protein*
CHX	Cycloheximid
CMV	Cytomegalievirus
Con	Kontrolle
CP	*crossing point*
C-terminal	carboxyterminal
Cytc	Cytochrom c
DACH	1,2-Diaminocyclohexan
DcR	*decoy receptor*
DD	*death domain*
DED	*death effector domain*
DIABLO	*direct IAP-binding protein with low pI*
DISC	*death-inducing signalling complex*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DP5	*death protein 5*
DR4	*death receptor-4*
DR5	*death receptor-5*
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	*enzyme linked immuno sorbent assay*
EndoG	Endonuklease G
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	*extracellular signal regulated kinase*
FACS	*fluorescence activated cell sorting*
FADD	*Fas-associating death domain-containing protein*
FasL	Fas Ligand
Fc	*fragment crystallizable*

FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLAG-tag	Aminosäuresequenz zur Proteinmarkierung
FL-Bid	*full length Bid*
FLICE	*FADD-like ICE*
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
FSC	*forward scatter*
G	Guanin
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phospat-Dehydrogenase
GEF	*GTP exchange factor*
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Grp78	*glucose-regulated protein-78*
GSCN	Guanidinisothiozyanat
h	Stunde(n)
HPV	humanes Papillomvirus
Hrk	*harakiri*
HRP	*horseradish-peroxidase*
HSP	*heat shock protein*
HtrA2	*high temperature requirement A2*
IAP	*inhibitor of apoptosis protein*
IBM	*IAP-binding motif*
ICE	*interleukin-1β-converting enzyme*
IκB	*inhibitor of NF-κB*
IE	internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
kd	*knock down*
kD	kilo-Dalton
ko	*knock out*
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*
Mcl-1	*myeloid cell leukemia sequence-1*
MCP	*myeloid precursor cell*
MEF	*mouse embryonic fibroblasts*
min	Minute
miRNA	microRNA
M-MLV-RT	*moloney murine leukemia virus*-Reverse Transkriptase
MOI	*multiplicity of infection*
MOMP	*mitochondrial outer membrane permeabilisation*
mut	mutiert/Mutante

Nbk	*natural born killer*
NF-κB	*nuclear factor kappa B*
NLS	nukleäres Lokalisierungssignal
NOD	Nukleotidbindungs- und Oligomerisierungsdomäne
Noxa	abgeleitet von lateinisch Noxe = Schaden
nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
OD	Optische Dichte
OPG	Osteoprotegerin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly-(ADP Ribose) Polymerase
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction*
PI	Propidiumiodid/Proteasominhibitor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIDD	*p53-inducible protein with a death domain*
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-Hydroxypropansulfonsäure)
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
pRB	Retinoblastom
PTP	*permeability transition pore*
PUMA	*p53-upregulated modulator of apoptosis*
RAIDD	*RIP-associated protein with a death domain*
rasiRNA	*repeat-associated short interfering RNA*
RING	*really interesting new gene*
RIP	*receptor interacting protein*
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	*reactive oxygen species*
RT	Zimmertemperatur/Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
rtTA	reverser tet Transaktivator
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SERCA	sarcoplasmatische/endoplasmatische Ca^{2+}-ATPase
shRNA	*small hairpin RNA*

siRNA	*small interfering RNA*
Smac	*second mitochondria-derived activator of caspase*
SSC	*side scatter*
Spike	*small protein with inherent killing effect*
STS	Staurosporin
T	Thymin
tBID	trunkiertes BID
Tet	Tetrazyklin
THD	TNF-Homologie-Domäne
TMRM	Tetramethylrhodamin-Methylester
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	*TNF receptor-associated death domain protein*
TRAF-2	*TNF receptor-associated factor*
TRAIL	*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*
U	Umdrehungen
u. a.	unter anderem
UPR	*unfolded protein response*
VDAC-2	*voltage-dependent anion channel-2*
(v/v)	Volumenprozent
Wt	Wildtyp
(w/v)	Gewichtsprozent
XIAP	*x-chromosome-linked IAP*
YFP	*yellow flourescent protein*
z. B.	zum Beispiel
zVAD	z-Val-Ala-Asp(O-Methyl)-Fluoromethylketon, allgemeiner Caspaseinhibitor

I. Einleitung

1 Mechanismen des programmierten Zelltods

Für vielzellige Organismen ist es essentiell, Zellteilung und Zelltod aufeinander abzustimmen, um Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse zu steuern, die Gewebshomöostase aufrecht zu erhalten und der von defekten Zellen ausgehenden Gefahr zu begegnen. Dazu ist es notwendig, überflüssige Zellen zu entfernen und geschädigte, entartete oder autoreaktive Zellen zu beseitigen und zu ersetzen.
Mit der Evolution der vielzelligen Organismen bildeten sich deshalb unterschiedliche Formen des programmierten Zelltods aus, die heute, auf morphologischen und biochemischen Kriterien basierend, in Apoptose, Autophagie, programmierte Nekrose und mitotische Katastrophe unterteilt werden (Galluzzi et al., 2007; Jin and El-Deiry, 2005).

1.1 Autophagie

Autophagie ist durch eine starke Vakuolisierung der Zelle gekennzeichnet. Organellen und Teile des Zytoplasmas werden in sog. Autophagosomen aufgenommen. Dies sind von einer Doppelmembran umgebene Vesikel, die mit Lysosomen fusionieren und den Lumeninhalt verdauen. Autophagie unterstützt einerseits das Überleben einer Zelle, da es der Beseitigung nicht mehr benötigter oder schadhafter Organellen dient oder in Zeiten des Nahrungsmangels zur Mobilisierung zusätzlicher Energieressourcen beiträgt. Andererseits stellt Autophagie einen Prozess des Selbstverdaus dar, der bei Überaktivierung zur vollständigen Zerstörung der Zelle führt, ohne dabei benachbarte Zellen zu schädigen. Dabei ist noch nicht geklärt, ob Autophagie primär ein eigenständiges „Selbstmordprogramm“ der Zelle darstellt oder ob es sich um eine Begleiterscheinung anderer Zelltod-Typen wie der Apoptose handelt.

1.2 Nekrose

Nekrotische Zellen weisen eine Schwellung des Zytoplasmas und der Organellen auf, die zur Zerstörung der Plasmamembran führen. Da der austretende Zellinhalt lokale Entzündungen hervorruft, wird Nekrose häufig als passive, pathologische Form des Zelltods angesehen, es gibt aber auch Beispiele, in denen Nekrose an einer kontrolliert ablaufenden, physiologischen Zellbeseitigung beteiligt ist (programmierte Nekrose). Biochemisch ist die Nekrose noch nicht gut charakterisiert, aber Mängel in der zellulären Energieversorgung scheinen diese Art des Zelltods zu begünstigen.

1.3 Mitotische Katastrophe

Kennzeichen der mitotischen Katastrophe sind mikro- und multinukleäre Zellen. Diese Spezialform des programmierten Zelltods wird ausgelöst, wenn der korrekte Ablauf der Mitose, z. B. durch fehlerhafte Zellzykluskontrolle oder Schäden am Spindelapparat, gestört ist. Sie ist wichtig, um Zellen mit aberranten Chromosomen oder Chromosomensätzen zu eliminieren.

1.4 Apoptose

Apoptose sorgt während der Embryonalentwicklung und im adulten Organismus für eine, vom Immunsystem meist unbemerkte, „stille“ und effiziente Eliminierung einer Vielzahl von Zellen. Häufig werden erst Defekte im Ablauf der Apoptose augenscheinlich, da übermäßiger oder zu geringer Zelltod an der Entstehung vielfältiger Krankheitsbilder beteiligt ist. Der Verlust von Zellen, die entweder ein geringes Regenerationspotential besitzen oder nicht rechtzeitig ersetzt werden können, trägt zu degenerativen Erkrankungen bei. Als Beispiele seien Alzheimer, AIDS oder Diabetes genannt. Eine zu geringe Apoptoserate dagegen fördert Autoimmunerkrankungen oder Tumorentstehung und -metastasierung, da autoreaktive Zellen nicht ausreichend beseitigt und überflüssige oder geschädigte Zellen nicht eliminiert werden, so dass sie durch das Akkumulieren weiterer genetischer Veränderungen einen malignen Phänotyp ausbilden können.

Apoptose ist die bisher am besten charakterisierte Form des programmierten Zelltods. Sie zeichnet sich morphologisch durch ein Abrunden der Zelle und damit einer Abgrenzung vom Zellverband, durch Reduktion des Zellvolumens und Chromatinkondensation aus. Während der Nukleus fragmentiert wird, bleiben die zytoplasmatischen Organellen intakt und werden mit Teilen des Zytoplasmas und den nukleären Fragmenten in membranumschlossenen Vesikeln abgeschnürt. Auf diese Weise fragmentiert die Zelle kontrolliert in die sog. apoptotischen Körperchen, die zum Schutz des angrenzenden Gewebes durch lokale oder professionelle Phagozyten entfernt werden. Da kein Zellinhalt nach außen tritt und gleichzeitig antiinflammatorische Zytokine freigesetzt werden, werden Entzündungen zumeist vermieden, so dass Apoptose oft immunologisch unauffällig abläuft. Biochemisch geht die klassische Apoptose mit einer Aktivierung bestimmter Proteasen, den Caspasen, und einer Permeabilisierung der mitochondrialen Membran einher.

2 Caspasen

Die meisten charakteristischen Veränderungen im Verlauf der Apoptose sind biochemisch auf die Aktivierung mehrerer Mitglieder einer Endopeptidasefamilie, der Caspasen (Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Proteasen), zurückzuführen. Wie der Name andeutet, gehören Caspasen zu den Cysteinproteasen, bei denen die Seitenkette eines Cysteins als Nukleophil für die Hydrolyse der Peptidbindung dient und zusammen mit einem ebenfalls konservierten Histidin die katalytische Dyade des aktiven Zentrums bildet (Rotonda et al., 1996; Wilson, 1994).

Seit der Entdeckung der ersten Caspase 1992 (Cerretti et al., 1992; Thornberry et al., 1992), die aufgrund ihrer Funktion zunächst *interleukin-1β-converting enzyme* (ICE, heute Caspase-1) genannt wurde, sind in Säugern mittlerweile 14 Familienmitglieder identifiziert worden, von denen beim Menschen elf und bei der Maus zehn exprimiert werden (Alnemri et al., 1996; Pistritto et al., 2002). Basierend auf Sequenzhomologien und funktionalen Kriterien lässt sich die Familie in einen inflammatorischen und einen apoptotischen Zweig einteilen. Eine Ausnahme bildet Caspase-14, die sich keiner der beiden Gruppen zuordnen lässt und vermutlich an der Keratinozytendifferenzierung beteiligt ist (Lippens et al., 2000). Die dem inflammatorischen Zweig zugehörigen Caspasen-1, -4, -5, -11 und -12 fördern Entzündungsprozesse, indem sie zur Reifung proinflammatorischer Zytokine beitragen.

2.1 Initiator- und Effektorcaspasen

Die apoptotischen Caspasen können weiter in sog. Initiator- und Effektorcaspasen unterteilt werden. Initiatorcaspasen, zu denen die Caspasen-2, -8, -9 und -10 zählen, stehen am Anfang der apoptotischen Kaskade. Sie sind die ersten Caspasen, die nach dem Eintreffen eines Apoptosestimulus aktiviert werden und ihre Hauptaufgabe besteht in der Weiterleitung und Amplifizierung des Signals durch Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7 (Degterev et al., 2003; Garcia-Calvo et al., 1998; Thornberry et al., 1997).

Aktive Effektorcaspasen sind die eigentlichen Exekutoren des apoptotischen Programms, da sie durch die Spaltung einer Vielzahl unterschiedlicher Substrate Überlebenssignale unterdrücken, den Apoptoseprozess verstärken und den apoptotischen Phänotyp der Zelle herbeiführen. Zu ihren Substraten zählen nicht nur andere Apoptoseregulatoren, sondern auch Proteine, die für die Aufrechterhaltung der Funktion oder der Struktur des Zytoskeletts, der Zelladhäsion, des Nukleus und weiterer Organellen unerlässlich sind. Durch die Inaktivierung von Proteinen, die den Zellzyklus, DNA- und RNA-Synthese oder Reparaturprozesse steuern,

unterdrücken oder modifizieren sie Transkription, Translation und Proliferation. Effektorcaspasen wirken auch indirekt durch die Aktivierung oder Inaktivierung von Signalmolekülen wie G-Proteinen, Proteinkinasen oder -phosphatasen, die zur Veränderung der zellulären Signalkaskaden führen (Fischer et al., 2003).

Die Aufgabe der Caspasen besteht somit nicht in einer unspezifischen Degradierung von Proteinen, sondern in der gezielten Modifizierung ihrer Substrate durch limitierte Proteolyse, so dass die Substratspaltung sehr selektiv erfolgen muss. Caspasen schneiden carboxyterminal (C-terminal) zu einem Aspartatrest (Position P1), der zusammen mit der C-terminal (P1') und den drei aminoterminal (N-terminal) gelegenen Aminosäuren (AS) (P4-P2) für die Substraterkennung wichtig ist. Während der Aspartatrest in P1 invariabel und für eine effiziente Katalyse fast aller Caspasen unerlässlich ist, unterscheiden sich die einzelnen Mitglieder der Familie aber in ihrer Spezifität für die AS in den Positionen P2-P4 (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004; Margolin et al., 1997; Stennicke et al., 2000; Thornberry et al., 1997).

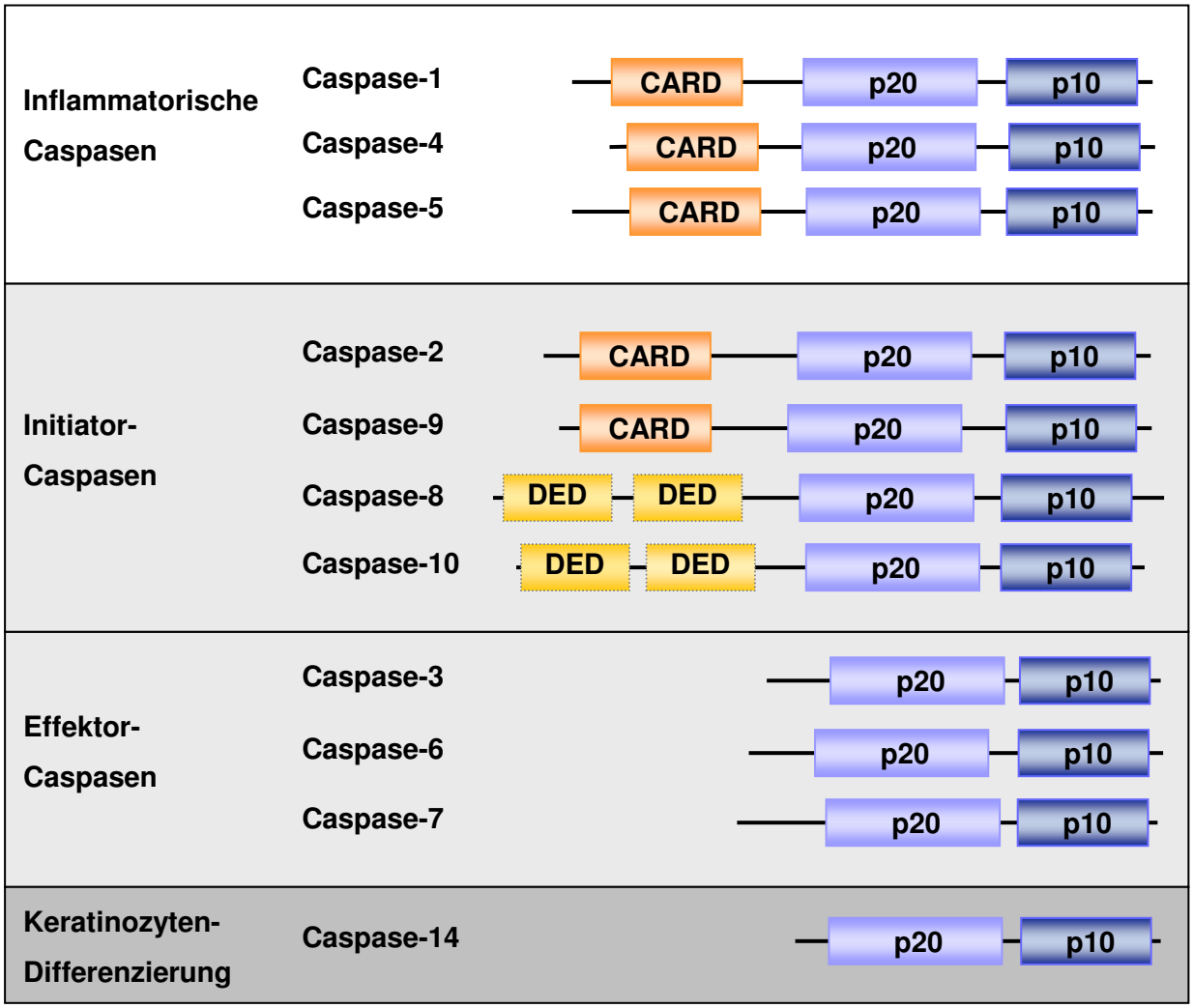

Abbildung 1: Klassifizierung und Struktur humaner Caspasen.
Die humanen Caspasen werden aufgrund von Sequenzhomologie und Funktion in die Gruppen der apoptotischen Initiator- bzw. Effektorcaspasen und der inflammatorischen Caspasen eingeteilt. Caspase-14, die an der Keratinozytendifferenzierung beteiligt ist, nimmt eine Sonderstellung ein. Alle Caspasen besitzen eine große (p20) und eine kleine (p10) Untereinheit sowie eine N-terminale Prodomäne. Die Initiator- und inflammatorischen Caspasen zeichnen sich durch lange Prodomänen aus, die *caspase recruitment* (CARD)- oder *death effector* (DED)-Domänen enthalten, die für die Aktivierung bedeutsam sind. Abbildung modifiziert nach (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004).

2.2 Caspaseaktivierung

Alle Caspasen liegen in der Zelle zunächst als katalytisch inaktive Proenzyme, auch Procaspasen genannt, vor, die aus drei Domänen bestehen, die durch kurze *spacer* von einander getrennt sind. Auf eine N-terminale Prodomäne folgen die große (17-20 kD) und die kleine (10-12 kD) Untereinheit. Die aktive Caspase ist ein Tetramer, in dem sich zwei Heterodimere, bestehend aus je einer kleinen und großen Untereinheit, in gegenläufiger Orientierung aneinander lagern, von denen jedes ein katalytisches Zentrum besitzt (Shi, 2002).

Um Procaspasen zu aktivieren, müssen ihre katalytischen Zentren in eine aktive Konformation gebracht werden. Dabei unterscheiden sich Initiator- und Effektorcaspasen in ihrem Aktivierungsmodus. Effektorcaspasen, die als Proenzyme in dimerer Form vorliegen und nur sehr geringe intrinsische Aktivität aufweisen, werden von Initiatorcaspasen durch proteolytische Spaltung zwischen der großen und der kleinen Untereinheit aktiviert. Durch die Spaltung des einen Caspasemonomers werden Konformationsänderungen in diesem Heterodimer induziert, welche die aktive Konformation des katalytischen Zentrums des benachbarten Monomers stabilisieren und es zur Substratbindung befähigen. Der zweite Prozessierungsschritt, die Abtrennung der Prodomäne, kann deshalb autokatalytisch erfolgen (Chai et al., 2001b; Riedl et al., 2001; Srinivasula et al., 1998).

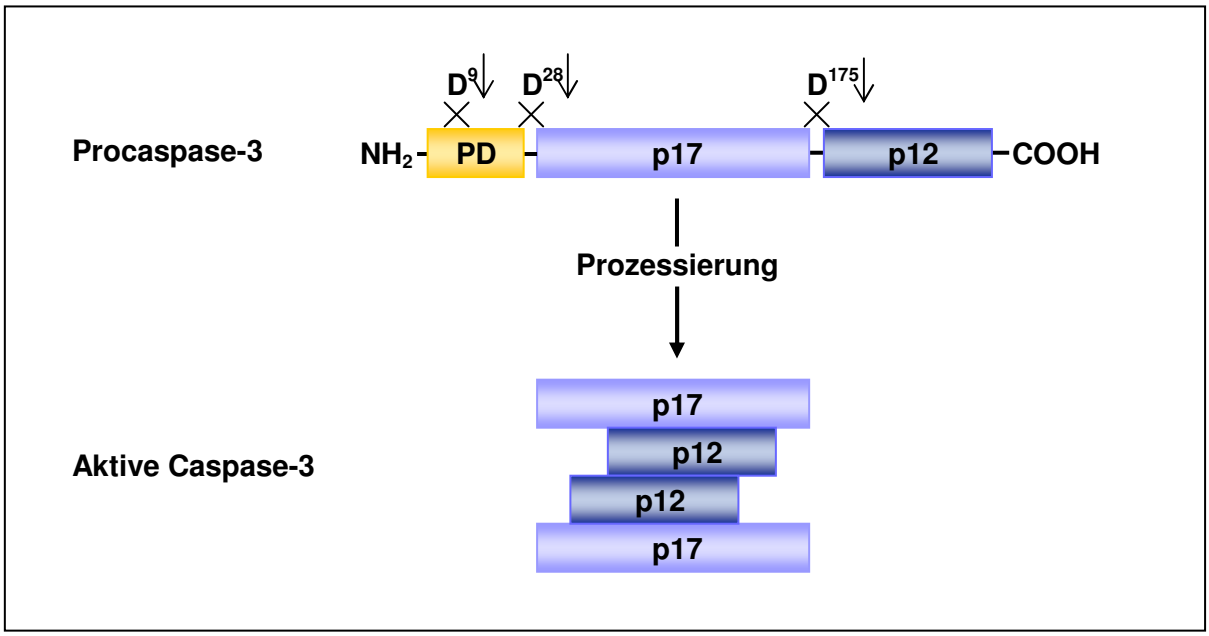

Abbildung 2: Caspaseaktivierung am Beispiel der Effektorcaspase-3.
Aktive Caspasen sind Heterotetramere, die sich aus je zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten, im Falle der Caspase-3 als p17 und p12 bezeichnet, zusammensetzen. Die Aktivierung der Procaspase-3 beginnt mit der Caspase-8-, -9- oder -10-vermittelten Abtrennung der kleinen Untereinheit durch Spaltung an D^{175}. Die Prozessierung der Prodomäne (PD) erfolgt autokatalytisch und führt über ein intermediäres p19-Fragment (Spaltung nach D^{9}) durch Prozessierung an D^{28} zur ausgereiften großen Untereinheit (p17). Abbildung modifiziert nach (Lavrik et al., 2005b).

2.2.1 Aktivierung der Initiatorcaspasen

Im Vergleich zu Effektorcaspasen ist die Aktivierung der Initiatorcaspasen komplexer. Aufgrund ihrer Position in der apoptotischen Kaskade können sie nicht von anderen, bereits aktivierten Caspasen gespalten werden und so scheint weniger die proteolytische Prozessierung als Dimerisierungs- oder Oligomerisierungsprozesse für das Erreichen der

aktiven Konformation wichtig zu sein (Salvesen and Dixit, 1999). Eine lokale Konzentrierung von Initiator-Procaspasen, die eine Dimerisierung und eine Konformationsänderung veranlasst (*proximity induced dimerisation*-Modell), wird durch die Rekrutierung an multimere Adapterproteinkomplexe erreicht. Dabei handelt es sich um das sog. PIDDosom (*p53-inducible protein with a death domain)* für Procaspase-2 (Tinel and Tschopp, 2004), den *death inducing signalling complex* (DISC) für Procaspase-8 und -10 (Kischkel et al., 1995) und das Apoptosom für Procaspase-9 (Boatright and Salvesen, 2003; Li et al., 1997; Renatus et al., 2001). Entscheidend für die Rekrutierung an diese Aktivierungsplattformen sind die langen Prodomänen der Initiatorcaspasen, die homotypische Interaktionsmotive wie *caspase recruitment domain* (CARD, Caspasen-2 und -9) oder *death effector domain* (DED, Caspasen-8 und -10) enthalten, über die sie an Adapterproteine binden können. Sobald die aktive Konformation eingenommen ist, entsteht durch autokatalytische Prozessierung das finale Caspase-Heterotetramer, das durch die Spaltung zusätzlich stabilisiert wird. Im Falle von Caspase-8 und -10 ermöglicht das autokatalytische Entfernen der Prodomäne das Dissoziieren vom DISC ohne Beeinträchtigung der katalytischen Aktivität. Die Dimerisierung ist für die Aktivierung ausreichend (Donepudi et al., 2003). Die aktive Konformation von prozessierter Caspase-9 wird dagegen nicht nur durch die Oligomerisierung, sondern auch durch die Bindung an das Apoptosom stabilisiert, so dass „freie“ prozessierte Caspase-9 geringere katalytische Aktivität als die Apoptosom-gebundene Form aufweist (*induced conformation model*) (Bao and Shi, 2007; Chao et al., 2005; Rodriguez and Lazebnik, 1999).
Die Bildung der Adapterproteinkomplexe für die Aktivierung der Initiatorcaspasen kann über zwei verschiedene Signalwege initiiert werden. Der sog. extrinsische Weg wird über membranständige Todesrezeptoren vermittelt und führt zur Aktivierung der Procaspasen-8 und -10, während im intrinsischen oder mitochondrialen Weg die Freisetzung proapoptotischer Proteine aus den Mitochondrien die Bildung des Apoptosoms und die Aktivierung der Procaspase-9 induziert.

3 Der extrinsische Apoptoseweg

3.1 Todesrezeptoren und die Aktivierung der Initiatorcaspasen-8 und -10

Die Todesrezeptoren und ihre zugehörigen Liganden sind Mitglieder der *tumor necrosis factor* (TNF)-Superfamilie, die sich beim Menschen aus 29 Rezeptoren und 19 Liganden zusammensetzt und die neben der proapoptotischen Funktion auch an der Regulation von Immun-, Entzündungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt ist. Bei den Rezeptoren

handelt es sich um Typ I-, seltener um Typ III-Transmembranproteine, die in ihrem extrazellulären Bereich durch den Besitz mehrerer cysteinreicher Domänen gekennzeichnet sind, welche der Ligandenbindung dienen. Die Liganden sind Typ II-Transmembranproteine und zeichnen sich durch eine TNF-Homologie-Domäne (THD) am C-Terminus aus, die für ihre Trimerisierung und die Rezeptorbindung wichtig ist. Viele der Rezeptoren und Liganden können durch alternatives Spleißen der mRNA oder durch Proteolyse des membranständigen Moleküls in eine lösliche Form überführt werden (Bouralexis et al., 2005; Dempsey et al., 2003).

Zu den Todesrezeptoren zählen u. a. Fas (CD95), TNF-R1, *death receptor* (DR) 3, DR4 (TRAIL-R1) und DR5 (TRAIL-R2), da sie intrazellulär ein als *death domain* (DD) bezeichnetes Proteininteraktionsmotiv besitzen, das für die Rekrutierung der DISC-Komponenten notwendig ist (Lavrik et al., 2005a; Tartaglia et al., 1993). Die Bindung der homotrimeren Liganden *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) an die Rezeptoren DR4 und DR5 oder Fas-Ligand (FasL) an Fas induziert die Trimerisierung der Rezeptoren und die Anlagerung des Adapterproteins *Fas-associated death domain* (FADD). FADD bindet mittels homotypischer Interaktion seiner C-terminalen DD an den Rezeptor und kann über seine N-terminale DED Procaspase-8 und -10 rekrutieren. Dieser Komplex aus aktivierten Rezeptoren, FADD und den Procaspasen, der zusätzlich noch regulatorische Proteine wie *cellular FLICE-inhibitory proteins* (c-FLIP) enthalten kann, wird als DISC (*death inducing signalling complex*) bezeichnet (Lavrik et al., 2005a; Peter and Krammer, 2003). Da die Rezeptoren oligomerisiert vorliegen, werden mehrere Procaspasemoleküle in geeigneter Orientierung in räumliche Nähe gebracht, so dass eine Dimerisierung und Autoprozessierung möglich ist. Die erste Spaltung zwischen den Proteasedomänen generiert die kleine Untereinheit p10 und ein großes (p43/p41) Caspase-8-Fragment, das die Prodomäne und die große Untereinheit enthält und über die DED der Prodomäne noch am DISC gebunden bleibt. Der zweite Prozessierungsschritt, bei dem die Prodomäne abgespalten wird, entlässt das finale Heterotetramer $(p18/p10)_2$ ins Zytosol (Chang et al., 2003; Lavrik et al., 2003). Für Procaspase-10 wird ein vergleichbarer Aktivierungsmechanismus am DISC diskutiert (Sprick et al., 2002).

3.2 Regulation der Caspaseaktivierung im extrinsischen Weg

Das Caspase aktivierende Signal der Todesrezeptor-Liganden kann bereits auf der Ebene der Rezeptoren und des DISC modifiziert werden. Für TRAIL existieren nicht nur die beiden bereits erwähnten Apoptose vermittelnden, sondern drei weitere Rezeptoren, *decoy receptor-1*

(DcR1, TRAIL-R3), DcR2 (TRAIL-R4) und Osteoprotegerin (OPG) (Degli-Esposti et al., 1997a; Degli-Esposti et al., 1997b; Emery et al., 1998). Auch FasL wird nicht nur von CD95, sondern auch von DcR3 gebunden (Pitti et al., 1998). Keines dieser Moleküle kann das Apoptosesignal weiterleiten, da sie keine funktionellen DDs besitzen. Bei DcR3 und OPG handelt es sich um lösliche Proteine ohne intrazelluläre oder Transmembrandomäne, die auch DcR1 fehlen. Dieser Rezeptor ist aber über ein Glykolipid in der Membran verankert, und nur DcR2 weist einen zytoplasmatischen Bereich auf, der aber eine verkürzte DD enthält.
In DcR1- oder DcR2-Überexpressionsexperimenten wurde die TRAIL-vermittelte Apoptose inhibiert. Dies wurde auf die Kompetition mit den Todesrezeptoren um die verfügbaren Liganden und auch durch die TRAIL-abhängige bzw. -unabhängige Bildung von DR5/DcR2 Heterokomplexen zurückgeführt, die keinen funktionellen DISC bilden können (Clancy et al., 2005; Merino et al., 2006). Die physiologische Bedeutung der *Decoy*-Rezeptoren in der Apoptose ist allerdings noch weitgehend unverstanden und auch die anfangs postulierte Korrelation zwischen *Decoy*-Rezeptorexpression und der TRAIL-Resistenz von Tumorzellen ließ sich nicht bestätigen.

3.2.1 cFLIP

Auf der Ebene des DISC erfolgt die Regulierung der Procaspase-8/-10-Aktivierung durch cFLIPs, die Homologie zu Caspase-8/-10 aufweisen, aber katalytisch inaktiv sind. Bisher wurden drei translatierte Spleißvarianten, $FLIP_{L(ong)}$, $FLIP_{S(hort)}$ und $FLIP_R$ nachgewiesen, die über ihre beiden DEDs an FADD binden und zum DISC rekrutiert werden können.
$FLIP_S$ und $FLIP_R$ sind zur Prodomäne homolog, besitzen sonst aber keine weiteren strukturellen Gemeinsamkeiten mit den Procaspasen-8/-10 oder untereinander. Sie inhibieren die Procaspase-8/-10-Prozessierung durch Kompetition mit den Procaspasen um die Bindung an FADD und durch Bildung katalytisch inaktiver Heterodimerkomplexe mit Procaspase-8/-10 (Golks et al., 2005; Irmler et al., 1997).
Komplexer ist die Rolle von $FLIP_L$. Zusätzlich zu den N-terminalen DEDs besteht der C-terminale Teil des Proteins aus einer kleinen (p12) und einer großen (p20) Caspase-ähnlichen Domäne, der aber das Cystein der katalytischen Dyade fehlt (Irmler et al., 1997).
Auch $FLIP_L$ konkurriert mit Caspase-8/-10 um die Rekrutierung an den DISC, kann aber Heterokomplexe mit Procaspase-8/-10 bilden, in denen das Caspasemolekül durch die Dimerisierung mit $FLIP_L$ aktiviert wird, so dass es sich intramolekular zwischen großer und kleiner Untereinheit spalten kann und auch eine Prozessierung des $FLIP_L$-Moleküls zu einem p43/p12-Intermediat vornimmt. Da $FLIP_L$ katalytisch inaktiv ist, kann die intermolekulare

Abspaltung der Prodomäne nicht erfolgen, weshalb das unvollständig prozessierte, aber aktive Tetramer am DISC gebunden bleibt und nicht durch andere Procaspase-8/-10-Moleküle ersetzt werden kann (Boatright et al., 2004; Chang et al., 2002; Krueger et al., 2001).
Konzentrationsabhängig kann $FLIP_L$ die Procaspasen vom DISC verdrängen oder zu einer lokalen Aktivierung von Caspase-8/-10 am DISC beitragen, für die ebenso wie für das durch Caspasen prozessierte $FLIP_L$-Molekül eine Stimulierung antiapoptotischer Signalwege (*mitogen-activated protein kinases* (MAPK), *nuclear factor-kappa B* (NF-κB) und Proteinkinase B (PKB/Akt)) diskutiert wird (Hyer et al., 2006; Micheau et al., 2002).

3.2.2 Rezeptorinternalisierung

Eine weitere Regulationsebene stellt für TNF-R1 und Fas die Rezeptorinternalisierung dar. Der nach Ligandenbindung an der Plasmamembran gebildete TNF-R1-Komplex enthält das Adapterprotein *TNF receptor-associated death domain protein* (TRADD), das *receptor interacting protein* (RIP-1) und *TNF receptor-associated factor* (TRAF-2) rekrutiert und über den Transkriptionsfaktor NF-κB proinflammatorische Signalwege initiiert. Erst die Endozytose des Rezeptorkomplexes induziert die Dissoziation von RIP-1 und ermöglicht die homophilen Interaktionen zwischen TRADD, FADD und den Procaspasen-8/-10 (Schneider-Brachert et al., 2004).
Der TRAIL-DISC dagegen wird ausschließlich an der Plasmamembran gebildet (Kohlhaas et al., 2007), während im Falle von Fas, zumindest in Typ I-Zellen, eine effektive Rekrutierung der DISC-Komponenten an den aktivierten Rezeptor ebenfalls erst in endosomalen Kompartimenten erfolgt (Lee et al., 2006).

Nach der Dissoziation der aktiven Caspase-8- und -10-Moleküle vom DISC aktivieren diese Zelltyp-abhängig entweder die Effektorcaspasen-3 und -7 durch direkte Prozessierung (sog. Typ I-Zellen) oder leiten durch die Spaltung des *Bcl-2 homology*-3 (BH3)-*only* Proteins *BH3-interacting domain death agonist* (Bid) eine Verstärkung des Signals über den intrinsischen, mitochondrialen Weg ein (Typ II-Zellen). Ob eine mitochondriale Amplifizierung notwendig ist, ist Zelltyp-abhängig, da es u. a. von der Menge der nach Rezeptorligation gebildeten DISCs, den daran aktivierten Initiatorcaspasen und durch die Konzentration an zelleigenen Caspaseinhibitoren der *inhibitor of apoptosis protein* (IAP)-Familie (siehe S. 13) beeinflusst wird (Falschlehner et al., 2007; Scaffidi et al., 1998).

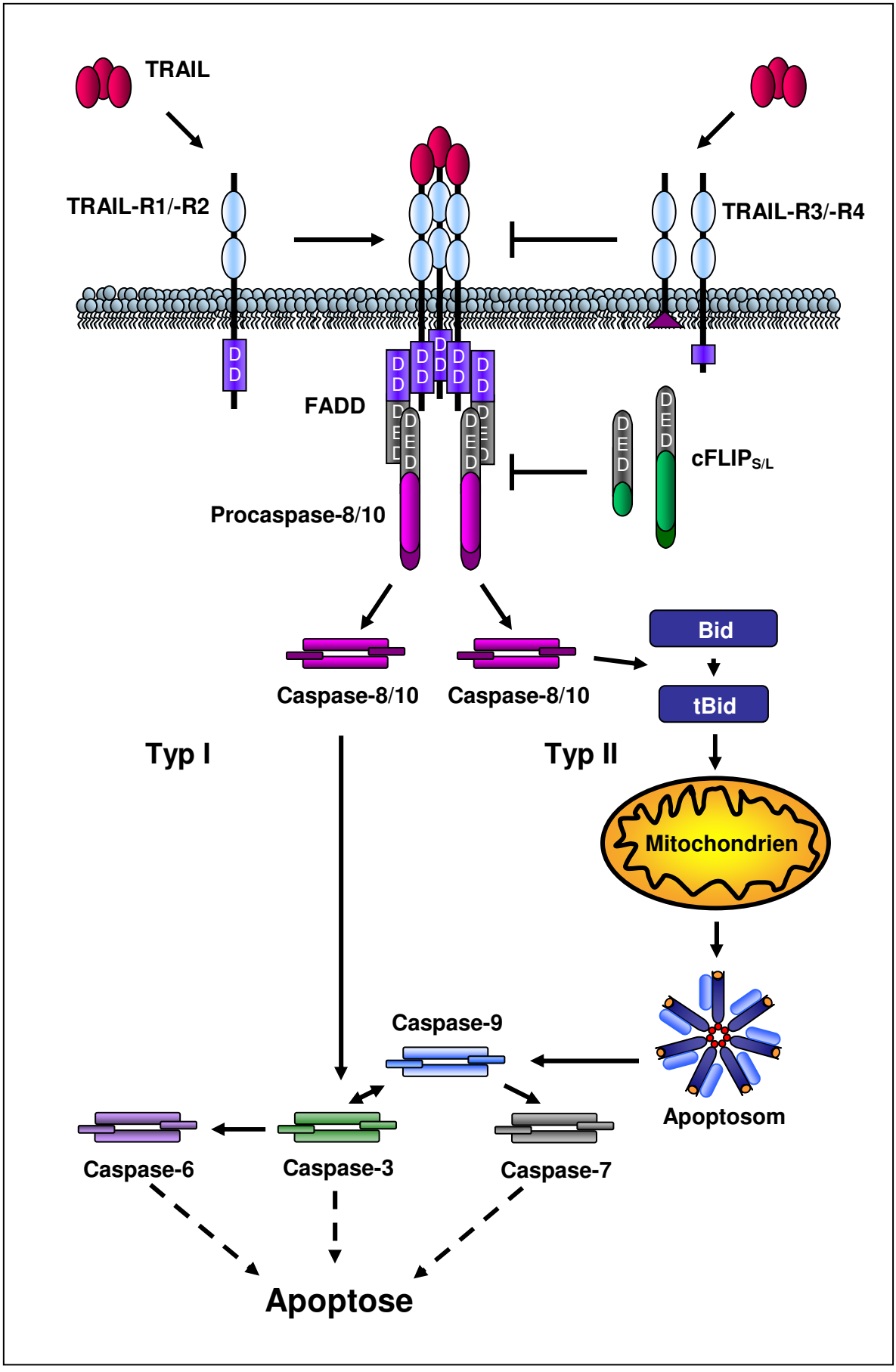

Abbildung 3: Der extrinsische Apoptoseweg am Beispiel der TRAIL-induzierten Signalkaskade.

Der extrinsische Apoptoseweg wird über Todesrezeptoren aktiviert. Der Ligand TRAIL kann mit vier membranständigen Rezeptoren interagieren, von denen TRAIL-R3/R4 keine funktionsfähige zytoplasmatische *death domain* (DD) besitzen, so dass eine Weiterleitung des Apoptosesignal nicht möglich ist. Bindung von TRAIL an TRAIL-R1/2 dagegen induziert die Rezeptortrimerisierung, die Anlagerung des Adaptermoleküls FADD über die DDs und die Rekrutierung der Procaspasen-8/10 über die *death effector domains* (DED). In diesem *death inducing signalling complex* erfolgt die Aktivierung der Procaspasen-8/10, die durch *cellular FLICE-inhibitory proteins* (cFLIPs) modifiziert bzw. inhibiert werden kann. In Typ I-Zellen wird die Effektorcaspase-3 direkt von Caspase-8 gespalten und aktiviert; in Typ II-Zellen führt die Caspase-8/-10-abhängige Bidspaltung zur Verstärkung des Signals über den intrinsischen Apoptoseweg, bei dem die Cytc-Freisetzung aus den Mitochondrien die Apoptosombildung initiiert, die die Caspase-9-, -3- und -7-Aktivierung zur Folge hat. Abbildung modifiziert nach (Falschlehner et al., 2007).

4 Der intrinsische Apoptoseweg

4.1 Mitochondrien und die Aktivierung der Initiatorcaspase-9 am Apoptosom

Intrazelluläre Todessignale, die durch DNA-Schäden, ER- und proteasomalen Stress, Onkogene oder virale Infektionen, aber auch durch den Entzug von Wachstumsfaktoren, den Verlust der Zelladhäsion oder, in Typ II-Zellen, nach Todesrezeptor-Stimulation ausgelöst werden, aktivieren den intrinsischen Apoptoseweg, bei dem die Mitochondrien eine Schlüsselposition besetzen. Cytochrom c (Cytc), ein peripheres Protein der inneren Mitochondrienmembran, übernimmt im Intermembranraum der Organelle lebenswichtige Funktionen beim Elektronentransport der Atmungskette und der Vermeidung von oxidativem Stress. Nach Freisetzung ins Zytosol und Bindung an *apoptotic protease-activating factor-1* (APAF-1) induziert es aber die Bildung des Apoptosoms, an dem Procaspase-9 aktiviert wird (Garrido et al., 2006). APAF-1 besitzt drei funktionelle Domänen, eine N-terminale CARD gefolgt von einer Nukleotidbindungs- und Oligomerisierungsdomäne (NOD) und einer C-terminalen regulatorischen Region, die aus 13 WD40-*repeats* besteht (Zou et al., 1997). Ohne Cytc liegt APAF-1, assoziiert mit dATP, als inaktives, monomeres Molekül vor, dessen regulatorische Region die N-terminale Caspase-Interaktionsdomäne blockiert (Riedl et al., 2005). Die Bindung von Cytc induziert die Hydrolyse des dATPs und eine Konformationsänderung des APAF-1-Moleküls, welche die Autoinhibition aufhebt. dADP wird durch dATP ersetzt und sieben APAF-1-Cytc-Komplexe oligomerisieren zu einer radförmigen Struktur, dem Apoptosom. Dabei bilden die CARD- und NOD-Domänen den zentralen Ring, während die Speichen des Rads aus den WD40-*repeats* mit dem daran gebundenen Cytc bestehen (Acehan et al., 2002; Kim et al., 2005; Yu et al., 2005).

Über die homotypischen Interaktionen der CARDs wird Procaspase-9 zum Apoptosom rekrutiert und dort aktiviert. Der genaue Aktivierungsmechanismus ist noch ungeklärt. Einerseits genügt eine Dimerisierung, die das Apoptosom durch Erhöhung der lokalen

Procaspase-9-Konzentration ermöglicht, um Caspase-9 zu aktivieren (Pop et al., 2006). Andererseits erreicht nur das Apoptosom-assoziierte Caspase-9-Dimer, das sog. Caspase-9-Holoenzym, volle katalytische Aktivität und zeigt erhöhte Affinität für sein physiologisches Substrat, Procaspase-3 (Yin et al., 2006). An dieses Holoenzym werden die Effektorprocaspasen-3 und -7 rekrutiert und durch Spaltung aktiviert, aber auch Caspase-9 prozessiert sich autokatalytisch zwischen der großen (p35) und der kleinen (p12) Untereinheit an Asp^{315} (Li et al., 1997). Dabei wird die Prodomäne nicht entfernt, so dass Caspase-9 ans Apoptosom gebunden bleibt. Neben ihrer eigenen Spaltsequenz enthält Caspase-9 auch eine Erkennungssequenz für Caspase-3. Sobald Caspase-3 aktiviert ist, spaltet sie Caspase-9 nach diesem Aspartatrest (D^{330}), wobei das autokatalytisch gespaltene p35/p12-Caspase-9-Molekül zu einem p35/p10-Dimer und Procaspase-9 zu einem p37/p10-Dimer prozessiert wird (Twiddy and Cain, 2007). Dieser *feedback* Mechanismus erhöht die katalytische Aktivität des Caspase-9-Holoenzyms signifikant, da es die Inhibierung durch *X-linked inhibitor of apoptosis* (XIAP), einem Mitglied der IAP-Familie, verhindert (Denault et al., 2007).

4.2 *Inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs)

Von den acht Mitgliedern der antiapoptotischen IAP-Familie des Menschen, die durch den Besitz von mindestens einer *baculoviral IAP repeat* (BIR)-Domäne gekennzeichnet sind, weist XIAP die effektivste Caspase-regulatorische Aktivität auf. XIAP besitzt drei BIR-Domänen und eine C-terminale *really interesting new gene* (RING)-Domäne und ist als einziger Vertreter der Familie in der Lage, Caspase-3, -7 und -9 *in vivo* direkt zu inhibieren und eine zufällige Aktivierung, die eine irreversible Caspasekaskade auslösen könnte, zu verhindern (Jin and El-Deiry, 2005).

Über die RING-Domäne, die ihrem Träger E3-Ligase-Aktivität verleiht, kann XIAP E2-Ubiquitin-konjugierende Enzyme rekrutieren und eine Mono- oder Polyubiquitinierung von sich selbst und seinen Interaktionspartnern induzieren. Ob die XIAP-vermittelte Ubiquitinierung von Caspasen auch deren Degradierung im Proteasom bewirkt, ist aber noch nicht abschließend geklärt (Eckelman et al., 2006).

An der Inhibierung der katalytischen Aktivität der Caspasen-3 und -7 sind dagegen die BIR2-Domäne und die angrenzende, N-terminale Linkerregion beteiligt, wobei diese Teile des aktiven Zentrums besetzt und so die Substratbindung blockiert (Chai et al., 2001a; Sun et al., 1999). Die BIR3-Domäne und ein C-terminal davon gelegener, helikaler Bereich sind für die Hemmung der Caspase-9 verantwortlich, indem sie die Dimerisierung und das Einnehmen der aktiven Konformation verhindern (Shiozaki et al., 2003; Sun et al., 2000). Dabei bindet XIAP

nicht an die jeweiligen Procaspasen, da das Epitop mit dem *IAP-binding motif* (IBM) erst am neu generierten N-Terminus der kleinen Untereinheit durch den ersten Caspaseprozessierungsschritt entsteht (Srinivasula et al., 2001).
Die Lage des IBM erklärt auch, warum die Caspse-3-Spaltung die katalytische Aktivität des Caspase-9-Holoenzyms erhöht. Da die Caspase-3-Schnittstelle weiter C-terminal positioniert ist, fehlt der so generierten kleinen Caspase-9-Untereinheit das IBM und eine Interaktion mit XIAP ist nicht mehr möglich.

4.3 IAP-Inhibitoren

An der Aufhebung der XIAP-vermittelten Caspaseinhibition sind zwei Proteine beteiligt, die durch einen apoptotischen Stimulus ausgelöst, zusammen mit Cytc aus dem mitochondrialen Intermembranraum freigesetzt werden. Es handelt sich um das homodimere *second mitochondrial activator of caspases* (Smac), in Mäusen als *direct IAP-binding protein with low pI* (DIABLO) bezeichnet, und die homotrimere Serinprotease Omi/*high temperature requirement A2* (HtrA2). Strukturell sonst keine Gemeinsamkeiten aufweisend, besitzen beide Proteine eine N-terminale IBM, über die sie mit den BIR-Domänen von XIAP interagieren und daran gebundene Caspasen verdrängen können (Chai et al., 2000; Du et al., 2000; Verhagen et al., 2002). Zumindest *in vitro* ist Omi außerdem in der Lage, XIAP und einige andere IAPs durch proteolytische Spaltung zu inaktivieren (Srinivasula et al., 2003; Yang et al., 2003).
Neben diesen Caspaseaktivatoren gelangen nach der Apoptoseinduktion weitere Proteine wie *apoptosis-inducing factor* (AIF) und Endonuklease G (EndoG) aus den Mitochondrien über das Zytosol in den Nukleus, wo sie Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung auslösen und einen Caspase-unabhängigen Zelltod induzieren (Li et al., 2001; Susin et al., 1999).

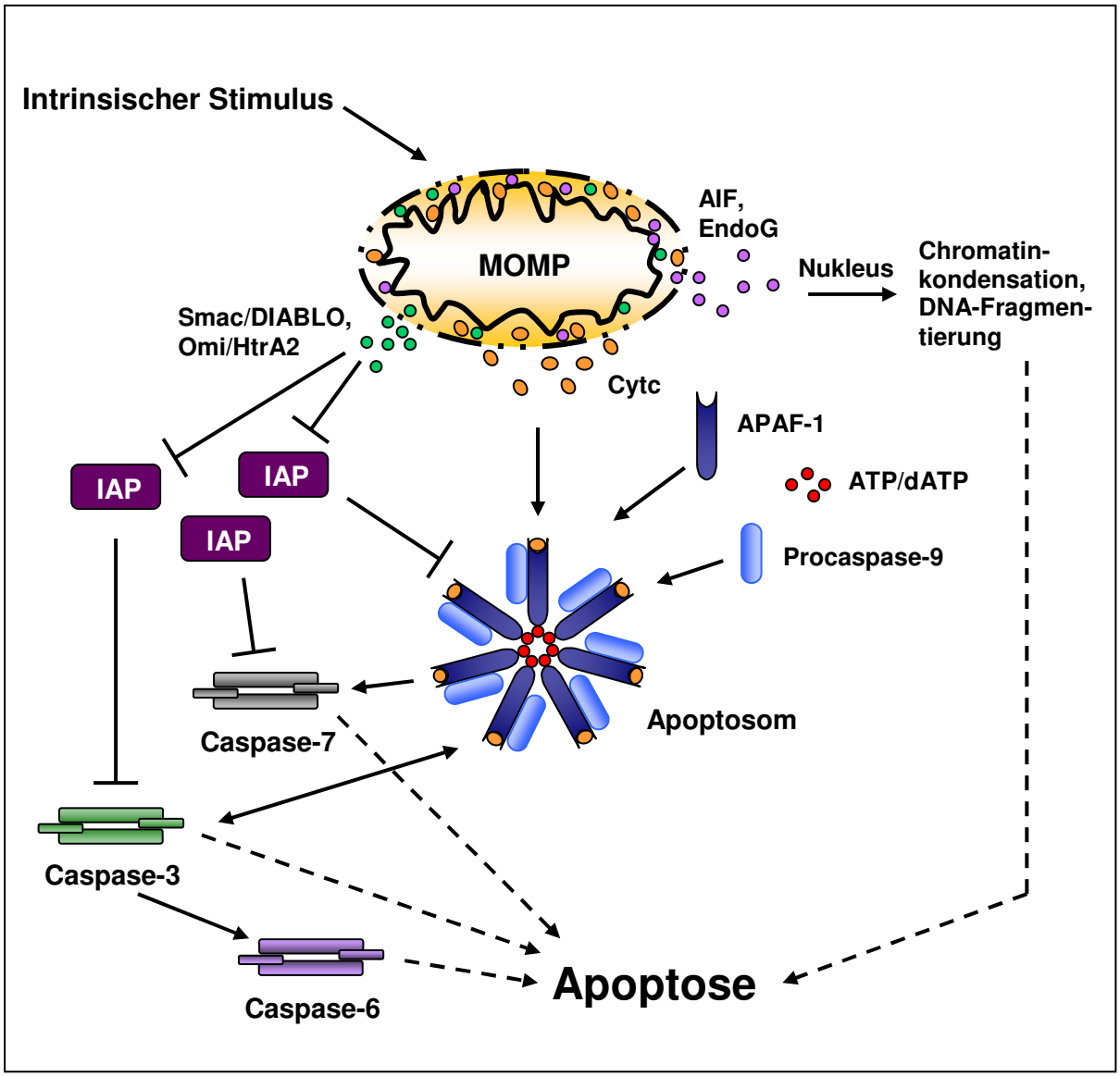

Abbildung 4: Der intrinsische Apoptoseweg.
Intrinsische Apoptosesignale induzieren die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (*mitochondrial outer membrane permeabilisation*, MOMP). Das freigesetzte Cytc bindet im Zytosol an APAF-1 und initiiert die Bildung des Apoptosoms, das als Aktivierungskomplex für Procaspase-9 dient. In einem zweiten Schritt werden die Effektor-Procaspasen-3/-7 zum Apoptosom rekrutiert und ebenfalls aktiviert. Die Freisetzung von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 hebt die Hemmung der Caspasen-3/-7/-9 durch die zelleigenen Caspaseinhibitoren der IAP-Familie auf, während AIF und EndoG in den Nukleus translozieren, wo sie durch Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung einen Caspase-unabhängigen Zelltod auslösen. Abbildung modifiziert nach (Kroemer et al., 2007).

4.4 Bcl-2-Familie

Um die proapoptotischen Proteine des mitochondrialen Intermembranraums freizusetzen und die Caspasekaskade zu initiieren, muss die äußere Mitochondrienmembran permeabilisiert werden (*mitochondrial outer membrane permeabilisation*, MOMP). Dieser Prozess wird von den pro- und antiapoptotischen Mitgliedern der *B-cell lymphoma-2* (Bcl-2)-Familie reguliert,

die sich durch den Besitz einer oder mehrerer, α-helikaler Bcl-2-Homologie (BH)-Domänen auszeichnen. Die BH-Domänen sind für die Struktur und die Funktion bedeutsam, da sie die spezifische Bindung der Mitglieder unter einander ermöglichen, die für die gegenseitige Aktivierung bzw. Inhibierung wichtig ist.

Die Familie wird traditionell unterteilt in eine antiapoptotische Gruppe mit drei oder vier BH-Domänen (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-w, Bcl-B, A1), in eine proapoptotische Gruppe mit mehreren BH-Domänen (Bax, Bak, Bok, Bcl-G, Bfk) und die ebenfalls proapoptotischen BH3-only Proteine, die mit Ausnahme der BH3-Domäne keine strukturellen Gemeinsamkeiten aufweisen (Danial, 2007).

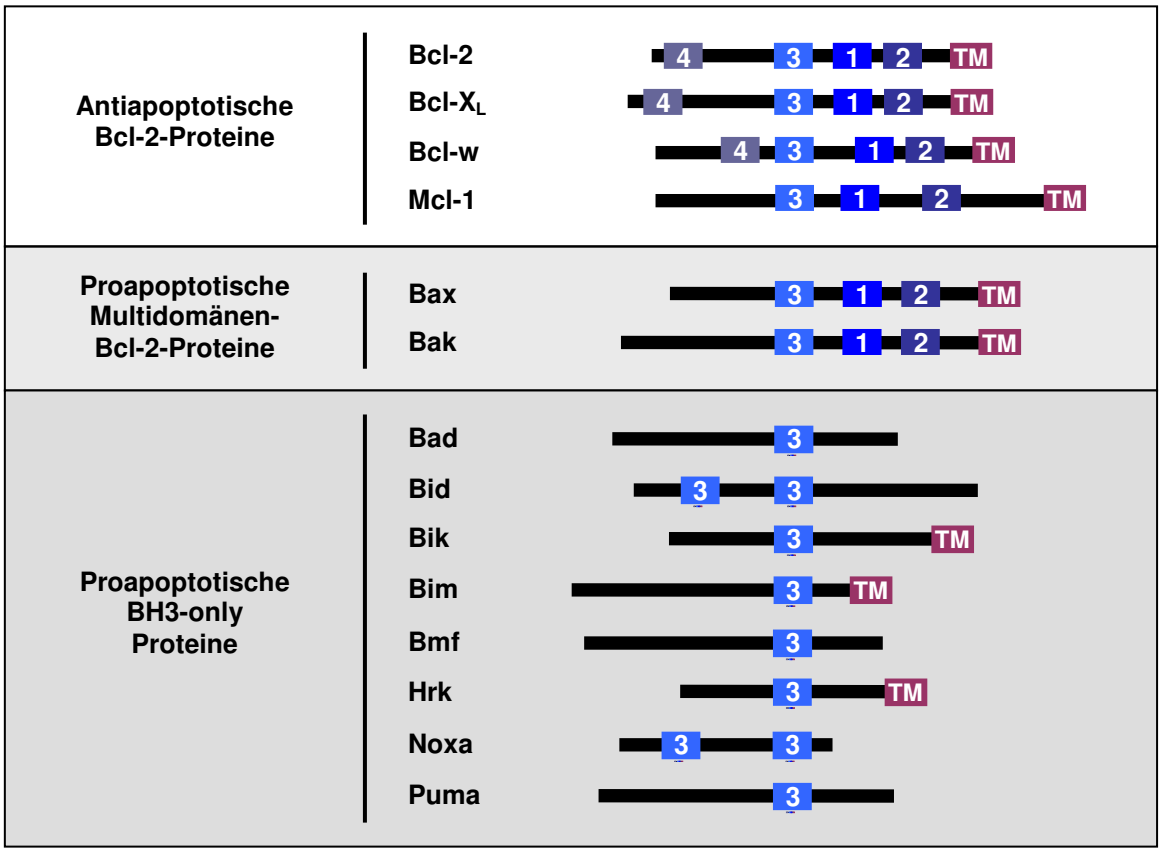

Abbildung 5: Einteilung und Struktur ausgewählter Bcl-2-Mitglieder.
Proteine der Bcl-2-Familie zeichnen sich durch den Besitz mindestens einer Bcl-2-Homologiedomäne (BH-Domäne) aus, die hier durch Nummern gekennzeichnet ist. Die Familie wird in drei funktionelle Gruppen unterteilt, von denen die antiapoptotischen Bcl-2-Mitglieder meist vier BH-Domänen besitzen. Bei den proapoptotischen Vertretern wird zwischen Mitgliedern mit mehreren BH-Domänen (Bak- und Bax-ähnliche Proteine) und BH3-only Proteinen unterschieden, wobei letztere nur Homologie in der namensgebenden BH3-Domäne aufweisen. Die C-terminale Transmembrandomäne (TM) ermöglicht die Insertion in intrazelluläre Membranen. Abbildung modifiziert nach (Hacker and Weber, 2007).

4.4.1 Die proapoptotischen Multidomänenproteine Bax und Bak

Aus der Gruppe der proapoptotischen Multidomänenproteine sind Bax und Bak bisher am besten charakterisiert. In der Hierarchie der Bcl-2-Familie sind sie die Effektoren, da

angenommen wird, dass sie nach Aktivierung durch BH3-only Proteine (siehe S. 18) oligomerisieren und Kanäle in der äußeren Mitochondrienmembran bilden, durch die die Intermembranproteine ins Zytoplasma gelangen können. Diese Poren sind zwar *in vivo* noch nicht genau charakterisiert, aber es wurde gezeigt, dass Bax in isolierten Mitochondrien oder in Liposomen Kanäle formen und Moleküle wie Cytc freisetzen kann (Jurgensmeier et al., 1998; Kuwana et al., 2002). Die Bedeutung von Bax und Bak wird ebenfalls durch genetische Studien unterstützt, da intrinsische Stress-Stimuli oder überexprimierte BH3-only Proteine in Zellen aus Bax-/Bak-Doppel *knock out* Mäusen weder eine Cytc-Freisetzung noch eine postmitochondriale Caspaseaktivierung induzieren können (Wei et al., 2001).

Beide Proteine besitzen die Domänen BH 1-3 und eine C-terminale Transmembrandomäne, die im unstimulierten Bax-Molekül allerdings nicht exponiert, sondern in eine hydrophobe Tasche zurückgefaltet ist, die aus den drei BH-Domänen gebildet wird (Moldoveanu et al., 2006; Suzuki et al., 2000). Das Bax-Monomer liegt deshalb größtenteils zytosolisch vor und nur ein geringer Teil ist in gesunden Zellen membranassoziiert (Hsu and Youle, 1997). Die Aktivierung von Bax beinhaltet eine Konformationsänderung des Moleküls, die Translokation zu den Mitochondrien, die Insertion der nun freigelegten Transmembrandomäne und der porenbildenden Helices-5 und -6 in die äußere Mitochondrienmembran, die Oligomerisierung und die Bildung der Membranpore.

Bak dagegen ist konstitutiv in der äußeren Mitochondrienmembran und am Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und es wird vermutet, dass seine monomere Konformation durch Bindung an Bcl-X_L und Mcl-1 oder durch Interaktion mit dem mitochondrialen Kanalprotein *voltage-dependent anion channel-2* (VDAC-2) stabilisiert wird (Cheng et al., 2003; Willis et al., 2005). Auch aktiviertes Bak ändert seine Konformation und oligomerisiert, um die Membrankanäle zu bilden.

4.4.2 Die antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder

Die dreidimensionale Struktur ist zwischen den antiapoptotischen Mitgliedern Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-w und Bax und Bak konserviert. Wie letztere besitzen sie einen C-terminalen Membrananker und die aus den Domänen BH 1-3 geformte hydrophobe Tasche, die entweder die Transmembrandomäne aufnehmen oder die BH3-Domäne der BH3-only Proteine binden kann. Während Bcl-2 hauptsächlich als integrales Membranprotein des ER, des Nukleus oder der Mitochondrien vorliegt, befinden sich Bcl-X_L, Mcl-1 und Bcl-w in gesunden Zellen im Zytosol und an Membranen assoziiert und translozieren erst im Verlauf der Apoptose zu den Mitochondrien. Die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine verhindern die Permeabilisierung der

äußeren Mitochondrienmembran, wobei die Bindung und Neutralisierung der proapoptotischen Familienmitglieder eine wichtige Rolle spielt. Die Aufgaben der einzelnen antiapoptotischen Proteine gehen allerdings über die Regulation von MOMP hinaus. So kann auch das ER-lokalisierte Bcl-2 Apoptose verhindern und Bcl-2-Überexpression beeinflusst Autophagie und Nekrose (Schwartz and Hockenbery, 2006; Youle and Strasser, 2008).

4.4.3 BH3-only Proteine

Zu den proapoptotischen BH3-only Proteinen gehören u. a. Bad, Bid, Bik/Nbk, Bim/Bod, Bmf, BNIP3, Hrk/DP5, Puma/Bbc3, Noxa und Spike. Sie werden durch extra- und intrazellulär generierte Stress- oder Todessignalkaskaden aktiviert, wobei je nach Stimulus und Zelltyp ein oder mehrere BH3-only Proteine selektiv induziert werden.

Die Aktivität der BH3-only Proteine wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. Zu den posttranskriptionellen Mechanismen zählen Phosphorylierung (Bad, Bid, Bim, Bik), Myristoylierung (Bid), Spaltung durch Proteasen (Bid), Sequestrierung (Bim und Bmf sind über Dynein am Zytoskelett verankert, phosphoryliertes Bad ist mit 14-3-3-Proteinen assoziiert) und Degradierung im Proteasom (Bim, tBid). Transkriptionelle Aktivierung ist besonders für Puma und Noxa bedeutsam, aber auch Bim, Bid und Hrk werden auf diese Weise reguliert (Willis and Adams, 2005).

Die Aufgabe der BH3-only Proteine ist die Weiterleitung der peripheren apoptotischen Signale zu den Mitochondrien durch die Aktivierung von Bax und Bak. Ob es sich dabei um einen direkten oder indirekten Aktivierungsmechanismus handelt, ist noch unklar; entscheidend ist aber der Besitz der amphiphatischen BH3-Domäne, mit der sie die hydrophobe Tasche der Multidomänenproteine binden können.

Mutationsanalysen und Bindungsstudien zwischen BH3-only Proteinen oder Peptiden ihrer BH3-Domänen und den Multidomänenmitgliedern der Familie ergaben, dass trunkiertes Bid (tBid), Bim und vermutlich auch Puma nicht nur alle wichtigen antiapoptotischen Proteine, sondern auch Bax und Bak binden können (Cartron et al., 2004; Chen et al., 2005; Kim et al., 2006; Kuwana et al., 2005). Die anderen BH3-only Proteine dagegen interagieren nur mit manchen anti-, nicht aber mit den proapoptotischen Multidomänenproteinen, weshalb sie geringere proapoptotische Aktivität aufweisen. Aus diesen Ergebnissen werden momentan zwei Modelle abgeleitet, die die Bax-/Bak-Aktivierung erklären sollen. Das sog. indirekte Modell postuliert, dass die Aktivierung von Bax und Bak durch ihre Bindung an antiapoptotische Proteine verhindert wird. Sobald BH3-only Proteine aktiviert werden und mit ihren jeweiligen antiapoptotischen Bindungspartnern interagieren, werden Bax und Bak

verdrängt und erfahren eine Konformationsänderung, die sie zur Oligomerisierung in der mitochondrialen Membran befähigt. Apoptose kann nach diesem Modell stattfinden, wenn die antiapoptotischen Proteine einer Zelle durch die BH3-only Proteine neutralisiert und Bax und Bak freigesetzt werden.

Im direkten Aktivierungsmodell können nur Bid, Bim und vermutlich Puma als sog. Aktivator BH3-only Proteine Bax und Bak durch direkte Bindung aktivieren, sie selbst werden aber von antiapoptotischen Proteinen gebunden und dadurch an der Interaktion mit Bax und Bak gehindert. Die Aufgabe der restlichen BH3-only Proteine, der sog. Derepressoren, ist es daher, die Aktivatoren aus der Bindung an antiapoptotische Mitglieder zu verdrängen. Nach diesem Modell können die Derepressorproteine zwar eine Zelle für MOMP sensitivieren, sind für sich genommen aber zur Apoptoseinduktion nicht in der Lage (Danial, 2007; Letai et al., 2002).

In jedem Fall ist die Entscheidung, ob MOMP stattfinden wird, von der Art des apoptotischen Signals, d. h. welche BH3-only Proteine davon aktiviert werden, und vom zellulären Kontext, d. h. der qualitativen und quantitativen Ausstattung der Zelle mit Multidomänenproteinen, abhängig.

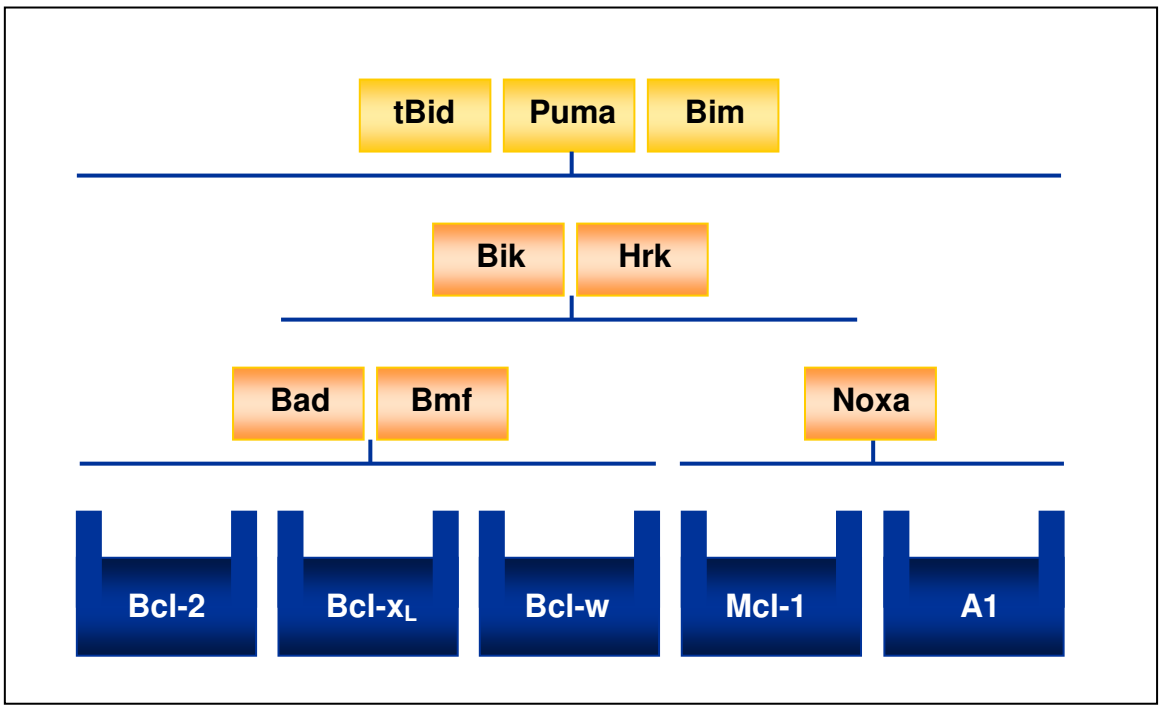

Abbildung 6: Bindungsspezifität wichtiger BH3-only Proteine für die antiapoptotischen Bcl-2-Mitglieder. Eine effektive Apoptoseinduktion korreliert mit der Bindungsspezifität des entsprechenden BH3-only Proteins. tBid, Bim und Puma sind die drei potentesten Vertreter, da sie im Gegensatz zu den übrigen BH3-only Proteinen alle fünf antiapoptotischen Bcl-2-Proteine binden und damit neutralisieren können. Abbildung modifiziert nach (Willis and Adams, 2005).

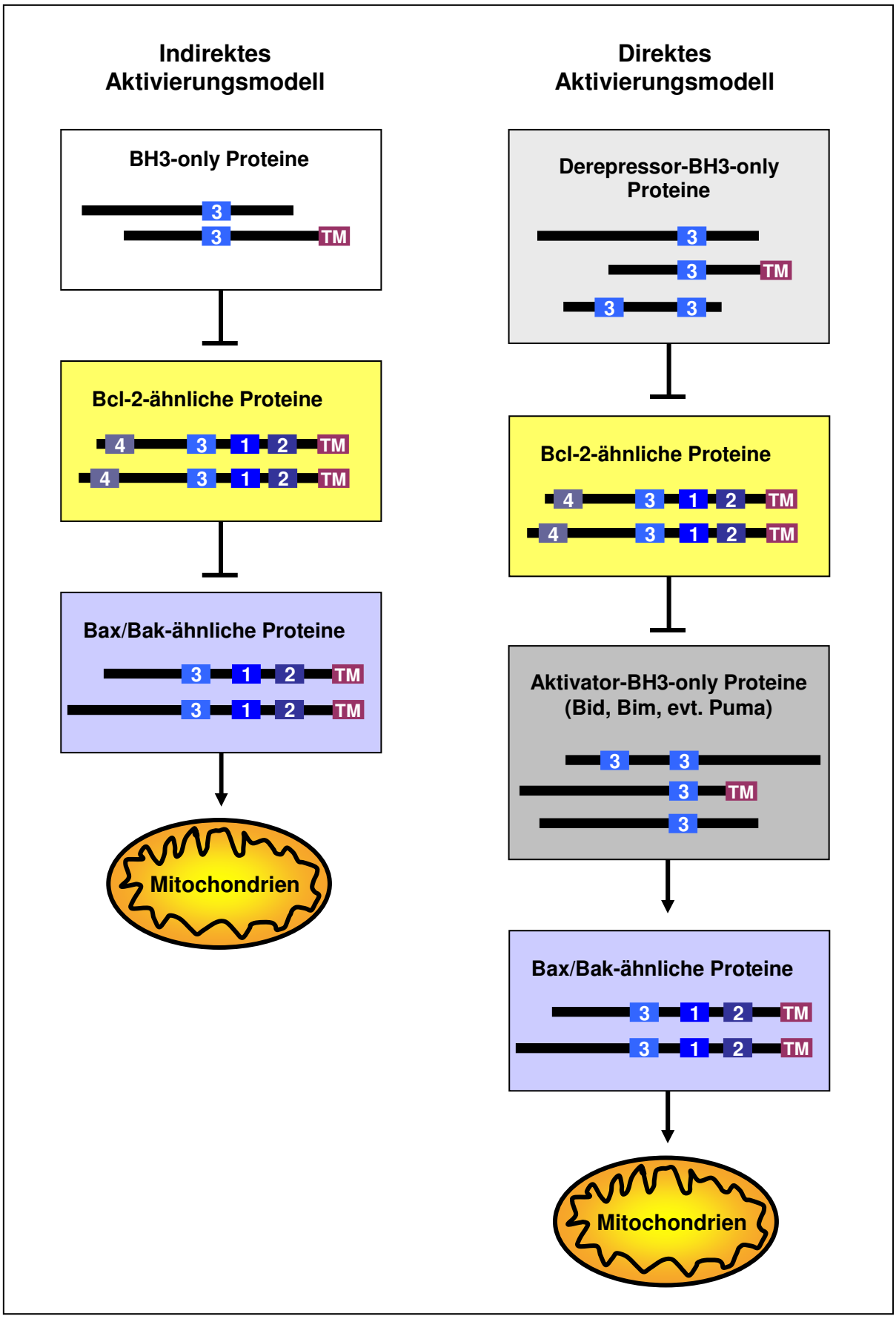

Abbildung 7: Direktes und indirektes Modell der Bak- und Bax-Aktivierung.

Im indirekten Modell sind Bak und Bax an antiapoptotische Bcl-2-Proteine gebunden, um in gesunden Zellen eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (*mitochondrial outer membrane permeabilisation*, MOMP) zu verhindern. Nach ihrer Aktivierung binden BH3-only Proteine an die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine und verdrängen Bak und Bax, die MOMP einleiten. Im direkten Aktivierungsmodell werden bei den BH3-only Proteinen zwei Klassen unterschieden: Derepressor-BH3-only Proteine können nur antiapoptotische Bcl-2-Proteine binden, während die Aktivator-BH3-only Proteine (tBid, Bim, evt. Puma) auch Bak und Bax binden und direkt aktivieren können. In diesem Modell besteht die Hauptaufgabe der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine in der Bindung und Neutralisierung der Aktivator-BH3-only Proteine. MOMP wird ausgelöst, wenn durch die Erhöhung der Anzahl an Aktivator- und/oder Derepressor-BH3-only Proteinen die Bindungskapazität der aniapoptotischen Bcl-2-Mitglieder überschritten wird, so dass Aktivator-BH3-only Proteine freigesetzt werden, um Bax und Bak aktivieren zu können. Abbildung modifiziert nach (Danial, 2007; Galonek and Hardwick, 2006).

4.4.4 Bid

Bid (*BH3-interacting domain death agonist*) zählt zu den BH3-only Proteinen mit der höchsten proapoptotischen Aktivität. Es beeinflusst die Integrität der Mitochondrien auf vielfältige Weise, da es sowohl mit Proteinen als auch Lipiden interagiert und Lipidtransferase-Aktivität besitzt. Am besten charakterisiert ist sein Beitrag zur Bax- und Bak-Aktivierung, ohne die Bid, wie alle anderen BH3-only Proteine auch, nicht in der Lage ist, Cytc-Freisetzung und Caspaseaktivierung zu induzieren (siehe S. 16) (Wei et al., 2001). Es gibt aber zusätzliche Mechanismen, die weniger gut verstanden sind, doch ebenfalls zur Destabilisierung der Mitochondrien beitragen. Bid interagiert mit Cardiolipin, einem in der inneren und an den Kontaktstellen zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran angereicherten Phospholipid und es wird vermutet, dass dies zur Cristae-Reorganisation beiträgt, die für die Mobilisierung des Cytc wichtig ist (Lutter et al., 2000; Scorrano et al., 2002).

Bid ist das einzige BH3-only Protein, das strukturelle Homologie zu den Multidomänenproteinen der Familie aufweist. Es besteht aus acht α-Helices, von denen Helix-6 und -7 das hydrophobe Zentrum bilden, das von den übrigen amphiphatischen Helices umgeben wird (Chou et al., 1999; McDonnell et al., 1999). Ein unstrukturierter Bereich zwischen Helix-2 und -3 ist für die Aktivierung und Regulation von Bid bedeutsam, da dieser Abschnitt die wichtigsten Phosphorylierungs- und Proteaseschnittstellen des Moleküls enthält. Bid besitzt zwar keine Transmembrandomäne und ist in gesunden Zellen im Zytosol und zu einem geringeren Teil auch im Nukleus lokalisiert, nach der Aktivierung transloziert es aber zu den Mitochondrien, wo es in die äußere Membran inseriert. Teile von Helix-2 und -3 bilden jeweils eine BH3-Domäne, von denen die weiter C-terminal gelegene die kanonische BH3-Domäne darstellt, deren proapoptotische Aktivität im unstimulierten Bidmolekül vermutlich durch Bindung an die N-terminale BH3-Domäne unterdrückt wird (Tait et al., 2007; Tan et al., 1999).

Dies könnte erklären, warum ungeschnittenes, sog. *full length* (FL)-Bid geringe apoptotische Aktivität aufweist. Die Überexpression von FL-Bid induziert zwar Apoptose und neuere Studien zeigen, dass die ungeschnittene Form den exzitotoxischen Zelltod von Neuronen (Konig et al., 2007; Ward et al., 2006) und die Apoptose von Epithelzellen nach Adhäsionsverlust (Anoikis) vermittelt (Valentijn and Gilmore, 2004), aber Protease-gespaltenes, trunkiertes Bid ist vielfach potenter. Durch die limitierte Proteolyse wird der kleinere N-terminale Teil mit der ersten BH3-Domäne abgetrennt und die kanonische BH3-Domäne des C-terminalen Teils kann nun mit den Multidomänenproteinen der Bcl-2-Familie interagieren.

Falls das Bidmolekül von Caspasen prozessiert wird, die nach Asp^{59} (in der Maus) bzw. nach Asp^{60} (im Menschen) schneiden, wird der neue N-Terminus von einem Glycinrest gebildet, der myristoyliert wird. Diese zusätzliche Modifikation, die die Affinität des Bidmoleküls für Membranen erhöht und die Translokation zu den Mitochondrien beschleunigt, steigert die proapoptotische Aktivität nochmals beträchtlich (Zha et al., 2000).

Die Bedeutung des Protease-gespaltenen Bidmoleküls für die Propagierung des apoptotischen Signals wurde erstmals in der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose deutlich (Li et al., 1998). In Typ II-Zellen kann Initiatorcaspase-8 nicht genügend Effektorcaspasen direkt aktivieren, aber über Caspase-8-prozessiertes Bid (tBid) wird auch der mitochondriale Apoptoseweg eingeschaltet, der für eine Verstärkung des Signals sorgt. Bestätigt wurden diese *in vitro*-Befunde in Bid *knock out* Mäusen, deren Hepatozyten im Gegensatz zu wt-Tieren auf Fas-Stimulation nicht mit Cytc- und Smac-Freisetzung reagieren, keine Effektorcaspasen aktivieren und die Behandlung deshalb überleben (Yin et al., 1999).

Neben Caspase-8 wurden die Caspasen-2, -3 und -10 als Bid-spaltende Proteasen identifiziert. Caspase-10 wird nach Todesrezeptor-Stimulation aktiviert, aber noch ist umstritten, ob sie Caspase-8 als Initiatorcaspase des extrinsischen Wegs ersetzen kann (Milhas et al., 2005; Sprick et al., 2002). Ebenfalls ungeklärt ist der Beitrag des Caspase-2-prozessierten Bidmoleküls für die Initiation des mitochondrialen Wegs, das Zelltyp-abhängig nach Hitzeschock oder TRAIL-Behandlung beteiligt sein soll (Bonzon et al., 2006; Wagner et al., 2004). Eine Caspase-3-vermittelte Spaltung von Bid dagegen erfolgt in den meisten Fällen postmitochondrial und dient der Amplifizierung unterschiedlicher Apoptosesignale (Slee et al., 2000).

Das Bidmolekül enthält drei Caspaseschnittstellen und alle erwähnten Caspasen können nach der am weitesten N-terminal gelegenen Hauptschnittstelle $LQTD^{60}$ schneiden (Gross et al., 1999; Li et al., 1998). Dabei wird das p15-Bidfragment generiert, das auch myristoyliert wird.

Ein weiter C-terminal gelegenes Motiv, IEAD[75], wird nur von Caspase-10 prozessiert und dieses p13-Fragment ist ebenfalls proapoptotisch (Fischer et al., 2006). Die Tetrapeptidsequenz DSMD[98] wird vermutlich von Caspase-3 erkannt, wobei dem entstehenden C-terminalen Bidfragment p11 allerdings beide BH3-Domänen fehlen (Gross et al., 1999).

Weitere Proteasen, die das Bidmolekül durch limitierte Spaltung im unstrukturierten Bereich zwischen Helix-2 und -3 aktivieren, sind die lysosomalen Kathepsine (Cirman et al., 2004; Stoka et al., 2001), die von zytotoxischen T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen freigesetzten Serinproteasen Granzym B, H und K (Barry et al., 2000; Hou et al., 2008; Zhao et al., 2007) und die Ca^{2+}-abhängigen Cysteinproteasen µ- und m-Calpain (Chen et al., 2001; Mandic et al., 2002).

Weitere Komplexizität entsteht durch Kinasen (z. B. Proteinkinase CK1 und CK2), die Bid in der unstrukturierten Region phosphorylieren und dadurch Proteaseschnittstellen maskieren können (Degli Esposti et al., 2003; Desagher et al., 2001). ATM- und ATR-Kinase-vermittelte Phosphorylierung dagegen ist für die Zellzyklusregulation wichtig, an der Bid nach DNA-Schädigung beteiligt ist (Kamer et al., 2005; Zinkel et al., 2005).

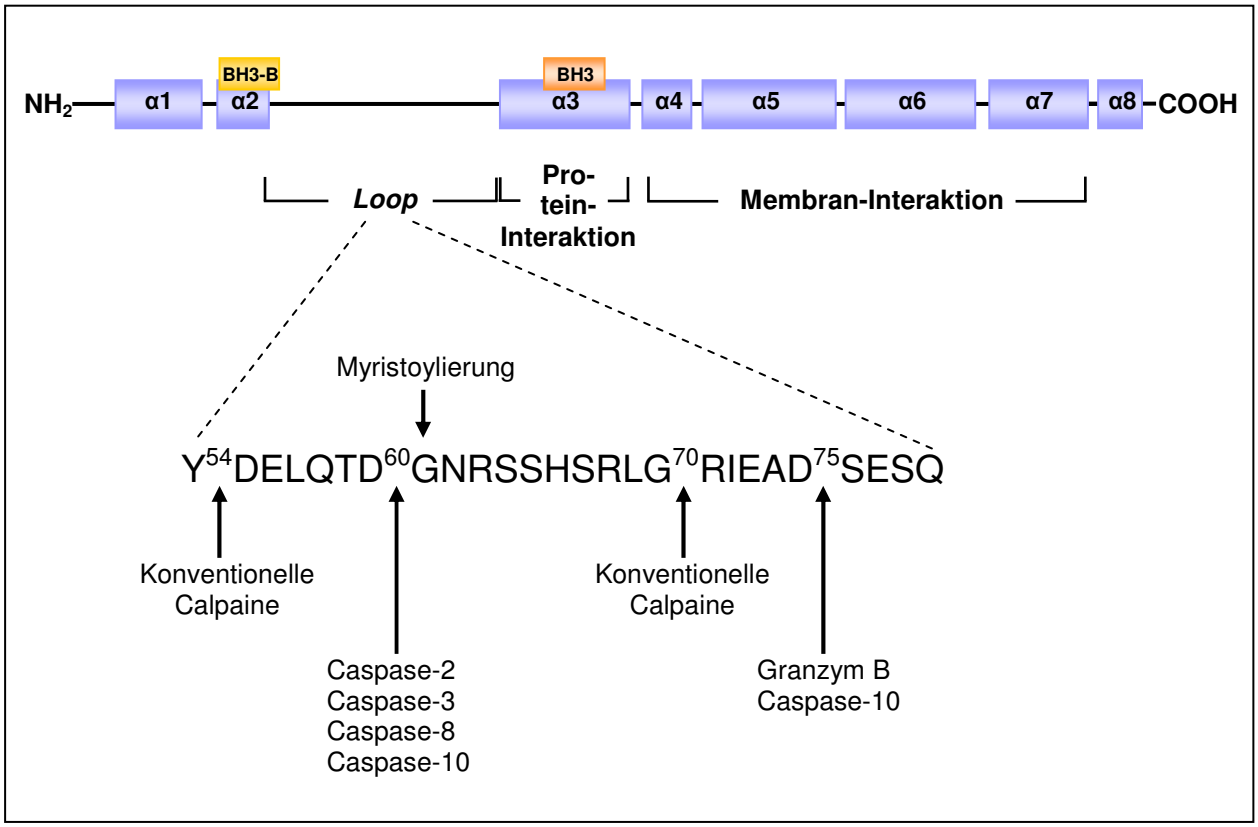

Abbildung 8: Struktur des humanen Bidmoleküls.
Bid besteht aus 8 α-Helices, von denen die Helices-4 bis -7 für die Insertion in die Mitochondrienmembran notwendig sind. Helix-3 enthält die kanonische BH3-Domäne, die die Interaktion mit anderen Mitgliedern der Bcl-2-Familie ermöglicht. In der unstrukturierten Region (*Loop*) zwischen Helix-2 und -3 befinden sich wichtige

Proteaseschnittstellen. Die für diese Arbeit relevanten Caspase- und Calpainschnittstellen sind durch Pfeile hervorgehoben. Die Caspasespaltung nach D^{60} erzeugt ein Bidfragment, das an seinem neuen N-Terminus myristoyliert wird. Abbildung modifiziert nach (Yin, 2006).

5 Calpaine

Obwohl unter den zellulären Proteasen Caspasen den wichtigsten Beitrag zur Apoptose leisten, sind Zelltyp- und Stimulus-abhängig weitere Proteasen beteiligt. Dazu zählen die Ca^{2+}-abhängigen Cysteinproteasen der Calpainfamilie (*calcium-dependent papain-like cysteine proteases*), die in Säugern 14 Mitglieder umfasst, von denen einige Gewebe-spezifisch und andere ubiquitär exprimiert werden. Zu den ubiquitären Calpainen gehören µ- und m-Calpain, die bisher auch am besten charakterisiert sind. Beide sind Heterodimere, die aus einer identischen kleinen Untereinheit (28 kD, das sog. Calpain-4) und einer je 80 kD großen Untereinheit bestehen (Liu et al., 2004). Letztere wird zwar von unterschiedlichen Genen kodiert, weist aber innerhalb einer Spezies eine 55- 65% Sequenzhomologie auf und wird im Falle des µ-Calpains als Calpain-1 und bei m-Calpain als Calpain-2 bezeichnet. Die große Untereinheit enthält neben dem aktiven Zentrum Spezies-abhängig auch fünf bis sechs EF-Hand-Sequenzen, konservierte Helix-*Loop*-Helix-Motive, die für die Ca^{2+}-Bindung, Dimerisierung und Membranassoziation wichtig sind. Auch die kleine Untereinheit ist ein Penta-EF-Hand-Protein und trägt zur Ca^{2+}-Bindung bei (Goll et al., 2003).

Ohne gebundenes Ca^{2+} liegen µ- und m-Calpain in der Zelle inaktiv, meist an Strukturen des Zytoskeletts assoziiert, vor. Erst das Besetzen multipler Ca^{2+}-Bindungsstellen induziert eine Konformationsänderung und die Aktivierung der Proteaseaktivität. Dabei sind die *in vitro* gemessenen Ca^{2+}-Konzentrationen für die halbmaximale Aktivität sehr hoch (3-50 µM für µ-Calpain bzw. 400-800 µM für m-Calpain) und übersteigen die physiologische Ca^{2+}-Konzentration des Zytosols (50-300 nM) deutlich. Der genaue Aktivierungsprozess ist deshalb noch unklar, aber es werden verschiedene Mechanismen diskutiert, die den Ca^{2+}-Bedarf reduzieren bzw. zur Aktivierung beitragen könnten. Dazu zählen ein Anstieg der lokalen zytosolischen Ca^{2+}-Konzentration, Veränderungen in der subzellulären Lokalisierung der Calpaine, verringerte Mengen des zelleigenen, spezifischen Calpaininhibitors Calpastatin, Autolyse und Phosphorylierung der Calpaine und Interaktion mit Aktivatorproteinen (Goll et al., 2003).

Ca^{2+}-Bindung induziert neben der aktivierenden Konformationsänderung auch eine Autolyse der großen und der kleinen Untereinheit. Die Autolyse ist vermutlich regulatorisch bedeutsam, da sie einerseits den Ca^{2+}-Bedarf für die Aktivierung senkt, andererseits bei Fortschreiten des Prozesses inaktive Fragmente generiert (Goll et al., 2003).

Die Beteiligung des µ- und m-Calpains an der Apoptoseregulation ist vielfältig und kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen. Dabei scheint es Zelltyp- und Stimulus-spezifisch zu sein, ob Calpaine Zelltod oder Überleben fördern und ob sie im proapoptotischen Fall zur Initiation oder durch die Proteolyse ausgewählter Substrate zur Amplifizierung des apoptotischen Signals oder zum zellulären Degradierungsprozess beitragen.
Zu den Apoptose vermittelnden Substraten der Calpaine zählen u. a. Caspasen und Mitglieder der Bcl-2-Familie (siehe S. 21). Für letztere wurden bisher ausschließlich Apoptose fördernde Effekte beschrieben, denn Calpain-prozessiertes Bid oder Bax weisen eine höhere apoptotische Aktivität als die ungeschnittenen Proteine auf, und die Prozessierung der antiapoptotischen Bcl-2- und Bcl-X_L-Moleküle generiert proapoptotische Spaltfragmente (Chen et al., 2001; Gil-Parrado et al., 2002; Wood et al., 1998). Die Spaltung der Caspasen dagegen führt in den meisten Fällen zu ihrer Inaktivierung, der gegenteilige Effekt konnte aber für Caspase-3 und -12 gezeigt werden (Blomgren et al., 2001; Chua et al., 2000; Nakagawa and Yuan, 2000).

6 Apoptoseresistenz und Kanzerogenese

Die maligne Transformation einer Zelle erfolgt in einem mehrstufigen Prozess, bei dem (epi-) genetische Veränderungen in kritischen regulatorischen Genen akkumulieren, die eine gesteigerte Proliferation und Überlebensrate der Zelle zur Folge haben.
Apoptoseresistenz ist ein wichtiges Charakteristikum von Tumorzellen, da das Ausschalten apoptotischer Signalkaskaden das Überleben in Gegenwart deregulierter Onkogene und unkontrollierter Proliferation ermöglicht bzw. eine erhöhte Zellviabilität das Akkumulieren weiterer Mutationen erleichtert (Hanahan and Weinberg, 2000). Die molekularen Zusammenhänge zwischen defekter Apoptoseregulation und Kanzerogenese wurden erstmals bei Untersuchungen zum transformierenden Potential des Bcl-2-Proteins ersichtlich. Die Bcl-2-Expression ist in ca. 85% aller follikulären B-Zell-Lymphome dereguliert, da das Gen durch eine chromosomale Translokation in die J-Region der schweren Immunglobulinkette versetzt wird. Die erhöhte Expression des Bcl-2-Proteins fördert im Gegensatz zu klassischen Onkogenen nicht das Wachstum, sondern sichert das Überleben durch Hemmung des intrinsischen Apoptosewegs (Hockenbery et al., 1990; Tsujimoto et al., 1985; Vaux et al., 1988). Neben der gesteigerten Aktivität antiapoptotischer Proteine, die den ex- oder intrinsischen Apoptoseweg modifizieren (siehe S. 9, 13, 17) trägt auch die Inaktivierung proapoptotischer Faktoren wie der BH3-only Proteine zur Tumorgenese bei (Labi et al., 2006).

Die Inhibierung apoptotischer Signalkaskaden in Tumorzellen ist häufig die Ursache für Therapieresistenz, da die meisten Chemotherapeutika ihre Wirkung durch Apoptoseinduktion entfalten. Neuere Erkenntnisse über die Aktivität und Interaktion der Apoptoseregulatoren ermöglicht allerdings auch die gezielte Beeinflussung modifizierter Signalkaskaden in Tumorzellen und bietet Ansatzpunkte für therapeutische Strategien, welche die Sensitivität für chemotherapeutische Agenzien erhöhen und die Zelltodrate steigern können.

6.1 Neue Therapieansätze in der Tumorbekämpfung

6.1.1 Todesrezeptoren

Seit der ersten Charakterisierung eines *death domain*-enthaltenden Rezeptors, des TNF-R1, werden Todesrezeptoren und ihre Liganden auf ihre Einsatzmöglichkeiten in der Tumortherapie getestet. Obwohl die Aktivierung proinflammatorischer Genexpression die wichtigste physiologische Funktion darstellt, kann über TNF-R1 auch Apoptose induziert werden. Die klinische Verwendung wird allerdings durch die Toxizität limitiert, da TNF-α bei systemischer Applikation ein Entzündungssyndrom auslöst, das dem septischen Schock ähnelt. Bei lokaler Anwendung dagegen, z. B. der isolierten Extremitätenperfusion, verbessert es aufgrund seiner Wirkung auf die Endothelzellen den Zugang koapplizierter Chemotherapeutika zum Tumor und zerstört die Tumorvaskulatur (Lejeune and Ruegg, 2006).

Stimulation des Todesrezeptors Fas mit agonistischen Antikörpern oder dem FasL induziert in verschiedenen Tumorzelllinien sehr effizient Apoptose, doch die hohe Hepatotoxizität begrenzt seinen Einsatz in der Krebstherapie (Ogasawara et al., 1993).

Erfolgversprechender ist die Aktivierung des TRAIL-abhängigen Todesrezeptorwegs, da dieses Zytokin in zahlreichen Tumorzelllinien und auch in murinen Xenograftmodellen Apoptose auslöst (Wajant et al., 2005). *In vitro*-Experimente zeigen, dass die Schädigung untransformierter humaner Zellen von den verwendeten TRAIL-Derivaten abhängt (Lawrence et al., 2001). Rekombinantes TRAIL, das aufgrund von FLAG- und Polyhistidinmarkierungen, Leucin- oder Isoleucinzipper-Trimerisierungsdomänen oder des verwendeten Aufreinigungsprotokolls hochmolekulare Komplexe bildet, ist auch für normale Zellen toxisch (Koschny et al., 2007). Trimerisiertes, natives TRAIL dagegen zeichnet sich durch geringe Toxizität für untransformierten Zellen, aber auch eine niedrigere Anti-Tumoreffektivität aus (Ganten et al., 2006). Die Toxizität einiger TRAIL-Derivate könnte zumindest teilweise auf Zellkulturartefakte zurückzuführen sein, denn *in vivo*-Applikation

von TRAIL sowohl in Mäusen als auch Primaten ergab keine systemische Toxizität (Ashkenazi et al., 1999).

Ebenfalls untersucht werden agonistische Antikörper für die TRAIL-Rezeptoren-1/-2. Diese ermöglichen eine selektive Aktivierung der TRAIL-spezifischen Todesrezeptoren unter Umgehung der TRAIL-neutralisierenden *Decoy*-Rezeptoren und weisen außerdem eine längere Halbwertszeit als das Zytokin selbst auf (Koschny et al., 2007). Sowohl rekombinantes, lösliches TRAIL (PRO1762) als auch TRAIL-Rezeptor-1 (HGS-ETR1) oder -2 (HGS-TR2J, HGS-ETR2, Apomab, AMG–655) spezifische Antikörper befinden sich momentan in Phase I oder II klinischer Studien (Ashkenazi and Herbst, 2008).

Dennoch mehren sich Untersuchungen, die eine Resistenz primärer humaner Tumore gegen eine TRAIL-Monotherapie nachweisen. Präklinische Studien konzentrieren sich deshalb auf Kombinationstherapien mit chemotherapeutischen Agenzien (u. a. gentoxische Substanzen, Proteasom- und Histondeacetylase-Inhibitoren) oder γ-Strahlung, um Tumorzellen für eine TRAIL-Behandlung zu sensitivieren, ohne gesundes Gewebe in Mitleidenschaft zu ziehen (Koschny et al., 2007).

6.1.2 Proteasominhibitoren

Das Proteasom, ein 2,4 MDa Multienzymkomplex im Nukleus und im Zytoplasma eukaryontischer Zellen lokalisiert, ist für den Abbau der meisten intrazellulären Proteine verantwortlich. Zu seinen Substraten zählen wichtige Regulatoren des Zellzyklus und der Apoptose, deren Stabilität und Aktivität nicht zuletzt über die proteasomale Degradierung gesteuert werden, so dass eine Inhibierung des Proteasoms essentielle zelluläre Funktionen beeinträchtigt und Apoptose induziert (Naujokat and Hoffmann, 2002). Obwohl eine geordnete Proteindegradierung für das Aufrechterhalten geordneter Abläufe in allen Zellen erforderlich ist, ergaben mehrere Studien eine höhere Suszeptibilität transformierter als untransformierter Zellen gegenüber Proteasominhibition (Adams, 2004). Verschiedene Mechanismen tragen dazu, je nach Art des Tumors, in unterschiedlichem Umfang bei.

Tumorzellen weisen häufig eine defekte Zellzykluskontrolle, eine hohe Proliferation und damit einhergehend eine hohe Proteinsyntheserate auf. Letztere ist fehleranfällig und da das Akkumulieren mutanter oder falsch bzw. ungefalteter Proteine Zelltodmechanismen aktiviert (siehe S. 85), sind transformierte Zellen zur Entsorgung nicht-funktioneller Proteine auf ein funktionsfähiges Proteasom angewiesen (Taylor et al., 2005). In der Tat zeichnen sich viele Tumorzellen durch eine gesteigerte Expression proteasomaler Untereinheiten und eine erhöhte Proteasomaktivität aus, aber eine geringe Teilungsrate bietet Tumoren nicht

automatisch Protektion vor PI-induzierter Apoptose. Für transformierte Zellen ist das Proteasom auch zur Beseitigung antiproliferativer und proapoptotischer Proteine essentiell, die sich nach einem Ausfall proteasomaler Funktionen anstauen und ggf. Defekte in der Zellzykluskontrolle oder Apoptosesuppression kompensieren können. Beispiele dafür sind die *cyclin dependent kinase* (CDK)-Inhibitoren p21 und p27, der Tumorsuppressor p53 und proapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie wie Bax, Bid, Bik oder Bim (siehe S. 16, 18, 21), die durch Proteasominhibition stabilisiert werden und Zellzyklusarrest oder Apoptoseresensitivierung vermitteln können. Ein weiterer Effekt der Proteasomhemmung ist das Unterbrechen antiapoptotischer Signalkaskaden. Die Transkriptionsfaktoren der NF-κB Familie werden durch proteasomale Degradierung ihres Inhibitors I-κB aktiviert. Freigesetztes NF-κB induziert die Expression antiapoptotischer Gene, u. a. die Multidomänen-Bcl-2-Mitglieder Bcl-2, Bcl-X_L und A1 und Caspaseinhibitoren der IAP-Familie sowie cFLIP (siehe S. 9, 13, 15) und fördert Tumormetastasierung und Angiogenese durch die Induktion von Zelladhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren (Adams, 2004; Taylor et al., 2005).

Da das Proteasom auf vielfältige Weise das Wachstum und die Ausbreitung von Tumoren beeinflusst, wurden PI als neue Tumortherapeutika entwickelt. Der erste Vertreter dieser Substanzklasse ist Bortezomib (Velcade, PS-341), der in Europa seit 2004 als Rezidivtherapie für das multiple Myelom zugelassen ist und derzeit in mehreren klinischen Studien auf die Wirksamkeit gegenüber anderen Tumorarten geprüft wird (Adams et al., 1999; Hideshima et al., 2001; Kane et al., 2003; Orlowski, 2005; Richardson et al., 2005).

Gegenüber einer Monotherapie kann eine Kombination von PI mit zytotoxischen Agenzien, die andere Wirkmechanismen besitzen, eine weitere Verbesserung der Anti-Tumor-Aktivität bewirken. Bortezomib-Exposition kann resistente Tumorzellen *in vitro* und in Xenograft-Modellen für konventionelle Chemo- und Strahlentherapie sensitivieren (Boccadoro et al., 2005). Auch neue Therapieansätze, z. B. eine Kombination mit dem Todesrezeptor-Liganden TRAIL oder BH3-*mimetics*, sind vielversprechend (Fennell et al., 2008; Hetschko et al., 2008).

6.1.3 Platinderivate

Unter den DNA-schädigenden Zytostatika nehmen Platinverbindungen, in Mono- oder Kombinationstherapie verabreicht, in vielen Behandlungsschemata einen wichtigen Stellenwert ein. Cisplatin (cis-Diammindichloroplatin(II)) ist die erste, in der Klinik seit 1978 verwendete Substanz dieser Verbindungsklasse, welche die Prognose besonders für

Hodentumore deutlich verbessern konnte, aber u. a. auch für die Behandlung des Zervix-, des nichtkleinzelligen Bronchial-, Prostata-, Blasen- und des Ovarialkarzinoms eingesetzt wird. Einige Tumore sprechen auf Cisplatin allerdings nicht an und die Einsatzmöglichkeiten werden auch durch die Nebenwirkungen, besonders Neuro-, Nephro- und Ototoxizität, beschränkt (Kweekel et al., 2005).

Die Suche nach potenten und besser verträglichen Platinverbindungen führte 1999 in Europa zur Zulassung von Oxaliplatin (Kweekel et al., 2005). Bei dieser Substanz ist die Abgangsgruppe, die Chloridionen des Cisplatins, durch Oxalat ausgetauscht, was die intrazelluläre und Gewebeverteilung beeinflusst. Außerdem sind die NH3-Liganden des Cisplatins durch das sperrigere und hydrophobere 1,2-Diaminocyclohexan (DACH) substituiert. Dies verändert die Struktur der Platin-DNA-Addukte, so dass Oxaliplatin im Vergleich zu Cisplatin ein etwas anderes Wirkungs- und Resistenzspektrum aufweist (O'Dwyer et al., 2000; Raymond et al., 2002).

Oxaliplatin ist in zahlreichen Tumormodellen *in vitro* und *in vivo* (u. a. Kolon-, Brust-, Ovarial-, Lungen-, Nierenkarzinom, Melanom, Glioblastom) wirksam und zeigt dabei nur eine geringe Kreuzresistenz zu Cisplatin (Rixe et al., 1996; Tashiro et al., 1989). Ein wichtiges Beispiel ist das metastasierende Kolonkarzinom, das mit Platinverbindungen der ersten (Cisplatin) und der zweiten (Carboplatin) Generation nicht zu therapieren ist, auf Oxaliplatin in Kombination mit 5-Fluorouracil und Calciumfolinat aber anspricht (Ibrahim et al., 2004).

Es wird angenommen, dass die zytotoxische Aktivität der Platinverbindungen im Wesentlichen auf der Ausbildung von Platin-DNA-Addukten beruht, die die dreidimensionale Struktur der DNA modifizieren und DNA-Synthese, -Reparatur und die Transkription blockieren. Sowohl Cis- als auch Oxaliplatin reagieren bevorzugt mit der N-7 Position des Guanins oder Adenins und bilden in einem zweiten Schritt Intrastrang-Kreuzvernetzungen zwischen benachbarten Guanin- oder Guanin- und Adeninbasen aus. Interstrang-*crosslinks* oder kovalente Bindungen zwischen DNA und Proteinen kommen bei beiden Substanzen dagegen seltener vor (Raymond et al., 2002; Saris et al., 1996).

Bei Verwendung äquimolarer Dosen bildet Oxaliplatin quantitativ weniger DNA-Addukte als Cisplatin aus (Saris et al., 1996; Woynarowski et al., 2000). Dass Oxaliplatin trotzdem eine höhere Zytotoxizität aufweist, wird auf die Eigenschaften des DACH-Liganden zurückgeführt. Dieser führt im Vergleich mit den Cisplatin-Addukten zu einer vermehrten Distortion der DNA, so dass sterische Behinderungen zunehmen (Boudny et al., 1992; Page et al., 1990).

Der DACH-Ligand ist außerdem für die unterschiedliche Aktivierung der DNA-Reparatursysteme nach Cis- und Oxaliplatinexposition verantwortlich. Während die DNA-Schäden beider Substanzen vom Nukleotid-Exzisions-Reparatursystem erkannt werden, binden die Proteine des *mismatch*-Reparatursystems nur an Cisplatin-Addukte (Fink et al., 1996; Raymond et al., 2002).

Zusätzlich zu den DNA-Schäden können Platinverbindugen auch mit RNA und schwefelhaltigen AS reagieren und dadurch ihre zytotoxische Wirkung verstärken. Für Oxaliplatin wurde sowohl eine Hemmung der RNA-Synthese *in vitro* als auch eine hohe Proteinbindungsrate nachgewiesen, wobei sich Oxaliplatin (aufgrund des hydrophoberen DACH-Liganden) und das polarere Cisplatin in ihren Bindungspräferenz unterscheiden könnten (Raymond et al., 2002).

II. Zielsetzung

In vielzelligen Organismen stellt Apoptose den wichtigsten intrinsischen Mechanismus zur Beseitigung defekter oder entarteter Zellen dar. Da die Wirkung der meisten Chemotherapeutika ebenfalls auf Apoptoseinduktion in den Tumorzellen beruht, Apoptoseresistenz aber gleichzeitig ein Charakteristikum der Tumorentstehung und -erhaltung darstellt, ist die Kenntnis der von den chemotherapeutischen Agenzien induzierten Signalkaskaden für eine gezielte therapeutische Intervention oder für die Resensitivierung resistenter Zellen durch geeignete Wirkstoff-Kombinationen von entscheidender Bedeutung.

Wichtige Regulatoren der mitochondrialen Apoptose sind die Proteine der Bcl-2-Familie, von denen die proapoptotischen BH3-only Proteine als Sensoren für zelluläre Schädigung dienen. Von peripheren Stress-Signalen aktiviert, interagieren sie mit den Multidomänenproteinen der Bcl-2-Familie und induzieren die Freisetzung Caspase-aktivierender Proteine aus den Mitochondrien.

Bid zählt zu den potentesten BH3-only Proteinen und wird von vielen transformierten und nichttransformierten Zellen konstitutiv exprimiert. Ziel dieser Arbeit war es, in einem gut etablierten Modellsystem, in humanen HeLa-Zervixkarzinomzellen, Bid durch RNA-Interferenz stabil zu depletieren, um Bid-abhängige Apoptosewege zu identifizieren. Zunächst wurden Todesrezeptor-Liganden eingesetzt, die einerseits die Funktionalität des Bid *knock downs* bestätigen können, da der Beitrag dieses BH3-only Proteins für den extrinsischen Apoptoseweg in Typ II-Zellen gut charakterisiert ist. Andererseits ist der Todesrezeptor-Ligand TRAIL, besonders in Kombination mit intrinsisch wirkenden Agenzien, ein vielversprechender Kandidat für neue Therapien. Deshalb wurde nicht nur die Sensitivität Bid-depletierter Zellen gegenüber intrinsischen Stress-Stimuli wie Proteinkinase-Inhibition und ER- oder Proteasomstress untersucht, sondern auch, ob Bid für die potenzierende Wirkung kombinierter ER Stress- und TRAIL-Behandlung notwendig ist.

Chemotherapeutika wie die Topoisomerase-Inhibitoren Etoposid und Doxorubicin oder die Platinverbindung Oxaliplatin induzieren Apoptose durch Schädigung der DNA. Da die Rolle von Bid bei gentoxischem Stress besonders kontrovers diskutiert wird, wurde im letzten Teil der Arbeit die Bedeutung der Biddepletion für die Apoptose nach DNA-Schädigung sowie Mechanismen der Bidaktivierung nach gentoxischem Stress untersucht.

III. Material und Methoden

1 Material

1.1 Zelllinien

Name	Klone dieser Zelllinien	Beschreibung
HeLa		Humane Zervixkarzinom-Zelllinie (Gey G., 1952)
	Bid *knock down* (kd)	stabil transfiziert mit *pSilencer* 2.1-U6-hygro, der eine Bid-spezifische shRNA exprimiert
	Kontroll-*pSilencer* (Con)	stabil transfiziert mit *pSilencer* 2.1-U6-hygro, der eine Kontroll-shRNA exprimiert
	Bid kd-Bid-FRET	Bid kd (siehe oben), stabile Kotransfektion mit pFRET-Bid
	HeLa-Bid-FRET	Stabile Transfektion mit pFRET-Bid
	Bid kd-DEVD-FRET	Bid kd, stabile Kotransfektion mit pmyc-CFP-DEVD-YFP
	HeLa-DEVD-FRET	Stabile Transfektion mit pmyc-CFP-DEVD-YFP (Rehm et al., 2002)
	HeLa-Bcl-2	Stabile Bcl-2-Überexpression, Geschenk von Dr. D. Green, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA
MCF-7		Humane Brustkarzinom-Zelllinie, Caspase-3-defizient (Janicke et al., 1998; Soule et al., 1973)
	MCF-7-BID-FRET	Stabile Transfektion mit pFRET-Bid
SH-SY5Y		humane Neuroblastom-Zelllinie; Subklon der SK-N-SH Linie (Biedler et al., 1973)

1.2 Zellkulturmaterial

Material	Hersteller
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)	Sigma Aldrich, Dublin, Irland
Opti-MEM I (serumreduziertes Medium)	BD Biosciences, Dun Laoghaire, Irland
Fötales Kälberserum (FCS)	BD Biosciences
L-Glutamin	Sigma Aldrich
Penicillin und Streptomycin	Sigma Aldrich
Trypsin-EDTA	Sigma Aldrich
Doxyzyklin	Sigma Aldrich
Hygromycin B	BD Biosciences
Geneticin/G418	BD Biosciences
Zellkulturflaschen und –schalen	Sarstedt, Drinagh, Irland
8-well *Chamber Slides*	BD Biosciences
Zentrifugen-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (0.5 ml, 1.5 ml, 2.0 ml)	Eppendorf/Unitech, Dublin, Irland

serologische Pipetten	Sarstedt
Kryoröhrchen	BD Biosciences

1.3 Antikörper

1.3.1 Primärantikörper

Antikörper	Typ	Hersteller	Katalognummer
Anti-β-Actin	Maus, monoklonal	Sigma Aldrich, Dublin, Irland	# A5441
Anti-APAF-1	Kaninchen, polyklonal	Chemicon, Hampshire, GB	# 16941
Anti-Bad	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, Bray, Co. Dublin, Irland	# 9292
Anti-Bak G23	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg	# sc-832
Anti-Bax	Kaninchen, polyklonal	Upstate, Dundee, GB	# 06-499
Anti-Bcl-2	Maus, monoklonal	Santa Cruz	# sc-509
Anti-Bcl-X_L	Kaninchen, polyklonal	BD Transduction Laboratories, Oxford, GB	# 610212
Anti-Bid	Ziege, polyklonal	R&D Systems, Abington, GB	# AF860
Anti-Bid (AR53)	Kaninchen, polyklonal	Geschenk von Dr. S. Krajewski, Burnham Institute, La Jolla, USA	
Anti-Bim EL/L/S	Kaninchen, polyklonal	Stressgen, York, GB	# AAP-330
Anti-Calnexin	Kaninchen, polyklonal	Stressgen	# SPA-860
Anti-Calpain (kleine UE)	Maus, monoklonal	Chemicon	# 3083
Anti-Caspase-2	Maus, monoklonal	BD Transduction Laboratories, Oxford, GB	# 611022
Anti-Caspase-3	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling	# 9662
Anti-Caspase-3	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz	# sc-7148
Anti-Caspase-8 12F5	Maus, monoklonal	Alexis, Nottingham, GB	# 804-242
Anti-aktive Caspase-9	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling	# 9505
Anti-DR4	Kaninchen, polyklonal	Abcam, Cambridge, GB	# 8415
Anti-DR5	Kaninchen, polyklonal	Abcam	# 8416
Anti-Fas	Maus, monoklonal	Alexis	# 804-119

Anti-Fas, neutralisiend Klon ZB4		Upstate	# 05-338
Anti-Fas, aktivierend, Klon CH11		Upstate	# 05-201
Anti-GFP	Kaninchen, polyklonal	Clontech, Oxford, GB	# 8367-1
Anti-HSP60	Maus, monoklonal	Stressgen	# SPA-806
Anti-cIAP H-85	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz	# 7944
Anti-KDEL	Maus, monoklonal	Stressgen	# SPA-827
Anti-p53	Maus, monoklonal	Novocastra, Dublin, Irland	# NCL-p53-505
Anti-PARP	Maus, monoklonal	Biomol, Hamburg	# SA250-0050
Anti-PARP (89 kD-Fragment)	Kaninchen, polyklonal	New England Biolabs, Bray, Co. Dublin, Irland	# 9541S
Anti-PUMA	Kaninchen, polyklonal	Eurogentec, Seraing, Belgien	
Anti-Smac/ DIABLO	Kaninchen, polyklonal	R&D Systems	# AF789
Anti-Tubulin	Maus, monoklonal	Sigma Aldrich	# T9026
Anti-XIAP	Maus, monoklonal	BD Transduction Laboratories	# 610763

1.3.2 Sekundärantikörper

Antikörper	**Hersteller**	**Katalognummer**
Ziege anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert	Jackson Immuno Research, Cambridge, GB	# 111-035-003
Ziege anti-Maus IgG HRP-konjugiert	Jackson Immuno Research	# 115-035-003
Kaninchen anti-Ziege IgG HRP-konjugiert	Jackson Immuno Research	# 305-035-003

1.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide, die für die PCR Verwendung fanden, wurden von Sigma-Genosys, Cambridge, GB synthetisiert. Die siRNAs stammten von Sigma-Proligo, Dublin, Irland, während die Oligonukleotide für die shRNA von MWG Biotech, Ebersberg bezogen wurden. Alle Oligonukleotide sind in 5'-3'-Orientierung angegeben und wurden von der Humansequenz abgeleitet.

1.4.1 Primer für die RT-PCR

Bezeichnung	Sense-Primer	Antisense-Primer
β-Actin	TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG
Bim EL	ATCTCAGTGCAATGGCTTCC	CAATGCATTCTCCACACCAG
DR4/TRAIL R-1	ACAGCAATGGGAACATAGCC	CTGGTTTGCACTGACATGCT
DR5/TRAIL R-2	TGGCTGACGCATTAAGGTTT	TCCCGGAACAAAACACACAA
GAPDH	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC	CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA
BiP/Grp78	CTGGCAAGATGAAGCTCTCC	GGAGTGAAGGCGACATAGGA
$p21^{WAF1}$	TTAGCAGCGGAACAAGGAGT	GCCGAGAGAAAACAGTCCAG
PUMA	CCATCTCAGGAAAGGCTGTT	ACGTTTGGCTCATTTGCTCT

1.4.2 siRNA - Sequenzen

Bezeichnung	Sense-siRNA
Kontroll-siRNA (siCon)	UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT
DR4/TRAIL R-1 (siDR4)	CACCAAUGCUUCCAACAAUdTdT (Ren et al., 2004)
DR5/TRAIL R-2 (siDR5)	AUGAGAUAAAGGUGGCUAAdTdT (Ren et al., 2004)
PUMA (siPUMA)	GAUGGCCCAGCCUGUAAGAUACUdTdT

1.4.3 shRNA – Sequenzen

Bezeichnung	Oligonukleotide
BID-1-Sense	GATCCCAAGCTGTTCTGACAACAGCTTCAAGAGAGCTGTTGTCAGAACAGC TTTTTTTTGGAAA
BID-1-Antisense	AGCTTTTCCAAAAAAAAGCTGTTCTGACAACAGCTCTCTTGAAGCTGTTGTC AGAACAGCTTGG
BID-2-Sense	GATCCCAAGGAGAAGACCATGCTGGTTCAAGAGACCAGCATGGTCTTCTCC TTTTTTTTGGAAA
BID-2-Antisense	AGCTTTTCCAAAAAAAAGGAGAAGACCATGCTGGTCTCTTGAACCAGCATG GTCTTCTCCTTGG
BID-3-Sense	GATCCCAAGAATAGAGGCAGATTCTTTCAAGAGAAGAATCTGCCTCTATTC TTTTTTTTGGAAA
BID-3-Antisense	AGCTTTTCCAAAAAAAAGAATAGAGGCAGATTCTTCTCTTGAAAGAATCTGC CTCTATTCTTGG

1.4.4 Plasmide

Bezeichnung	Funktion	Herkunft
pSilencer 2.1-U6 hygro	Vektor für die Expression von shRNA	Ambion, Darmstadt
pSilencer 2.1-U6 hygro Negativkontrolle	Kodiert für eine Kontroll-shRNA, die keine Homologien zu bekannten humanen oder murinen Sequenzen aufweist	Ambion
pFRET-Bid	Kodiert für ein YFP-Bid-CFP-FRET-Konstrukt	Geschenk von Dr. R. Onuki, Universitiy of Tokyo, Japan (Onuki et al., 2002)

pmyc-CFP-DEVD-YFP	Kodiert für ein FRET-System, bei dem ein 18 AS-Linker mit der Caspaseschnittstelle DEVD die FRET-Komponenten CFP und YFP verbindet	(Tyas, 2000)
pEGFP-C1	Kodiert für das *enhanced green fluorescent protein*	Clontech, Heidelberg

1.5 Bakterienstämme

E. coli DH5α (Hanahan, 1983)

1.5.1 Medien und Supplemente für die Bakterienkultur

Bezeichnung	**Hersteller**
LB-Medium (Luria Bertani)	Sigma-Aldrich, Dublin, Irland
LB-Agar	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Kanamycin	BD Biosciences, Dun Laoghaire, Irland
Bakteriologische Petrischalen	Greiner/Cruinn, Dublin, Irland

1.6 Adenovirale Vektoren

Bezeichnung	**Funktion**	**Herkunft**
Ad5 Tind Bidwt-FLAG	Tetrazyklin (tet)-induzierbare Expression von murinem, FLAG-markierten wt-Bid	Geschenk von Dr. A. Gross, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel (Sarig et al., 2003)
Ad5 Tind Bidmut (D59A)-FLAG	Tet-induzierbare Expression einer murinen, FLAG-markierten Bid-Mutante. Der AS-Austausch (D59A) führt zur Mutation der wichtigsten Caspase-Schnittstelle des Bidmoleküls	Geschenk von Dr. A. Gross
Ad5 rtTA-CMV	Konstitutive Expression des reversen tet Transaktivators (rtTA) unter Kontrolle des CMV-Promotors	Geschenk von Dr. A. Gross

1.7 Apoptose induzierende Reagenzien und Inhibitoren

Substanz	**Funktion**	**Hersteller**
A23187	Kalzium-Ionophor	Alexis, Nottingham, GB
Brefeldin A	Proteintransport- und Proteinsekretions-Inhibitor	Alexis
Calpeptin	Calpaininhibitor	Alexis
Cycloheximid	Inhibitor der Proteinbiosynthese	Alexis

N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Amino-methyl-coumarin (DEVD-AMC)	Fluoreszierendes Substrat für die Caspasen-1, -3, -4, -7, -8	Bachem, St. Helen's, GB
Doxorubicin	DNA-Interkalation, Topoisomerase-II-Inhibitor	Alexis
Epoxomicin	Proteasominhibitor	Sigma Aldrich, Dublin, Irland
Etoposid	Topoisomerase-II-Inhibitor	Alexis
z-IETD-fmk	Inhibitor für Caspasen-8, -10 und für Granzym B	R&D Systems, Abington, GB
Oxaliplatin	Ausbildung von Platin-DNA-Addukten	Sigma Aldrich
PD 150606	Calpaininhibitor	Alexis
SB 203580	p38 MAPK-Inhibitor	Biomol, Hamburg
SP 600125	c-Jun N-terminal Kinase-Inhibitor	Biomol
Staurosporin	Proteinkinase-Inhibitor	Alexis
Thapsigargin	Inhibitor der sarkoplasmatischen/endoplasmatischen Ca^{2+}-ATPase (SERCA)	Alexis
TRAIL	Ligand der Membranrezeptoren DR4, DR5, DcR1, DcR2, Osteoprotegerin	Leinco Technologies, Universal Biologicals Ltd., Gloucestershire, GB
TNF-α	Ligand der Membranrezeptoren TNF-R1 und TNF-R2	Pepro Tech, London, GB
TRAIL R2-Fc-Fusionspeptid		R&D Systems
Tunicamycin	N-Glykosylierungs-Inhibitor	Alexis
z-VAD-fmk	Pancaspase-Inhibitor	Bachem, St. Helen's, GB

1.8 Enzyme

Enzym	**Hersteller**
Restriktionsenzyme	NEB, Bray, Irland
Reverse Transkriptase (M-MLV)	Invitrogen/Biosciences, Dun Laoghaire, Irland
Reverse Transkriptase (SuperScript II)	Invitrogen
Taq-Polymerase	Invitrogen
T4 DNA-Ligase	Invitrogen

1.9 Kits

Kit	**Hersteller**
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce/Medical Supply Co., Dublin, Irland
ECL Western Blot Detektionsreagenz	Amersham Biosciences, St. Giles, GB
EndoFree Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen, Crawley, West Sussex, GB

Metafectene	Biontex, München
Metafectene Pro	Biontex
pSilencer hygro siRNA Expression Vector Kit	Ambion, Darmstadt
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Quantitect SYBR Green PCR Kit	Qiagen
Qiashredder	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Super Signal Chemiluminiszenzreagenz Pico	Pierce/Medical Supply Co

1.10 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die Chemikalien und Reagenzien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Biomol (Hamburg), Merck Biosciences (Nottingham, GB) und Sigma-Aldrich (Dublin, Irland) bezogen und besaßen Analysenqualität. Die Hersteller spezieller Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Chemikalien/Verbrauchsmaterial	**Hersteller**
1,9-Dimethyl-Methylenblau	Sigma-Aldrich, Dublin, Irland
3 MM-Papier	Schleicher & Schuell/Techno-Path, Limerick, Irland
3-((3-Cholamidopropyl)-di-methyl-ammonio)-1-propane- sulfonate (CHAPS)	Biomol, Hamburg
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (37.5:1), 40%	Sigma-Aldrich,
Agarose	Peqlab/Fannin Healthcare, Dublin, Irland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Annexin V-FITC	Biovision, Mountain View, Kalifornien
Bisbenzimide H33258 (Hoechst)	Applichem/Annecis, Lancester, GB
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fluka, Dublin, Irland
Coomassie Plus Protein Assay Reagenz	Pierce/Medical Supply Co, Dublin, Irland
D-Glucose	Sigma-Aldrich
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Dublin, Irland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem
Dithiothreitol (DTT)	Fluka
DNA Molekulargewichtsstandard (100 bp-Leiter)	Promega/Medical Supply Co., Dublin, Irland
dNTP-Mix	Qiagen, Crawley, West Sussex, GB
Ethidiumbromid	Invitrogen, Dun Laoghaire, Irland
Glycerin	Sigma-Aldrich
Mark 12 Proteinstandard	Invitrogen
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Nitrocellulosemembran (0.25 µm)	Schleicher & Schuell
Pd(N6) Random Hexamers	Amersham Biosciences, St. Giles, GB

Phosphataseinhibitor Cocktail I und II	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Precision Plus Protein All Blue Standard	Biorad/Alpha Technologies, Dublin, Irland
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
Proteaseinhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich
Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM)	Invitrogen
Triton X-100 (p-t-Octylphenylpolyoxy-ethylene)	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich

1.11 Laborgeräte

Gerät	**Hersteller**
Abzug (Chemflow CSC)	Chemical System Control Ltd., Dublin, Irland
Agarose-Gelkammer (Mini-Sub Cell GT, Wide Mini-Sub Cell GT)	Biorad, Dublin, Irland
Autoklav (Systec V-95)	Alfa Medical, Hempstead, NY, USA
Bakterienschüttler (Innova 44)	New Brunswick Scientific, St Albans, Herfordshire, GB
Blotkammer (Trans Blot Semidry Transfer Cell)	Biorad, Dublin, Irland
Elektrophoresekammer für PAGE (Mini-Protean 3 Cell)	Biorad, Dublin, Irland
Feinwaage (Explorer Pro)	Ohaus, Pine Brook, NJ, USA
FACS (CyFLOW ML)	Partec, Münster
Fluoreszenz-ELISA-Reader (GENios)	Tecan, Weymouth, GB
Fluoreszenzmikroskop (Eclipse TE 300)	Nikon, Enniscorthy, Irland
Gel-Dokumentationssystem (LAS 3000)	Fujifilm, Dublin, Irland
Gelstand für SDS-PAGE	Biorad, Dublin, Irland
Geltrockner (Speed Gel SG 200)	Savant, Farmingdale, NY, USA
Gradienten-Thermocycler (PTCC-200)	MJ Research /Alpha Technologies, Dublin, Irland
Inversmikroskop (Eclipse TS100)	Nikon, Enniscorthy, Irland
Laborwaage universal (Ranger)	Ohaus, Pine Brook, NJ, USA
Luminometer (Centro)	Berthold, Bad Wildbad
Neubauer-Zählkammer	VWR/AGB Scientific, Dublin, Irland
pH-Messgerät	Thermo Fisher Scientific, Rugby, Warwickshire, GB
Real Time PCR Maschine (Lightcycler 1.5 und Lightcycler 2.0)	Roche, Dublin, Irland
Reinstwasseranlage (Diamond Ro)	Barnstead, Loughborough, Leicestershire, GB
Schüttelinkubator (Plattform Rocker STR6)	Superior Scientific, Lab Suppliers Online
Sorvall RC-5B Plus	Sorvall, Unitech, Dublin, Irland
Spannungsgerät (Power-Pac Basic)	Biorad, Dublin, Irland
Sterilbank (Herasave)	Heraeus, Newport Pagnell, GB

Thermomixer (comfort)	Eppendorf, Dublin, Irland
Tischzentrifuge (Biofuge fresco)	Heraeus, Newport Pagnell, GB
Tischzentrifuge (5810R)	Eppendorf
Transilluminator (TI 2)	Whatman Biometra, Dun Laoghaire, Irland
UV Spektrometer (Ultrospec 4000)	Amersham Biosciences, Little Chalfont,GB
Vakuumpumpe	KNF Laboratory, Trenton, NJ, USA
Vortex (TTS 2)	IKA Works, Wilmington, USA
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zellkulturschrank (Hera Cell 150)	Heraeus, Newport Pagnell, GB

1.12 Software

Bezeichnung	**Hersteller/Link**
Adobe Illustrator CS	Adobe, Unterschleißheim
Adobe Photoshop 7.0	Adobe
Partec FloMax	Partec, Münster
SPSS Version 11.0	SPSS GmbH, München
All-IN-ONE SEQ-ANALYZER Version 1.35	http://www-personal.umich.edu/~ino/blast.html
NEBcutter V2.0	http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
Basic local alignment search tool (BLAST)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
SiDESIGN® Center Dharmacon	http://www.dharmacon.com/sidesign/

2 Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Kultivierung humaner Karzinomzelllinien

Alle Arbeitsschritte wie das Passagieren, Aussäen oder Behandeln der Zellkulturen und das Ansetzen von Kulturmedien und Lösungen wurden unter Verwendung steriler Glas- und Plastikgeräte in einer sterilen Werkbank durchgeführt, um Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzsporen zu verhindern. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und einem CO_2-Gehalt von 5%. Unter diesen Bedingungen bleibt der pH-Wert der Kulturmedien in physiologischen Grenzen und die Flüssigkeitsverluste durch Verdunsten sind minimal. HeLa-, MCF-7- und SH-SY5Y-Zellen wurden in RPMI-Medium kultiviert, dem 10% fötales Kälberserum, 1% L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penicillin zugesetzt waren. Das Kälberserum wurde vor Gebrauch für 30 min bei 56 °C im Wasserbad zur Komplementinaktivierung inkubiert.

Fertiges Medium wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und spätestens nach drei bis vier Wochen frisch angesetzt.

Subkultivierung adhärent wachsender Zellen

Alle Zellen wurden zwei bis dreimal wöchentlich passagiert. SH-SY5Y-Neuroblastomzellen wurden dabei in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 umgesetzt, während die Karzinomzelllinien HeLa und MCF-7 1:5 bis 1:10 geteilt wurden. Hierzu wurde das alte Medium entfernt, der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und anschließend für einige Minuten mit Trypsin/EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen, in 15 ml-Röhrchen überführt und für 3 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Durch geeignete Verdünnungen wurden die Zellen in der gewünschten Zahl in die vorbereiteten Kulturgefäße überführt und mit 5-15 ml frischem Medium bedeckt im Brutschrank weiterkultiviert.

Verwendete Lösungen:

RPMI 1640 mit den entsprechenden Zusätzen

PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

0.25% (w/v) Trypsin/0.02% (w/v) EDTA-Lösung in HBSS

Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte durch eine Ausschlussfärbung mit Trypanblau. Dies ist ein saurer Farbstoff, der nur die defekten Zellmembranen toter Zellen durchdringen kann und durch die Bindung an zytosolische Proteine zur Blaufärbung führt. Lebende Zellen dagegen erscheinen unter dem Mikroskop farblos. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Nach der mikroskopischen Auszählung der vier Großquadrate erfolgte die Berechnung der Zellzahl nach folgender Formel:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{Z \cdot V \cdot 10^4 \cdot X}{Q}$$

Z = ermittelte Zellzahl; V = Verdünnungsfaktor; 10^4 = Kammerfaktor

X = Ausgangsvolumen der Zellsuspension in ml; Q = Anzahl der gezählten Großquadrate

Verwendete Lösungen:

0.4% (w/v) Trypanblau-Lösung: Trypanblau 1:4 in PBS verdünnt

Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Zellen können in flüssigem Stickstoff bei -196 °C über Jahre gelagert werden. Um Schädigungen der Zellen während des Einfrierens und Auftauens durch Eiskristalle zu minimieren, wurde dem Einfriermedium DMSO zugesetzt. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst durch Trypsinierung von ihren Kulturgefäßen abgelöst, in frischem Medium aufgenommen und bei 1000 U/min für 3 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurde das Zellpellet in kaltem Einfriermedium resuspendiert und in Aliquots von ca. 4 x 10^6 Zellen auf Kryoröhrchen aufgeteilt. Die Röhrchen wurden sofort in eine Kryobox (Nunc, Wiesbaden) überführt, die vor Gebrauch mit Isopropanol gefüllt worden war, um ein langsames Herunterkühlen von ca. 1 °C/min zu gewährleisten. Die Zellen wurden zunächst für mindestens 24 h bei -80 °C gelagert, bevor sie zur Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt werden konnten.

Zur Rekultivierung der Zellen wurde der Inhalt der Kryoröhrchen durch Zugabe von vorgewärmtem Medium aufgetaut und in einem 15 ml Röhrchen mit frischem Medium gesammelt. Nach einer Zentrifugation bei 1000 U/min für 3 min wurden die Reste des DMSO-haltigen Einfriermediums entfernt und das Pellet resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen, in Zellkulturflaschen überführt und im Brutschrank kultiviert.

Verwendete Lösungen:

Einfriermedium: RPMI 1640 mit 20% FCS (v/v) und 10% DMSO (v/v)

2.1.2 Transfektion humaner Karzinomzellen

Prinzip der Lipofektion und Transfektionsoptimierung

Zur Transfektion der verschiedenen Karzinomzelllinien wurden die Transfektionsreagenzien Metafectene (für DNA) und Metafectene Pro (für siRNA) verwendet. Bei diesen handelt es sich um polykationische Lipide, die sowohl mit der negativ geladenen Zelloberfläche als auch mit den negativ geladenen Phospatgruppen der Nukleinsäuren elektrostatisch interagieren und spontan liposomale Komplexe bilden können (Felgner et al., 1994; Felgner et al., 1987).

Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften fördern sie gleichzeitig eine Fusion mit der Zellmembran und damit das Einbringen der Nukleinsäuren in die Zelle. Da die Transfektionseffizienz von einem optimierten Verhältnis von Nukleinsäuren zu Transfektionsreagenz und von der Absolutmenge der Transfektionskomplexe abhängt und diese für jede Zelllinie spezifisch sind, wurden zunächst die Bedingungen für die verwendeten Zelllinien optimiert. Dazu wurden Zellen in 24-Well-Platten ausgesät (4 x 10^4 Zellen/Well) und 24 h später mit Transfektionskomplexen, die unterschiedliche Mengen an DNA und Transfektionsreagenz enthielten, inkubiert. Da das verwendete Plasmid für das *green fluorescent protein* (GFP) kodierte, konnte nach weiteren 24 h die Anzahl GFP-positiver Zellen fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und die Transfektionseffizienz bestimmt werden. Für HeLa-Zellen ergab sich das optimale Verhältnis von 250 ng DNA: 1µl Metafectene für 24-Well-Platten, die eine Oberfläche von ca. 200 mm^2 besitzen. Für Experimente in größeren Kulturgefäßen wurden, ausgehend von diesen Werten, die Mengen entsprechend angepasst.

Transfektion von Plasmiden

Für die Transfektion von Plasmid-DNA wurden die Zellen in einer Dichte von 4 x 10^4 Zellen pro Loch einer 24-Well-Platte ausgesät. Nachdem sie 24 h später eine Konfluenz von ca. 80% erreicht hatten, erfolgte die Transfektion. Pro Ansatz wurden dazu die vorher optimierten Mengen an DNA und Transfektionsreagenz (Metafectene) mit jeweils 50 µl OptiMEM I gemischt. Diese Lösungen wurden vereinigt und für 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die zu transfizierenden Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 200 µl OptiMEM I überschichtet. Danach wurden 100 µl der Transfektionskomplexe tropfenweise zu den Zellen gegeben und vorsichtig verteilt. Nach dreistündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Transfektiondkomplexe entfernt und durch frisches Vollmedium ersetzt. 16-24 h später standen die transfizierten Zellen für nachfolgende Experimente zur Verfügung.

Verwendete Lösungen:

OptiMEM I

Metafectene

Transfektion von siRNA

Die Transfektion der siRNA erfolgte in 6-Well-Platten. Hierzu wurden 2 x 10^5 Zellen pro Loch ausplattiert und 24 h später transfiziert. Ein Transfektionsansatz bestand aus dem siRNA-Duplex (1.32 µg/100 nM) und dem Lipofektionsreagenz Metafectene Pro (5.28 µl), die zunächst in jeweils 100 µl OptiMEM I gelöst und dann vereinigt wurden. Zur Ausbildung der Komplexe wurde die siRNA-Metafectene Pro-Mischung bei RT für 20 min inkubiert und währenddessen die Zellen vorbereitet. Um Antibiotika- und Serumreste zu entfernen, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend 800 µl OptiMEM I vorgelegt. Darauf wurden 200 µl der Transfektionskomplexe pipettiert und die Zellen für 4 h im Brutschrank inkubiert. Nach dem Ersetzen des Transfektionsmediums durch Vollmedium wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank kultiviert.

Verwendete Lösungen:

OptiMEM I

Metafectene Pro

Generierung stabiler Zelllinien

Um stabile Zelllinien zu etablieren, wurde in einem Vorversuch zunächst die optimale Konzentration der Selektionsmittel bestimmt. Hierzu wurden HeLa-Zellen in 24-Well-Platten ausgesät und für zwei Wochen in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der Selektionsreagenzien Geneticin/G418 oder Hygromycin B kultiviert. Gesucht wurde die Konzentration, die nach einigen Tagen signifikant Zelltod induzieren und alle Zellen der Schale nach spätestens zwei Wochen abtöten konnte. Für HeLa-Zellen ergab sich eine optimale Geneticin-Konzentration von 500 µg/ml und eine Hygromycin B-Konzentration von 150 µg/ml. Zur Generierung der stabilen Linien wurden HeLa-Zellen in 24-Well-Platten mit 250 ng des jeweiligen Plasmids transfiziert und 24 h später auf mehrere 6-Well-Platten aufgeteilt und in dem entsprechenden Selektionsmedium kultiviert. Nach zwei bis vier Wochen waren Zellklone herangewachsen, die mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 24-Well-Platten überführt werden konnten. Die Klone wurden weiter expandiert und in der RT-PCR, im Western Blot oder mit Fluoreszenzmikroskopie auf die Expression des transfizierten Konstrukts untersucht.

Verwendete Lösungen:

Geneticin/G418

Hygromycin B

Adenovirale Transduktion von Zellen

Zur Überexpression von murinem FL-Bid in HeLa-Zellen wurden Tetrazyklin (tet-on)-induzierbare adenovirale Vektoren verwendet, die freundlicherweise von Dr. A. Gross (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) zur Verfügung gestellt wurden. Es handelte sich um wt-Bid und um die Bidmutante D59A, bei der die N-terminale Caspaseschnittstelle durch den Aminosäureaustausch zerstört ist (Sarig et al., 2003). Für die Transduktion wurden am Vortag 2 x 10^5 Zellen pro Loch in 6-well-Platten ausgesät. 24 h später wurden die Zellen zweimal mit OptiMEM I gewaschen und mit 500 µl OptiMEM I überschichtet. Die Infektion mit den wt-Bid oder den Bid (D59A) exprimierenden Viren und dem reversen tet-Transaktivator (rtTA)-Virus erfolgte mit einer *Multiplicity of Infection* (MOI) von 1000. Dazu wurde die zuvor errechnete Anzahl Viruspartikel aus der Stocklösung entnommen, in PBS entsprechend verdünnt und auf den Zellen verteilt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen, mit Vollmedium überschichtet und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Um die Expression der tet-induzierbaren Promotoren zu aktivieren, wurde dem Medium 14 h nach der Infektion 1 µg/ml Doxyzyklin zugegeben. Sechs Stunden nach der Induktion war eine Proteinexpression nachweisbar und die Zellen wurden für zusätzliche Behandlungen verwendet.

Verwendete Lösungen:
OptiMEM I
Doxyzyklin

2.1.3 Induktion von Apoptose

Um den durch das BH3-only Protein Bid-vermittelten Zelltod in HeLa-Zellen näher zu charakterisieren, wurde Apoptose sowohl über den extrinsischen als auch den intrinsischen Weg induziert. Der extrinsische Weg wird durch die Bindung von Zytokinliganden (z. B. FasL, TNF-α und TRAIL) an die entsprechenden Rezeptoren (Fas, TNF-Rezeptoren, TRAIL-Rezeptoren), die alle der TNF-α Rezeptor Superfamilie angehören, aktiviert. Fas wurde durch Inkubation der Zellen mit 10-100 ng/ml eines aktivierenden Fas-Antikörpers (Klon CH11) von Upstate stimuliert. Die Aktivierung der Todesrezeptoren DR4 und DR5 erfolgte mit rekombinantem TRAIL (10-100 ng/ml, Leinco Technologies), während für die Induktion des TNF-R1 rekombinantes TNF-α (1-10 ng/ml, Pepro Tech) verwendet wurde. Gemeinsam ist

diesen Stimuli eine frühe Aktivierung von Caspasen nach zwei bis vier Stunden, gefolgt von einem raschen Zelltod in HeLa-Zellen.

Zur Aktivierung des intrinsischen, mitochondrialen Apoptosewegs wurden ER- und Proteasomstress induzierende, DNA-schädigende und Proteinkinase inhibierende Substanzen verwendet. Die Induktion von ER Stress erfolgte durch Inkubieren der Kulturen mit Tunicamycin (1-10 µM), Thapsigargin (1 µM) und Brefeldin A (1 µM). Tunicamycin inhibiert die N-verknüpfte Glykosylierung der Proteine im Lumen des ER, was zur Akkumulation unreifer Proteine und damit zu ER Stress führt (Heifetz et al., 1979). Thapsigargin ist ein Inhibitor der sarcoplasmatischen/endoplasmatischen Ca^{2+}-ATPase (SERCA) (Lytton et al., 1991; Thastrup et al., 1990). Durch den Ausfall dieses Transporters, der Kalzium aus dem Zytosol zurück ins ER pumpt, verringert sich die Ca^{2+}-Konzentration im ER. Dies hat eine Hemmung Ca^{2+}-abhängiger Chaperone zur Folge und die daraus resultierende Verminderung der Faltungskapazität führt zu ER Stress. Brefeldin A inhibiert eine Gruppe von *GTP exchange factors* (GEFs), die für die Aktivierung der kleinen GTPase Arf1 verantwortlich sind (Donaldson et al., 1992a; Donaldson et al., 1992b). Da Arf1 an der Bildung und Freisetzung von Membranvesikeln beteiligt ist, kommt der Proteintransport nach Brefeldin A-Behandlung zum Erliegen und der Golgi Komplex kollabiert (Fujiwara et al., 1988; Misumi et al., 1986). Dadurch können die im ER modifizierten Proteine nicht weiter transportiert werden und dieser Rückstau induziert ER Stress.

Um Apoptose durch die Hemmung des Proteasoms hervorzurufen, wurden die Zellen mit Epoxomicin (50 nM) behandelt. Diese Substanz bindet kovalent an die LMP7-, X-, MECL1- und Z-Untereinheiten des Proteasoms und führt zur Inhibierung der chymotryptischen und in geringerem Maße auch der tryptischen und post-glutamyl-hydrolysierenden Aktivität des Proteasoms (Meng et al., 1999). Der dadurch ausgelöste Stopp der Proteindegradierung treibt die Zellen nach 16-24 h in die Apoptose.

Ein weiterer Stimulus zur Induktion von Apoptose war Staurosporin (STS), das in Dosen zwischen 0.1-1 µM eingesetzt wurde. Diese Substanz inhibiert zahlreiche Proteinkinasen, darunter die Phospholipid/Ca^{2+}-abhängige Proteinkinase C (PKC), cAMP- und cGMP-abhängige Kinasen und Tyrosinkinasen (Herbert et al., 1990; Tamaoki et al., 1986). Eine Behandlung mit STS induziert eine Caspaseaktvierung bereits nach vier bis fünf Stunden und führt zu einem raschen Zelltod.

Als gentoxische Stimuli wurden Etoposid (10-100 µM), Doxorubicin (300-70 ng/ml) und Oxaliplatin (10-50 µg/ml) verwendet. Die DNA-schädigende Wirkung der Zytostatika Etoposid und Doxorubicin beruht auf der Inhibierung der Topoisomerase II (Nitiss et al.,

1993; Tewey et al., 1984). Dieses Enzym verändert den Spiralisierungsgrad der DNA durch das gezielte Einführen und Religieren von Doppelstrangbrüchen und ist für Prozesse, bei der die beiden DNA-Stränge voneinander getrennt werden müssen, notwendig (Berger et al., 1996). Die Inhibierung des Enzyms hemmt folglich Vorgänge wie Replikation, Rekombination oder Transkription, führt zur Ausbildung von Doppelstrangbrüchen und schließlich zum Zelltod.

Das Zytostatikum Oxaliplatin entfaltet seine gentoxische Wirkung durch Platinierung der DNA. Die Reaktion findet bevorzugt an der N7-Position des Imidazolrings der Purinbasen statt und führt zur Ausbildung von Intra- und Interstrang-Quervernetzungen der DNA. Am häufigsten sind Intrastrang-1,2-GG- bzw. Intrastrang-1,2-GA-Addukte, die die Konformation der DNA verändern, Replikation und Transkription blockieren und nach 16-24 h Apoptose induzieren (Spingler et al., 2001).

Verwendete Stocklösungen:

α-Fas-Antikörper, human, aktivierend (Klon CH11)	500 µg/ml Stocklösung
TRAIL, human, rekombinant	0.5 µg/µl in H_2O
TNF-α, human, rekombinant	1 µg/µl in H_2O
Tunicamycin	10 mM in DMSO
Thapsigargin	10 mM in DMSO
Brefeldin A	10 mM in DMSO
Epoxomicin	50 µM in DMSO
Staurosporin	30 mM in DMSO
Etoposid	100 mM in DMSO
Doxorubicin	5 mg/ml in DMSO
Oxaliplatin	5 mg/ml in H_2O

2.1.4 Nachweis von Zytotoxizität und Apoptose

Koloniebildungsassay

Mit diesem Assay kann die Proliferationsfähigkeit adhärenter Zellen nach einer Behandlung mit zytotoxischen Agenzien oder Bestrahlung ermittelt werden. Dazu wurden 4 x 10^4 Zellen pro Loch in 24-Well-Platten ausgesät und am Folgetag ein bis drei Stunden mit den Apoptose induzierenden Substanzen im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abtrypsinisiert, gezählt und 1.5 x 10^3 Zellen aus jedem Well in 60-mm Schalen überführt und weiterkultiviert. Nach 10-14 Tagen hatten sich Zellkolonien gebildet, die durch eine 45-

minütige Inkubation der Schalen bei RT in einer Ethanol-Methylenblau-Lösung fixiert und gefärbt wurden. Nachdem die Platten mit H_2O gespült und getrocknet worden waren, wurde die Anzahl aller Klone, die sich aus mehr als 50 Zellen zusammensetzten, bestimmt. Die Ergebnisse stellen den Prozentsatz koloniebildender, behandelter Zellen bezogen auf die Anzahl der Klone aus Kontrollansätzen dar.

Verwendete Lösungen:

Färbelösung: 50% (v/v) Ethanol/0.25% (w/v) 1,9-Dimethyl-Methylenblau in H_2O

Hoechst-Färbung

Um das kondensierte oder fragmentierte Chromatin apoptotischer Zellen nachzuweisen, wurde eine Färbung mit dem kationischen Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 durchgeführt. Dieser membranpermeable Farbstoff bildet nichtkovalente Bindungen mit der DNA aus, wobei AT-reiche Sequenzen bevorzugt gebunden werden (Muller and Gautier, 1975). Nach Anregung mit UV-Licht bei 350 nm ist eine Blaufärbung der Zellkerne zu beobachten, die auf die Emission bei ca. 460 nm zurückzuführen ist. Dabei weisen die kondensierten oder fragmentierten Nuklei apoptotischer Zellen eine deutlich stärkere Fluoreszenz als die Kerne intakter Zellen auf.

Für die Hoechst-Färbung wurden Zellen, die zuvor in 8 well-*chamberslides* ausgesät und behandelt worden waren, mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 20 min bei RT fixiert und dann mit Hoechst 33258 (1 µg/ml in PBS) gefärbt. Anschließend wurde der Prozentsatz apoptotischer Zellen durch Auszählen von drei zufällig ausgewählten Regionen jedes Wells am Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

Verwendete Lösungen:

Hoechst 33258 (1 µg/µl in DMSO)

Paraformaldehyd (4% in PBS)

DEVD-Assay zur Messung der Caspaseaktivität

Die Messung der Caspaseaktivität zytosolischer Zellextrakte erfolgte mittels eines fluorimetrischen Assays. Dazu wurden Zellen, die zuvor in 24-Well-Platten kultiviert und behandelt worden waren, durch Zugabe von 200 µl Lysepuffer aufgeschlossen. 50 µl dieses Extrakts wurden mit 150 µl Reaktionspuffer vermischt, der das fluorogene Substrat N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Aminomethylcoumarin (Ac-DEVD-AMC, 10 µM) enthielt. Die

Tetrapeptidsequenz DEVD wird bevorzugt von den Effektorcaspasen-3 und -7 gespalten, in geringerem Umfang sind auch die Caspasen-6, -8, -10 und -9 an der Spaltung beteiligt (Garcia-Calvo et al., 1999; Thornberry et al., 1997). Das durch die Caspaseaktivität freigesetzte Aminomethylcoumarin wurde fluorimetrisch (Anregung: λ=360 nm und Emission: λ=465 nm) über einen Zeitraum von zwei Stunden gemessen. Der Proteingehalt der Proben wurde mit dem Coomassie Plus Protein Assay Reagenz bestimmt. Durch die Bindung des Farbstoffs Coomassie Blue G-250 an die Aminogruppen der Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs im sauren Milieu von λ=465 nm nach λ=595 nm (Bradford, 1976). Zunächst wurde eine Eichkurve mit BSA-Standardlösungen bekannter Konzentration in einem Endvolumen von 50 µl hergestellt. Dann wurden 25 µl des zytosolischen Zellextrakts mit 25 µl einer 0.9% NaCl-Lösung vermischt und alle Proben mit 200 µl Coomassie Blue G-250 überschichtet. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 595 nm photometrisch gemessen. Die Caspaseaktivität ist in *arbitrary fluorescent units* (A. U.) pro Stunde und pro µg Protein angegeben.

Verwendete Lösungen:

Lysepuffer
- 10 mM HEPES, pH 7.4
- 42 mM KCl
- 5 mM $MgCl_2$
- 0.1 mM EDTA
- 0.1 mM EGTA
- 1 mM DTT
- 0.5% CHAPS
- Proteaseinhibitor-Cocktail

Reaktionspuffer
- 25 mM HEPES, pH 7.5
- 1 mM EDTA
- 10% Sucrose
- 0.1% CHAPS
- 3 mM DTT
- 10 µM N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Aminomethylcoumarin

Coomassie Plus Protein Assay Reagenz

BSA-Standard (2 mg/ml)

Durchflusszytometrie

Mittels der Durchflusszytometrie, auch als *fluorescence activated cell sorting* (FACS) bezeichnet, können die Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften einzelner Partikel oder Zellen in Suspension bestimmt werden. Dazu werden die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt und gerichtet an einem Laser vorbeigeführt, dessen monochromatisches Licht in Abhängigkeit von der Größe und Struktur der getroffenen Zelle unterschiedlich stark gebeugt bzw. gebrochen wird. Am größten ist dabei der Anteil des *forward scatters* (FSC), der die Lichtbeugung erfasst. Der FSC ist proportional zum Zellquerschnitt und lässt damit Rückschlüsse auf die Zellgröße zu. Als Seitwärtsstreulicht oder *side scatter* (SSC) wird das durch Brechung abgelenkte Licht bezeichnet, das ein Maß für die Granularität der Zelle darstellt. Wenn die Zellen fluorogene Proteine wie CFP (*cyan fluorescent protein*) oder YFP (*yellow flourescent protein*) exprimieren, mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt oder durch entsprechende Antikörper markiert sind, kann außerdem die relative Fluoreszenzintensität jeder Zelle bestimmt werden. Alle Streulicht- und Fluoreszenzparameter können gleichzeitig aufgenommen werden. Zur Anregung besitzt das für diese Arbeit verwendete CyFlow ML 16 Durchflusszytometer von Partec einen 200 mW Argonlaser mit einer Emission bei 488 nm sowie einen 20 mW und einen 100 mW Diodenlaser, die bei 405 nm bzw. bei 532 nm emittieren. Das emittierte Licht wird über ein System aus Spiegeln, Linsen und Filtern zu den Detektoren geleitet und durch Photomultiplier verstärkt. Einer der möglichen Messparameter, der sog. Triggerparameter, bestimmt dabei den Schwellenwert, der überschritten sein muss, damit die Daten dieser Zelle aufgezeichnet werden. In Abhängigkeit von dem geplanten Experiment und dem verwendeten Messgerät müssen sowohl der Schwellenwert als auch die Detektor- und Verstärkereinstellungen angepasst werden. Signale, die den Schwellenwert überschreiten, werden durch Photodioden in elektrische Impulse umgewandelt und gespeichert.

Annexin V/PI-Färbung

Für die durchflusszytometrische Bestimmung apoptotischer und nektrotischer Zellen wurde eine Färbung mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid (PI) durchgeführt (Vermes et al., 1995). Die selektive Markierung von Zellen in einem frühen Apoptosestadium durch Annexin V beruht auf dem asymmetrischen Aufbau der Zellmembran, der im Verlauf der Apoptose nicht aufrechterhalten werden kann. Phosphatidylserin, normalerweise auf der zytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert, gelangt dabei auch an die Außenseite, wo es spezifisch von Annexin V gebunden wird. Da es während der Nekrose zu einer

Permeabilisierung der Zellmembran kommt, können auch nekrotische Zellen Annexin V-positiv sein. Um diese von apoptotischen Zellen zu unterscheiden, wird zusätzlich der DNA-interkalierende Farbstoff PI verwendet. PI kann nur in Zellen mit geschädigter Plasmamembran eindringen und wird deshalb von lebenden Zellen oder solchen, die sich in einem frühen Apoptosestadium befinden, nicht aufgenommen.

Der Überstand behandelter und unbehandelter Zellen, der abgelöste, tote Zellen enthält, wurde abgenommen und mit den abtrypsinierten Zellen der entsprechenden Probe in einem Eppendorfgefäß vereinigt. Die Proben wurden zentrifugiert (2000 U/min, 5 min), mit PBS gewaschen und erneut durch Zentrifugation sedimentiert. Anschließend wurden die Pellets in 200 µl FACS-Puffer, der mit Annexin V-FITC (5 µl/ml) und PI (1 µg/ml) versetzt war, resuspendiert und für 20 min bei 37 °C im Dunklen geschüttelt (750 U/min). Dann wurde jede Probe mit 1.3 ml eiskalten FACS-Puffer gemischt und in vorgekühlte FACS-Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Messung am Durchflusszytometer unter Verwendung eines FL1/FL2-Profils, wobei 10000 Ereignisse aufgenommen wurden. Die Analyse der Daten erfolgte mit der FloMax Software von Partec.

Verwendete Lösungen:

Annexin V-FITC	0.25 mg/ml in PBS
Propidiumiodid	1 mg/ml in H_2O
FACS-Puffer	10 mM HEPES, pH 7.4
	135 mM NaCl
	5 mM $CaCl_2$

Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials mit TMRM und der Caspaseaktivität durch FRET-Spaltung

Zur Bestimmung des elektrischen Potentials entlang der inneren Mitochondrienmembran ($\Delta\Psi$) wurde der lipophile, kationische Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM) verwendet, der in der mitochondrialen Matrix akkumuliert**.** Diese Akkumulation ist proportional zu $\Delta\Psi$ und führt zu einer Verschiebung des Anregungs- und Emissionsmaximums des Farbstoffs in den längerwelligen Bereich (Ehrenberg et al., 1988; Scaduto and Grotyohann, 1999).

Für den Nachweis der Caspaseaktivität in lebenden Zellen wurden HeLa- und HeLa Bid kd-Zellen verwendet, die stabil mit dem Plasmid pmyc-CFP-DEVD-YFP transfiziert sind (Rehm et al., 2002; Tyas, 2000). In dem daraus resultierenden Fusionsprotein bilden CFP und YFP

ein Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)-Paar (Förster, 1948; Stryer and Haugland, 1967), das von der Caspase-Schnittstelle DEVD getrennt wird. Diese Tetrapeptidsequenz wird präferentiell von den Effektorcaspasen-3 und -7 erkannt, in geringerem Umfang sind aber auch die Caspasen-6, -8, -10 und -9 an der Spaltung beteiligt (Thornberry et al., 1997).

Bei FRET handelt es sich um die strahlungsfreie Energieübertragung zwischen zwei Fluorophoren oder einem fluorogenen Molekül und einem nichtfluoreszierenden Akzeptor. Dazu muss ein Donor-Fluorophor mit Licht geeigneter Wellenlänge angeregt werden, so dass dessen Anregungsenergie durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen direkt auf einen passenden Akzeptor übertragen werden kann. Die Fluoreszenz des Donors wird dabei gelöscht (*quenching*). Handelt es sich bei dem Akzeptor ebenfalls um ein Fluorophor, kann dessen emittierte, längerwelligere Fluoreszenz gemessen werden. Damit FRET stattfinden kann, müssen mehrere Voraussetzungen erfüllt sein. So muss das Anregungsspektrum des Akzeptors mit dem Emissionsspektrum des Donormoleküls überlappen, eine geeignete Orientierung der transienten Dipolmomente beider Partner und eine ausreichende Quantenausbeute des Donors müssen gewährleistet sein. Da außerdem der Abstand beider FRET-Partner zwischen 1-10 nm betragen muss, kann FRET nach Spaltung des CFP-DEVD-YFP-Fusionsproteins durch Caspasen nicht mehr stattfinden.

Behandelte und unbehandelte Zellen wurden vor dem Start der durchflusszytometrischen Messung für eine Stunde mit 90 nM TMRM bei 37 °C inkubiert. Dann wurde der Überstand abgenommen, mit den abtrypsinierten Zellen der entsprechenden Probe vereinigt und die Zellen sedimentiert (2000 U/min, 5 min, 4 °C). 10^5 Zellen jeder Probe wurden in eiskaltem PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer vermessen. Dabei wurde die Fluoreszenz von CFP mit dem 405 nm-Laser angeregt und die Emission durch einen 455 nm-Bandpass-Filter detektiert. Die Anregung des YFP erfolgte mit dem 488 nm-Laser und die Emission wurde, ebenso wie FRET zwischen CFP und YFP, durch einen 520 nm-Bandpass-Filter aufgenommen. Auch die Fluoreszenz von TMRM wurde mit dem 488 nm-Laser angeregt, während die Emission mit einem 590 nm-Bandpass-Filter gemessen wurde. Die Verstärkereinstellungen und die Kompensation wurden zunächst an TMRM-negativen Zellen mit dem 488 nm-Laser angepasst, um den *Crosstalk* zwischen den verschiedenen Fluorophoren zu kompensieren. Der FSC wurde als Triggerparameter benutzt. Folgende Kompensation zwischen den Kanälen/Parametern wurde verwendet: FL1 -34% FL2; FL4 -4.5% FL1; FL1 -16% FL4. Die hohe Kompensation zwischen YFP und TMRM ist auf die

partielle Überlappung ihrer Emissionsspektren zurückzuführen. Jeweils 10000 Ereignisse wurden mit der FloMax Software von Partec aufgenommen und ausgewertet.

Verwendete Lösungen:

TMRM 1 mM in DMSO

2.2 Methoden der Molekularbiologie

2.2.1 Präparation von Nukleinsäuren

Isolierung der Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus Zellen wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) durchgeführt. Maximal 1 x 10^7 adhärente Zellen wurden durch die Zugabe von 600 µl des Puffers RLT in den Kulturgefäßen lysiert. Da der Lysepuffer Guanidinisothiozyanat (GSCN) und β-Mercaptoethanol enthält, war durch das denaturierende und reduzierende Milieu gleichzeitig eine Inaktivierung vorhandener RNasen gewährleistet. Das Lysat wurde durch wiederholtes Pipettieren resuspendiert und auf eine QIAshredder Säule überführt, um das Lysat zu homogenisieren und unlösliche Zellbestandteile abzutrennen. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 13000 U/min wurde 1 Volumen 70% (v/v) Ethanol zugegeben, gemischt und die Lösung auf eine RNeasy Mini Spin Säule aufgetragen. Nach der Zentrifugation (15 sec, 13000 U/min) lag die RNA, an die Silikagel-Membran gebunden, vor. Durch dreimaliges Waschen wurden kleine RNAs, die kürzer als 200 Nukleotide waren, und andere Verunreinigungen mittels Zentrifugieren (15 sec, 13000 U/min) abgetrennt. Schließlich wurde die RNA mit RNase-freiem H_2O von der Säule eluiert und bei -80 °C gelagert.

Verwendete Lösungen:

Lysepuffer RLT	enthält GSCN, Zugabe von β-Mercaptoethanol (1:100)
Waschpuffer RW1	enthält GSCN
Waschpuffer RPE	enthält Ethanol

Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Minipräparative Plasmidisolierung

Zur schnellen Isolierung der Plasmide aus *E. coli* für eine qualitative Analyse der Plasmid-DNA wurde ein modifiziertes Verfahren der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) verwendet. Am Abend zuvor war mit einer einzelnen Kolonie eine 3 ml Flüssigkultur (LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum) angeimpft worden. Diese wurde 12-14 h später abzentrifugiert (1 min, 13000 U/min), das Pellet in 150 µl Tris-Puffer P1 resuspendiert und durch Zugabe von 200 µl des basischen Puffers P2 für fünf Minuten lysiert. Nach fünfminütiger Inkubation in Puffer P2 wurde die Reaktion mit 200 µl kaltem Neutralisationspuffer P3 gestoppt und die Ansätze für fünf Minuten auf Eis gekühlt. Um Zelltrümmer zu beseitigen, wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 13000 U/min). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 500 µl Ethanol versetzt und gut gemischt. Die Plasmid-DNA wurde sedimentiert (30 min, 4 °C, 13000 U/min), mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet, bevor sie in TE-Puffer aufgenommen werden konnte.

Verwendete Lösungen:

Puffer P1	50 mM Tris-HCl, pH 8
	10 mM EDTA
	100 µg/ml RNase A
Puffer P2	200 mM NaOH
	1% (v/v) SDS
Puffer P3	3 M KAc, pH 5.5
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8.0
	1 mM EDTA

Präparative Plasmidisolierung (Maxipräp)

Zur quantitativen und qualitativen Plasmidpräparation aus *E. coli* für anschließende enzymatische Modifikationen und Transfektionen wurde der EndoFree Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen verwendet. Auch diese Methode basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien (Birnboim and Doly, 1979). Nach Abtrennung der Zelltrümmer wird die Plasmid-DNA bei

geeignetem pH-Wert und niedriger Salzkonzentration an eine Anionenaustauschersäule gebunden. Bei den anschließenden Waschschritten werden RNA, Proteine und andere Verunreinigungen entfernt, so dass die DNA schließlich durch einen Puffer mit hoher Salzkonzentration eluiert werden kann.

Aus einer 3 ml Vorkultur, die mit einem Insert$^+$-getesteten Klon angeimpft worden war, wurden 50 µl in 250 ml LB-Selektionsmedium überführt und in einem Schikanenkolben bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Am folgenden Tag wurden die Bakterien durch Zentrifugation (5000 U/min, 10 min, 4 °C) sedimentiert und mit 10 ml Tris-Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml des Lysepuffers P2 wurden die Ansätze für fünf Minuten bei RT inkubiert, bevor durch Zusetzen von 10 ml des Neutralisationspuffers P3 die Lyse beendet wurde. Durch Filtration wurde die lösliche Plasmid-DNA von der an Zelltrümmern gebundenen chromosomalen DNA abgetrennt. Während das Filtrat zum Entfernen von Endotoxinen 30 min mit 2.5 ml Puffer ER auf Eis inkubiert wurde, wurde eine Anionenaustauschersäule mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert. Nach Binden der Plasmid-DNA an die Säule und zweimaligem Waschen mit Puffer QC (je 30 ml) wurde die DNA mit 15 ml Puffer QN eluiert. Durch Zugabe von 0.7 Volumen Isopropanol und Zentrifugation (15000x g, 30 min, 4 °C) wurde die DNA präzipitiert, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und das getrocknete Pellet in TE-Puffer aufgenommen.

Verwendete Lösungen:

Puffer P1	50 mM Tris-HCl, pH 8 1% (v/v) SDS 100 µg/ml RNase A	Puffer P2	200 mM NaOH 10 mM EDTA
Puffer P3	3 M KAc, pH 5.5	Puffer QBT	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7.0 15% Isopropanol (v/v) 0.15% Triton X-100 (v/v)
Puffer QC	1.0 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7.0 15% Isopropanol (v/v)	Puffer QN	1.6 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7.0 15% Isopropanol (v/v)

TE-Puffer 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
1 mM EDTA

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration und Reinheit der isolierten Nukleinsäuren zu bestimmen, wurde die Absorption bei λ=260 nm und λ=280 nm photometrisch gemessen. Das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren liegt bei λ=260 nm. Dabei entspricht eine optische Dichte (OD) von eins 40 µg RNA/ml, 50 µg DNA/ml und 20 µg Oligonukleotide/ml. Proteine dagegen absorbieren bevorzugt bei λ=280 nm, so dass der Quotient $OD_{260/280}$ als Maß für die Reinheit verwendet werden kann. Bei sauberen RNA-Präparationen liegt er bei 1.7-2.0, während reine DNA einen Wert von 1.8 aufweist.
Ein Aliquot der zu vermessenden Nukleinsäuren wurde 1:100 in DEPC-H_2O oder TE-Puffer verdünnt und in eine Quartzküvette überführt. Nachdem die OD bei 260 nm und 280 nm bestimmt worden war, wurde daraus die Menge und die Qualität der Probe berechnet.

2.2.2 Transformation von DNA in *E. coli*

Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterien (*E. coli* DH5α)

Für die Isolierung einzelner, spezifischer Bakterienklone wurden Kulturen auf festen Nährböden angesetzt. Dazu wurde LB-Agar in dest. H_2O gelöst und nachdem diese Lösung autoklaviert und auf 50 °C abgekühlt war, mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und in Petrischalen gegossen. Auf diesen Agar-Platten wurden die Bakterien ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Zur quantitativen Anreicherung der Bakterien wurden Flüssigkulturen angelegt. Einzelne Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in LB-Medium mit einem geeigneten Antibiotikum (Ampicillin: 100 µg/ml; Kanamycin: 100 µg/ml) bei 37 °C unter Schütteln (180 U/min) über Nacht kultiviert.

Zur Kryokonservierung der Bakterien wurden einzelne Klone über Nacht in 5 ml LB-Medium vermehrt und mit 20% (v/v) sterilem Glyzerin vermischt. Nach dem Überführen in Kryoröhrchen wurden die Aliquots bei -80 °C aufbewahrt.

Verwendete Lösungen:

LB Medium (Sigma-Aldrich)	20 g/l in dest. H_2O, autoklavieren
LB Agar (Sigma-Aldrich)	40 g/l in dest. H_2O, autoklavieren
Ampicillin	Stocklösung 100 mg/ml in dest. H_2O
Kanamycin	Stocklösung 100 mg/ml in dest. H_2O

Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

E. coli DH5α Bakterien wurden auf antibiotikafreien Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Eine einzelne Kolonie wurde in 50 ml LB-Medium überführt und bei 37 °C und 250 U/min ebenfalls über Nacht vermehrt. Mit 2 ml dieser Über-Nacht-Kultur wurden 200 ml LB-Medium angeimpft und so lange inkubiert, bis die Bakterien eine Dichte von $OD_{590\ nm}$=0.375-0.425 erreicht hatten. Nachdem die Kultur durch eine zehnminütige Inkubation auf Eis abgekühlt worden war, wurden die Bakterien auf vier 50 ml Röhrchen verteilt und zentrifugiert (1600x g, 7 min, 4 °C). Die Pellets wurden in 10 ml eiskalter $CaCl_2$-Lösung resuspendiert, erneut zentrifugiert (1100x g, 5 min, 4 °C) und in 10 ml eiskalter $CaCl_2$-Lösung aufgenommen. Nach einer halbstündigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien wieder pelletiert (1100x g, 5 min, 4 °C), in 2 ml eiskalter $CaCl_2$-Lösung resuspendiert und zu je 100 µl in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert. Die kompetenten Bakterien wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

Verwendete Lösungen:

$CaCl_2$-Lösung	60 mM $CaCl_2$
	15% Glycerol
	10 mM PIPES pH 7.0

Ligation

Bei einer Ligation werden die Enden zweier DNA-Moleküle verknüpft, indem das Enzym DNA-Ligase die Ausbildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen einer freien 5'-Phosphat- und einer 3'-Hydroxylgruppe katalysiert. Dabei können sowohl stumpfe als auch überhängende Nukleinsäure-Enden verbunden werden. Um eine Religation des Vektors ohne Insertion des gewünschten DNA-Fragments zu minimieren, wurde das kleinere Fragment bei stumpfen Enden in einem drei- bis fünffachen Überschuss eingesetzt. Bei überhängenden

Enden wurden äquimolare Mengen an Vektor- und Insert-DNA verwendet. Nachdem Vektor und Insert durch geeignete Restriktionsverdaus mit kompatiblen Enden ausgestattet worden waren, wurde in einem Gesamtvolumen von 10-20 µl die Ligationsreaktion angesetzt. Plasmid- und Insert-DNA wurden mit 1x Ligasepuffer und 5 U T_4-Ligase versetzt und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Ligationsansätze entweder für eine Transformation eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Ein 100 µl-Aliquot der kompetenten *E. coli* DH5α Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 10-100 ng des zu transformierenden Plasmids vermischt. Nach einer zwanzigminütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Transformation der Bakterien durch einen Hitzeschock (2 min, 42 °C). Anschließend wurden die Bakterien für zwei Minuten auf Eis abgekühlt, bevor sie mit 1 ml LB-Medium versetzt und zur Expression des entsprechenden Resistenzgens eine Stunde bei 37 °C und 250 U/min geschüttelt wurden. 100 µl des Transformationsansatzes wurden dann auf Agarplatten, die mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt worden waren, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.3 *In vitro*-Synthese von Nukleinsäuren

cDNA-Synthese

Die Erststrang-cDNA-Synthese erfolgte mit der *Moloney Murine Leukemia Virus*-Reversen Transkriptase (M-MLV RT) von Invitrogen. Als Primer für das Enzym wurden *Random Hexamers* verwendet, als Matrize diente die isolierte Gesamt-RNA. Für einen Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden zunächst 2 µl Hexamer-Primer mit 1 µg Gesamt-RNA vermischt und mit RNase-freiem H_2O auf 12 µl aufgefüllt. Zur Auflösung von Sekundärstrukturen der RNA wurden die Proben für fünf Minuten bei 65 °C im Thermocycler denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Dann wurde jeder Ansatz mit 8 µl eines Reaktionsgemisches, bestehend aus 4 µl 5x RT-Puffer, 1 µl dNTP-Mix, 2 µl DTT und 1 µl M-MLV RT versetzt und im Thermocycler mit folgendem Protokoll inkubiert: 5 min/25 °C; 5 min/30 °C; 5 min/35 °C; 50 min/42 °C; 15 min/70 °C. Die so erhaltene Erststrang-cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Verwendete Lösungen:

M-MLV Reverse Transkriptase 200 U/µl

5x RT-Puffer	250 mM Tris-HCl (pH 8.3)
	375 mM KCL
	15 mM $MgCl_2$
Random Hexamer-Primer	0.5 µg/µl
Dithiothreitol (DTT)	100 mM
dNTP-Mix	10 mM

Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur *in vitro* Amplifizierung von Nukleinsäureabschnitten definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen. Das Verfahren wurde von Erlich, Saiki und Mullis für die *in vitro*-Anreicherung des humanen ß-Globin Gens etabliert (Saiki et al., 1985). Es beruht auf der Fähigkeit von DNA-Polymerasen, einen DNA-Einzelstrang zu einem Doppelstrang vervollständigen zu können, wenn geeignete Kofaktoren, dNTPs und ein kurzer, doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung stehen. Bei dem Verfahren hybridisieren einzelsträngige Oligonukleotide (Primer) an die komplementären Stränge des zu vermehrenden DNA-Abschnitts und rahmen ihn in gegenläufiger Orientierung ein. Sie dienen als Starter für eine sich zyklisch wiederholende DNA-Synthese. Da bei jedem Zyklus wieder Produkte entstehen, die zu den Primersequenzen komplementäre Bereiche besitzen, kann der Vorgang nach einem Denaturierungsschritt 25 – 40 x wiederholt werden, so dass es zu einer exponentiellen Vermehrung der Zielsequenz kommt. Jeder Reaktionszyklus der PCR verläuft in drei Teilschritten. Zunächst findet eine thermische Denaturierung der Matrizen-DNA bei 95 °C statt, gefolgt von der Bindung (*Annealing*) der Oligonukleotide an die komplementären Abschnitte der einzelsträngigen Matrizen-DNA bei 50 °C – 65 °C. Der dritte Teilschritt beinhaltet die DNA-Synthese (Elongation, Extension) ausgehend von den Primern, die von einer hitzestabilen DNA-Polymerase verlängert werden. Die dabei gewählte Temperatur ist abhängig von dem Optimum des verwendeten Enzyms, das häufig zwischen 68 °C und 72 °C liegt.

Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Für die RT-PCR wurde 1 µl der zuvor durch die reverse Transkription erhaltenen Erststrang-cDNA in einem Endvolumen von 20 µl eingesetzt. Die Anzahl der Zyklen und das jeweilige Temperaturprofil waren von der zu amplifizierenden Matrize und den dazu verwendeten

Primern abhängig und wurden individuell optimiert. Ein typischer RT-PCR Ansatz enthielt folgende Komponenten:

1 µl cDNA
1 µl sense-Primer
1 µl antisense-Primer
10 µl 2x Reaktionspuffer
0.8 µl Taq-Polymerase
ad 20 µl H_2O

Für die Amplifikation der G/C-reichen Sequenz der PUMA-cDNA wurde dem Reaktionsansatz Betain in einer Endkonzentration von 2 M zugegeben.
Folgendes Standard-Protokoll wurde für die PCR verwendet:

Temperatur	**Zeit**	**Zyklenzahl**
95 °C	60 sec	1x
95 °C 56 °C-62 °C 72 °C	30 sec 60 sec 60 sec	25-40x
72 °C	120 sec	1x

Ein Aliquot der PCR-Produkte wurde mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und in einem 1.5% Agarose-Gel aufgetrennt, um zu überprüfen, ob eine Bande im erwarteten Molekulargewichtsbereich amplifiziert worden war. Außerdem ergab das Mitauftrennen der Negativkontrolle, die alle Komponenten außer der cDNA-Matrize enthält, ob unspezifische Amplifikationen stattgefunden hatten.

Verwendete Lösungen:

2x Reaktionspuffer	20 mM Tris-HCl, pH 8.3
	100 mM KCl
	3 mM $MgCl_2$
	dNTPs (jeweils 0.4 mM)
Oligonukleotide	25 pM/µl
Taq-Polymerase	1 U/µl

Real Time RT-PCR

Eine relative Quantifizierung von mRNA-Transkripten wurde mittels *Real Time* RT-PCR mit dem *LightCycler*-System der Firma Roche und dem *QuantiTect SYBR Green* PCR Kit von Qiagen durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Menge an doppelsträngiger (ds) DNA, die am Ende der Elongationsphase jedes PCR-Zyklusses vorliegt, durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I detektiert (Wittwer et al., 1997). Dieser Farbstoff lagert sich in die kleine Furche der ds DNA ein und wird durch Licht der Wellenlänge λ=480 nm angeregt. Die emittierte Fluoreszenz von SYBR Green, das im Komplex mit ds DNA vorliegt, ist dabei ca. 1000x höher als die des ungebundenen Farbstoffs. Da sich SYBR Green Sequenz-unabhängig an alle ds DNA-Moleküle anlagert und somit auch unspezifische PCR-Produkte und Pimer-Dimere zu dem Fluoreszenzsignal beitragen, muss die Spezifität der Amplifikate überprüft werden. Dies geschieht durch gelelektrophoretische Auftrennung und Schmelzpunktanalyse der PCR-Produkte. Bei letzterer Methode wird am Ende des PCR-Laufs die Temperatur schrittweise bis auf 95 °C angehoben und durch Messung der Fluoreszenzintensität die Denaturierungstemperatur der Amplifikate bestimmt. Da jedes PCR-Produkt aufgrund seiner Größe und Basenzusammensetzung eine spezifische Schmelztemperatur aufweist, können dabei verschiedene DNA-Populationen innerhalb einer Probe unterschieden werden (Ririe et al., 1997).

Bei der relativen Quantifizierung wird nicht die Absolutmenge der Anfangskopien eines Transkripts bestimmt; stattdessen wird die Expression des Zielgens auf die eines *Housekeeping* Gens bezogen, das ubiquitär exprimiert wird und unter den gewählten Versuchsbedingungen unreguliert vorliegen muss. Dadurch werden Variationen zwischen einzelnen Proben aufgrund unterschiedlicher Effizienzen bei der RNA-Extraktion oder der cDNA-Synthese normalisiert.

Als Quantifizierungsmaß wird für jede Probe der *Crossing Point* (CP) bestimmt, der die Zahl der PCR-Zyklen angibt, die für das Erreichen eines definierten Fluoreszenzniveaus notwendig sind, das den Eintritt der PCR in die exponentielle Amplifizierungsphase markiert. An diesem Schwellenwert befindet sich in jeder Probe die gleiche Anzahl neu synthetisierter DNA-Moleküle, deren Menge sich mit jedem weiteren Zyklus verdoppelt, falls die Effizienz der PCR 100% entspricht. Wenn die Effizienzen der PCRs für das Zielgen und das Referenzgen nicht identisch sind, ergeben sich deutliche Schwankungen in den ermittelten Expressionsniveaus. Um unterschiedliche Effizienzen auszugleichen, wird durch eine Verdünnungsreihe einer der Proben eine relative Standardkurve generiert und in jedem PCR-

Lauf mitamplifiziert. Daraus können die Effizienzen für die Amplifikation des Ziel- und des Referenzgens abgeleitet und normiert werden.

Die PCR-Ansätze enthielten ein Gesamtvolumen von 20 µl, das sich aus 2 µl cDNA, 1 µl der *sense*- und *antisense*-Primer-Mischung und 10 µl des 2x SYBR Green Mastermixes zusammensetzte. Nachdem aus einer der cDNA-Kontrollproben eine relative Standardkurve angesetzt worden war, wurden die Proben in den Glaskapillaren durch kurze Zentrifugation (3000 U/min, 20 sec) sedimentiert und in das LightCycler-Rondell eingesetzt. Das folgende *Hotstart*-Protokoll wurde für die Amplifizierung der Proben verwendet:

	Temperatur	**Zeit**	**Zyklenzahl**
Präinkubation	95 °C	15 min	1x
Amplifikation	94 °C 59 °C-62 °C 72 °C	15 sec 20-25 sec 20-25 sec	35-40x
Schmelzkurve	55 °C→ 95 °C	0.1 °C/sec	1x
Abkühlen	auf 40 °C		1x

Um die Spezifität der PCR zu überprüfen, wurden Schmelzpunktanalysen durchgeführt. Neu abgeleitete Primerpaare wurden auch durch gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte getestet. Die Analyse der Daten erfolgte anhand der mitgeführten Standardkurve bzw. des *Calibrators* mit der LightCycler Software 4.0. Als Referenzgene dienten die *housekeeping*-Gene Glyzerinaldehyd-3-Phospat-Dehydrogenase (GAPDH) und β-Aktin.

Verwendete Lösungen:

2x SYBR Green Mastermix	enthält u. a. HotStarTaq® DNA Polymerase 2.5 mM $MgCl_2$
Oligonukleotide	25 pM/µl

Primerdesign

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von humanen cDNA-Sequenzen, die in der NCBI Nucleotide GenBank abgelegt sind, mit Hilfe der frei zugänglichen Software Primer3 abgeleitet. Für die *Real Time* PCR wurde der Abstand der Primer so gewählt, dass die amplifizierten Fragmente eine Größe von 100 - 200 bp aufwiesen.

2.2.4 Auftrennung, Reinigung und Analyse von Nukleinsäuren

Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen

Um DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge zu analysieren oder aufzureinigen, wurden sie durch horizontale Gelelektrophorese in Agarose-Gelen aufgetrennt. Je nach Molekulargewicht der DNA-Fragmente (0.1- 10 kb) variierte die Agarosekonzentration des Gels zwischen 0.5 – 3%. Die benötigte Agarosemenge wurde in 1x TBE-Puffer durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt war, wurde der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (1 µg/ml) zugegeben und der Ansatz in den vorbereiteten Gelträger gegossen. Zur Aussparung der Auftragstaschen wurde ein Kunststoffkamm eingesetzt. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde es auf einem Träger in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 1x TBE-Laufpuffer bedeckt. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt und in die Auftragstaschen geladen. Nachdem auch ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen worden war, erfolgte die Auftrennung bei einer konstanten Spannung von 5-6 V/cm. Die DNA-Banden wurden mit einem Transilluminator bei λ=254 nm visualisiert und mit der Geldokumentationsanlage digitalisiert.

Verwendete Lösungen:

10x TBE (pH 8.2)	900 mM Tris
	900 mM Borsäure
	12.5 mM EDTA
DNA-Ladepuffer (6x)	0.25% Bromphenolblau
	0.25% Xylencyanol
	25 mM EDTA
	30% (v/v) Glyzerin
Ethidiumbromid	10 mg/ml

DNA-Molekulargewichtsmarker (Promega)

Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde der QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen verwendet. Nachdem die entsprechende DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten worden war, wurde die Agarose durch Zugabe von drei Volumen des

Solubilisierungspuffers QG und zehnminütige Inkubation bei 50 °C aufgelöst. Dann wurden die Proben mit einem Volumen Isopropanol versetzt und auf die QIAquick-Säulen geladen. In der anschließenden Zentrifugation (1 min, 13000 U/min) erfolgte die Bindung der DNA-Fragmente in Gegenwart hoch konzentrierter chaotroper Salze an die Silikamembran der Säulen. Um Agarosereste, Salze und andere Verunreinigungen abzutrennen, schlossen sich je ein Waschgang mit dem Solubilisierungspuffer QG und dem ethanolhaltigen Puffer PE an. Der letzte Zentrifugationsschritt (1 min, 13000 U/min) erfolgte ohne Zugabe eines Puffers, um eine vollständige Entfernung des Ethanols zu gewährleisten. Anschließend wurde die DNA mit dest. H_2O von der Säule eluiert und bei -20 °C gelagert.

Restriktionsanalyse von DNA-Fragmenten

Um Plasmide für die Ligation zu linearisieren, DNA-Fragmente zur Subklonierung auszuschneiden oder den Klonierungserfolg eines rekombinanten Plasmids zu überprüfen, wurden Restriktionsverdaus durchgeführt. Die Enzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von der Firma New England Biolabs bezogen. Abhängig davon, ob es sich um eine analytische oder präparative Restriktion handelte, wurden 1-15 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 10-30 µl verwendet. Pro µg eingesetzter DNA wurden 5 U der Restriktionsendonuklease mit dem geeigneten 10x Puffer zugegeben und die Ansätze für ein bis drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Restriktionsansatz mit 1/6 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt, auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschten DNA-Fragmente ggf. aus dem Gel eluiert.

2.2.5 RNA-Interferenz (RNAi)

RNA-Interferenz stellt einen evolutionär konservierten Prozess dar, bei dem kurze doppelsträngige RNA-Moleküle Sequenz-spezifisch die Translation von mRNA-Transkripten inhibieren, die Degradierung komplementärer mRNAs induzieren oder die Genexpression durch Chromatinmodifikationen beeinflussen (Meister and Tuschl, 2004). Diese 21-28 bp langen ds RNA-Moleküle entstehen durch Prozessierung längerer Vorläufermoleküle und werden aufgrund ihrer Herkunft in *small interfering* RNA (siRNA), microRNA (miRNA) oder *repeat-associated short interfering* RNA (rasiRNA) unterteilt. Die Vorläufer der miRNAs werden vom zellulären Genom kodiert und besitzen 20 bis 50 bp lange *inverted repeats*, die zur Ausbildung von *hairpin*-Strukturen führen. rasiRNAs dagegen entstehen durch die Transkription überlappender *sense*- und *antisense*-RNAs eines Lokus, deren komplementäre Bereiche zu doppelsträngiger RNA hybridisieren. siRNAs werden aus langen

ds RNA-Molekülen gebildet, die beispielsweise als Intermediate bei der Replikation von RNA-Viren auftreten oder können als synthetische, 19-21 bp lange RNA-Duplexe durch Transfektion in Zelllinien oder lebende Organismen eingebracht werden.

Transiente und stabile Verminderung der Genexpression durch RNAi

Um die Funktion bestimmter Apoptose-relevanter Gene zu untersuchen, wurde die Expression des BH3-only Proteins PUMA und der Todesrezeptoren DR4 und DR5 durch transiente Transfektion geeigneter siRNAs herunterreguliert. Da die Expression des BH3-only Proteins Bid stabil vermindert werden sollte, wurde hierfür ein auf dem *pSilencer*-Vektor basierendes System verwendet, das eine Zielsequenz-spezifische *small hairpin* RNA (shRNA) exprimiert. Diese shRNA wird durch die zelleigenen Enzyme zu funktioneller siRNA prozessiert (Brummelkamp et al., 2002; Paddison et al., 2002). Der in dieser Arbeit verwendete *pSilencer* 2.1-U6 hygro Vektor (Ambion) nutzt den humanen U6 RNA-Polymerase III Promotor zur Expression der shRNA. Bei diesem Promotor befinden sich alle regulatorischen Elemente 5' des kodierenden Bereichs und die Position des Startnukleotids ist durch den Abstand zur TATA-Box definiert (Kunkel and Pederson, 1989). Damit ist gewährleistet, dass Initiation und Elongation Sequenz-unabhängig erfolgen, bis die RNA-Polymerase III auf ihr Terminationssignal, eine Sequenz von 4-6 Thymidinen, stößt (Lobo and Hernandez, 1989). Außerdem fehlen Polyadenylierungssignale, so dass die Transkripte denen von miRNAs ähneln und entsprechend prozessiert werden.
Zur Selektion stabiler Transfektanten besitzt der *pSilencer* 2.1-U6 hygro Vektor das ursprünglich aus *E. coli* isolierte Resistenzgen Hygromycin Phosphotransferase (hph^r), das das Antibiotikum Hygromycin B durch Phosphorylierung inaktivieren kann (Gritz and Davies, 1983).

Auswahl der Sequenzen für RNAi

Für den *knock down* der Todesrezeptoren DR4 und DR5 konnte auf bereits publizierte siRNA-Sequenzen zurückgegriffen werden (Ren et al., 2004). Die Zielsequenzen für die Herunterregulierung der Expression von Bid und PUMA wurden mit der siDESIGN-Software von Dharmacon identifiziert, die im Internet frei zugänglich ist. Der dabei verwendete Algorithmus klassifiziert potentielle siRNAs aufgrund thermodynamischer und Sequenz-abhängiger Kriterien wie niedrigem bis mittleren G/C-Gehalt (30-52%), Vermeidung von *inverted repeats* oder Palindromen, geringe interne Stabilität des *guide* Strangs am 5'-Ende und Nukleotidpräferenzen an bestimmten Positionen innerhalb der siRNA (Boese et al., 2005;

Reynolds et al., 2004). Da für den Bid *knock down* eine von der RNA-Polymerase III transkribierte shRNA verwendet werden sollte, durfte die Zielsequenz keine internen poly(dT)-Sequenzen besitzen, weil eine Abfolge von vier oder mehr Thymidinen als Terminationssignal dient (Das et al., 1988). Zusätzlich sollte die Zielsequenz mit einer Purinbase beginnen, da die RNA-Polymerase III dort bevorzugt die Transkription initiiert. Die Spezifität der identifizierten Sequenzen für die gewünschte Ziel-mRNA wurde durch eine BLAST-Suche in den humanen Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) überprüft.

Hybridisierung der shRNA-Inserts

Die shRNA-Inserts zur Klonierung in den *pSilencer*-Vektor wurden als 64 nt lange *sense*- und *antisense*-Oligonukleotide von der Firma MWG Biotech bezogen. Dabei bilden die zur Ziel-mRNA spezifischen, einander komplementären 19 nt Abschnitte den Stamm der *hairpin*-Struktur aus. Die beiden komplementären Bereiche sind durch eine 9 nt *loop*-Sequenz von einander separiert. Neben der Terminationssequenz für die RNA-Polymerase III besitzt das Oligonukleotid außerdem eine *Bam*H I-Schnittstelle am 5'- und eine *Hin*d III-Schnittstelle am 3'-Ende für die Klonierung in den *pSilencer*-Vektor.

Zur Herstellung der shRNA-Inserts wurden die Oligonukleotide zunächst in DEPC-H_2O aufgenommen und eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt. Dann wurden je 2 µl der komplementären *sense*- und *antisense*-Oligonukleotide in 46 µl 1x DNA *annealing solution* (Ambion) verdünnt. Dieser Hybridisierungsansatz wurde für drei Minuten bei 90 °C im Thermocycler erhitzt, langsam auf 37 °C abgekühlt und anschließend eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Bis zur Ligation wurden die hybridisierten Oligonukleotide bei -20 °C gelagert. 1 µl dieses Hybridisierungsansatzes wurde für die Ligation in 100 ng des *pSilencer* Vektors verwendet.

2.3 Methoden der Proteinbiochemie

2.3.1 Gesamtproteinextraktion

Zur Gewinnung der Gesamtproteinextrakte wurden die Zellen durch Trypsinieren von ihren Kulturgefäßen abgelöst, 3 min bei 1000 U/min pelletiert und in 1 ml PBS aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation (10000 U/min, 10 sec) wurden die Pellets in 10 µl PBS resuspendiert und je nach Größe mit 40-100 µl SDS-Lysepuffer gemischt. Zur Homogenisierung wurden die Proben für 15 min bei 95 °C inkubiert und Zelltrümmer durch

Zentrifugieren (13000 U/min, 10 min) abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.
Alternativ wurde der Zellrasen direkt mit einer geeigneten Menge SDS-Lysepuffer (100 µl/1.5 x 10^6 Zellen) versetzt und mit einem Gummischaber in Eppendorfgefäßen gesammelt. Auch hier wurden die Proben ca. 15 min bei 95 °C aufgekocht, anschließend abzentrifugiert (13000 U/min, 10 min) und bei -20 °C eingefroren.

Verwendete Lösungen:

SDS-Lysepuffer 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)
10% Glycerin
2% SDS

Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde mit dem BCA Protein Assay Kit kolorimetrisch bestimmt (Smith et al., 1985). Bei dieser Methode reduzieren die in den Proben enthaltenen Proteine Cu^{2+} zu Cu^{+}-Ionen, die im alkalischen Milieu mit Bicinchoninsäure violett gefärbte Komplexe bilden**.** Die Komplexbildung ist proportional zur Proteinkonzentration und kann bei einer Wellenlänge von λ=562 nm im Photometer vermessen werden.
Zunächst wurden 150 µl 0.9% NaCl-Lösung in 96-Well-Platten vorgelegt und mit 2 µl der Proteinextrakte vermischt. Nachdem auch eine Eichkurve mit BSA-Lösungen bekannter Konzentration hergestellt worden war, wurden alle Proben mit 150 µl der BCA-Lösung überschichtet und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die Absorption bei λ= 560 nm gemessen und ausgehend von der Standardkurve die Proteinkonzentrationen der Zellextrakte bestimmt.

Verwendete Lösungen:

BCA Protein Assay Kit (Reagenz A (25 Teile): Reagenz B (25 Teile): Reagenz C (1Teil))
BSA-Standard (2 mg/ml)

Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach dem Protokoll von Laemmli (Laemmli, 1970). Durch die Anwesenheit des ionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS), das sich unspezifisch

an die Proteine anlagert, werden diese denaturiert und mit einer negativen Gesamtladung versehen, die proportional zu ihrer Größe ist. Wandern die Proteine anschließend in einem elektrischen Feld, erfolgt ihre Auftrennung nur noch in Abhängigkeit von der Molekularmasse, nicht aber von ihrer Eigenladung. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden zwei Gele (Sammel- und Trenngel), die sich in der Acrylamidkonzentration sowie im pH-Wert unterscheiden, übereinander geschichtet. An der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel werden die Proteine konzentriert, so dass nach dem Einlaufen in das Trenngel eine reproduzierbare Auftrennung stattfinden kann. Je nach Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine wurden Trenngele mit Acrylamidkonzentrationen zwischen 6% und 15% verwendet. Die Herstellung der Gele erfolgte nach dem Protokoll von Sambrock et al. (Sambrook et al., 1989). Die Polymerisierung des Acrylamids und des Bisacrylamids wurde durch die Zugabe von TEMED und APS gestartet. Die Trenngel-Lösung wurde zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um einen luftblasenfreien, geraden Gelabschluss zu gewährleisten. Nachdem das Trenngel polymerisiert und das Isopropanol entfernt worden war, wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Probenkamm eingesteckt. Aus den polymerisierten Gelen wurde der Probenkamm entfernt, die Gele wurden in die Gelbox eingesetzt und in der Gelkammer mit 1x SDS-PAGE-Laufpuffer bedeckt. Jeweils 20 – 40 µg der Gesamtproteinextrakte wurden mit 6x SDS-PAGE-Ladepuffer versetzt, fünf Minuten bei 95 °C gekocht und in die Geltaschen gefüllt. Nachdem auch ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen worden war, wurden die Proteine bei konstanter Stromstärke (20-25 mA) aufgetrennt.

Verwendete Lösungen:

Trenngel (10 ml)	**6%**	**10%**	**12%**	**15%**
40% Acrylamid	1.5 ml	2.5 ml	3 ml	3.75 ml
1 M Tris-HCl (pH 8.8)	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
dest. H_2O	4.75 ml	3.75 ml	3.15 ml	2.4 ml

zu 10 ml Gellösung werden 100 µl APS und 5 µl TEMED zugegeben

Sammelgel (100 ml Stock)	**5%**
40% Acrylamid	12.5 ml
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	12.5 ml
10% SDS	1 ml

dest. H_2O	72.5

zu 5 ml Gellösung werden 50 µl APS und 2.5 µl TEMED zugegeben

5x SDS-PAGE-Laufpuffer	15.1 g Tris 94 g Glyzin 50 ml 10% SDS auf 1 Liter auffüllen
Ladepuffer für SDS-PAGE (6x)	0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 10% SDS 30% Glyzerin 5% β-Mercaptoethanol 0.012% Bromphenolblau
Ammoniumpersulfat (APS)	10% (w/v)
Proteingrößenstandards	Precision Plus Protein All Blue Standard (Biorad) Mark 12 (Invitrogen)

Coomassie-Färbung von Proteingelen

Die Gele wurden zunächst in der Färbelösung auf einem Schüttler über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Gele zwei Stunden in der Entfärbelösung geschwenkt, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen und anschließend für weitere vier Stunden in der Aufbewahrungslösung gewaschen. Zur weiteren Lagerung wurden die Gele in der Aufbewahrungslösung in Folie eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

Verwendete Lösungen:

Färbelösung:	50% Ethanol 10% Essigsäure 40% dest. H_2O 0.1% Coomassie Brilliant Blue R250
Aufbewahrungslösung:	7% Essigsäure 93% dest. H_2O

Entfärbelösung: 5% Ethanol
12.5% Essigsäure
82.5% dest. H_2O

Geltrocknung

Das gefärbte Gel wurde auf ein Whatman Filterpapier passender Größe gelegt und mit Saranfolie abgedeckt. Anschließend wurde es auf einem Geltrockner für zwei Stunden bei 75 °C unter Vakuum getrocknet.

Transfer von Proteinen auf Nitrozellullosemembranen (Western Blot)

Nach dem Auftrennen der Proteine in der SDS-PAGE wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Für diesen Transfer, der als Western Blot bezeichnet wird, wurde ein elektrophoretisches Blotverfahren nach Towbin et al. benutzt (Towbin et al., 1979). Dazu wurden zunächst vier Whatman Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran auf die Gelgröße zugeschnitten und zusammen mit dem Gel in Transferpuffer equilibriert. Dann wurden sie in folgender Reihenfolge in die Blot-Apparatur geschichtet:

Kathode
2x Filterpapier
Proteingel
Nitrozellulosemembran
2x Filterpapier
Anode

Der einstündige Transfer der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 18 V. Um die Effizienz des Transfers zu überprüfen, wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Blotten für zwei Minuten in Ponceau S-Lösung gefärbt. Die aufgetrennten Proteine und der Molekulargewichtsstandard wurden als rote Banden sichtbar und die Markerbanden konnten mit einem Bleistift auf der Membran markiert werden. Durch Inkubation der Blots in Blockierungspuffer wurden die Membranen wieder entfärbt und gleichzeitig unspezifische Bindungsstellen abgesättigt.

Verwendete Lösungen:

Ponceau-Lösung 0.1% Ponceau-S in 5% Essigsäure

Transfer-Puffer	25 mM Tris 192 mM Glyzin 20% Methanol
TBS-T-Puffer	50 mM Tris (pH 7,5) 150 mM NaCl 0.1% Triton-X 100
Blockierungspuffer	TBS-T-Puffer mit 3% Milchpulver

Immundetektion der Proteine im Western Blot

Zunächst wurde die Nitrozellulosemembran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in Blockierungspuffer inkubiert (1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C). Dann wurde der Primär-Antikörper, der in Blockierungspuffer 1:500 bis 1:5000 verdünnt war, zugegeben und die Membran darin entweder zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C geschwenkt. Überschüssiger Primär-Antikörper wurde durch Waschen des Blots mit TBS-T-Puffer (3x 5 min) entfernt, bevor sich die einstündige Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper (1:5000 in Blockierungspuffer) anschloss. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-T-Puffer erfolgte die Detektion der Proteinbanden mit dem *Enhanced Chemiluminescence*-Kit von Amersham oder Pierce. Dabei erzeugt das an den Sekundär-Antikörper gekoppelte Enzym *Horseradish-Peroxidase* (HRP) durch den Umsatz des Substrats Luminol Chemilumineszenz, die mit dem FujiFilm LAS-3000 *Imaging System* detektiert wurde.

Verwendete Lösungen:

ECL-Lösung	Lösung A: enthält Luminol und p-Cumarsäure in Tris-Puffer Lösung B: enthält H_2O_2 in Tris-Puffer

Entfernen der Antikörper von Nitrocellulosemembranen (*Stripping*)

Die Membranen wurden für 15-20 min bei 60 °C in der *Stripping*-Lösung inkubiert und dabei geschüttelt. Es schlossen sich vier zehnminütige Waschschritte mit TBS-T-Puffer und eine mindestens einstündige Inkubation mit Blockierungspuffer an, bevor die Blots erneut mit der Primärantikörper-Lösung versetzt oder bei -20 °C eingefroren werden konnten.

Verwendete Lösungen:

Stripping-Puffer	62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)
	100 mM β-Mercaptoethanol
	2% SDS

2.4 Statistik

Die gezeigten Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) oder dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte entweder mit dem t-Test nach Student oder mittels einer ANOVA-Varianzanalyse, kombiniert mit dem Tukey's-Test unter Verwendung der SPSS-Software. p-Werte < 0.05 wurden als signifikant betrachtet.

IV. Ergebnisse

1 Generierung stabiler Bid *knock down*- und Kontrollzelllinien

1.1 Auswahl und Aufbau der Bid-spezifischen shRNAs

Als BH3-only Protein gehört Bid zu den proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie, die die Freisetzung Caspase-aktivierender Proteine aus den Mitochondrien kontrollieren. Das Protease-gespaltene, trunkierte Bid (tBid) ist eines der potentesten BH3-only Proteine, da es mit allen pro- und antiapoptotischen Multidomänenproteinen der Familie interagieren kann (Cartron et al., 2004; Chen et al., 2005; Kim et al., 2006; Kuwana et al., 2005). Im Todesrezeptor-vermittelten Zelltod wird Bid durch Caspase-8- oder -10-Spaltung aktiviert (Li et al., 1998; Milhas et al., 2005), in der mitochondrialen (intrinsischen) Apoptose dient es auch als Substrat anderer, Stress-induzierter Proteasen (Barry et al., 2000; Chen et al., 2001; Cirman et al., 2004; Gil-Parrado et al., 2002; Hou et al., 2008; Stoka et al., 2001; Zhao et al., 2007).

Um die Rolle von Bid in der Todesrezeptor-induzierten (extrinsischen) und in der intrinsischen Apoptose näher zu charakterisieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit humane Zervixkarzinomzellen etabliert, in denen die Bidexpression durch RNA-Interferenz stabil herunterreguliert ist. Da zu dem damaligen Zeitpunkt keine validierten, Bid-spezifischen siRNA-Sequenzen veröffentlicht waren, wurden zunächst entsprechende Oligonukleotide abgeleitet. Dazu wurde die siDESIGN-Software von Dharmacon verwendet, die Sequenzen bevorzugt, welche sich durch niedrigen bis mittleren G/C-Gehalt, schwächere Basenpaarung des *guide* Strangs am 5'-Ende und die Abwesenheit von repetitiven Sequenzen auszeichnen (Boese et al., 2005; Reynolds et al., 2004). Da nicht jede abgeleitete siRNA die Expression des Zielgens effizient reduziert, wurden drei verschiedene, 19 nt lange Sequenzen aus dem translatierten Bereich der Bid-mRNA ausgewählt. Die Spezifität dieser siRNAs für die Ziel-mRNA wurde durch eine BLAST-Suche in den Nukleotiddatenbanken des NCBI überprüft.

shRNA	Zielsequenz auf der Bid-mRNA	Position auf der mRNA	G/C-Gehalt
siBid-1	5'-AAGCTGTTCTGACAACAGC-3'	78-97	47%
siBid-2	5'-AAGGAGAAGACCATGCTGG-3'	430-449	52%
siBid-3	5'-AAGAATAGAGGCAGATTCT-3'	210-229	37%

Tabelle 1: Lage und Sequenz der Bid-spezifischen shRNAs.
Die Kriterien für die Auswahl der Sequenzen sind im Text aufgeführt.

Da Zelllinien mit stabilem Bid *knock down* generiert werden sollten, wurde die Zielgen-spezifische Sequenz als *small hairpin* RNA (shRNA) im *pSilencer* 2.1-U6 hygro Vektor (Ambion, Darmstadt) exprimiert. Das resultierende Transkript besteht aus der 19 nt Bid-spezifischen Sequenz, die durch einen 9 nt *loop* von einer zu ihr revers komplemetären Sequenz getrennt ist und mit dieser den Stamm der Haarnadelstruktur bildet. Diese shRNA wird von zellulären Enzymen zu funktioneller siRNA prozessiert (Brummelkamp et al., 2002).

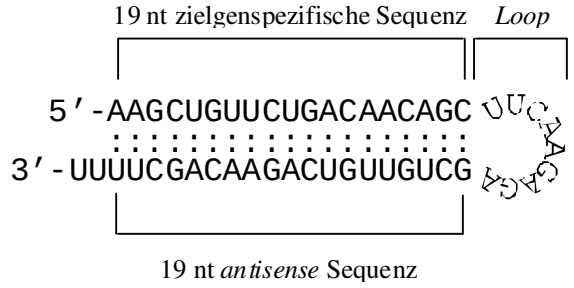

Abbildung 9: Aufbau des *pSilencer*-kodierten *small hairpin*-RNA-Transkripts am Beispiel der Sequenz für siBid-1.
Das Transkript besteht aus einer 19 nt Sequenz, die in diesem Fall zur Bid-mRNA komplementär ist und die mit ihrer *antisense*-Sequenz den Stamm der Haarnadelstruktur ausbildet. Beide Bereiche sind durch einen 9 nt *Loop* miteinander verbunden. Der poly-U-Bereich am 3'-Ende ist Teil des Terminationssignals der Polymerase III.

Um die shRNA-kodierende Sequenz in den *pSilencer*-Vektor zu ligieren und in den Zellen exprimieren zu können, wurde eine 5'-seitige *Bam*H I- bzw. eine 3'- seitige *Hin*d III-Restriktionsschnittstelle sowie am 3'-Ende der Bid-spezifischen Sequenz ein RNA-Polymerase III-Terminationssignal angefügt. Den Aufbau dieser 64 nt *sense*- und *antisense*-Oligonukleotide, die von der Firma MWG Biotech, Ebersberg, synthetisiert wurden, zeigt die folgende Abbildung.

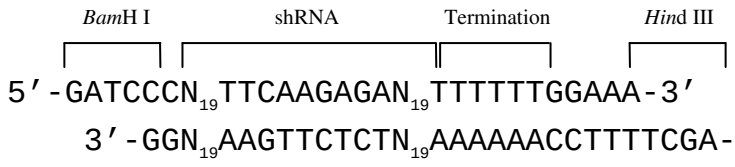

Abbildung 10: Aufbau des shRNA-kodierenden Inserts zur Klonierung in den *pSilencer*-Vektor.

Die einzelsträngigen *sense*- und *antisense*-Oligonukleotide wurden hybridisiert und das resultierende Insert über die *Bam*H I- und *Hin*d III-Schnittstelle in den *pSilencer* Vektor ligiert. Durch Restriktionsanalysen mit den Endonukleasen *Bam*H I/*Eco*R I und *Hin*d III/*Eco*R I konnte die korrekte Insertion in den Vektor verifizert werden.

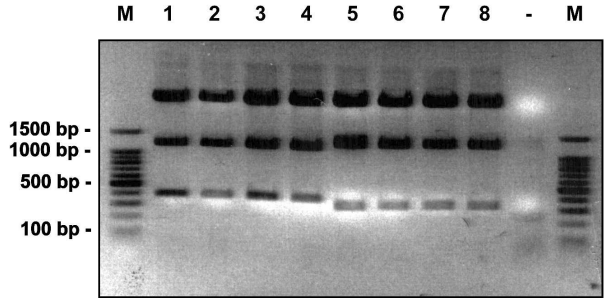

Abbildung 11: Qualitative Restriktionsanalyse der Bid *pSilencer*-Plasmide.
Um die Insertion der shRNA-kodierenden Fragmente zu überprüfen, wurden die Bid *pSilencer* Plasmide einer analytischen Restriktion unterzogen und die Produkte in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Bei korrektem Einbau des Inserts ergibt die Restriktion mit *Hin*d III/*Eco*R I (Spuren 1-4) drei Fragmente (3322, 1181 bzw. 398 bp), ebenso der *Bam*H I/*Eco*R I-Verdau (Spuren 5-8; Fragmentgrößen: 3322, 1245 und 334 bp). (1,5) Bid-1 *pSilencer* (2,6) Bid-2 *pSilencer* (3,7) Bid-3 *pSilencer* (4,8) Spike-1 *pSilencer* (M) 100 bp-Leiter von Promega.

1.2 Selektion und *Screening* stabiler Bid kd- und Kontrollzelllinien

Die drei Bid *pSilencer*-Konstrukte wurden einzeln oder in Kombination in HeLa D98-Zellen transfiziert und Klone mit stabil integriertem Plasmid wurden durch Hygromycin B-Selektion angereichert. Um unspezifische Effekte durch den *pSilencer*-Vektor, die Transfektion oder die Selektion ausschließen zu können, wurden Kontrollklone generiert. Dazu wurden HeLa-Zellen stabil mit einem *pSilencer*-Kontrollvektor transfiziert, der im *pSilencer hygro siRNA Expression Vector Kit* (Ambion) enthalten ist. Dieses Plasmid kodiert für eine shRNA, die keine Homologien zu bekannten humanen oder murinen Sequenzen aufweist. Die Bidexpression der resultierenden Bid *knock down* (Bid kd)- und Kontrollklone (Con) wurde durch Western Blot Analysen überprüft. Im Gegensatz zu den Kontrollklonen zeigten mehrere Bid kd-Klone eine deutlich reduzierte Bidproteinexpression.

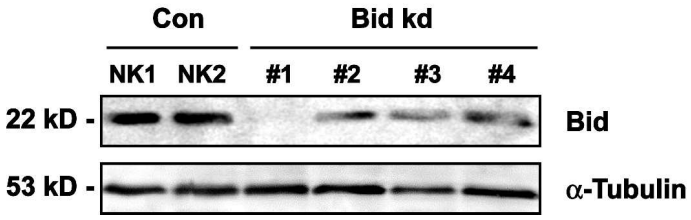

Abbildung 12: Reduzierte Bidexpression durch spezifische shRNAs.
HeLa-Zellen wurden stabil mit *pSilencer*-Plasmiden transfiziert, die entweder eine Bid-spezifische (Bid kd) oder eine Kontroll (Con)-shRNA exprimieren. Um die Effzienz der *Down*-Regulation auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Gesamtzellextrakte verschiedener Klone im Western Blot aufgetrennt und mit anti-Bid-Antikörpern inkubiert. Der Nachweis von α-Tubulin diente als Ladekontrolle.

1.3 Die Todesrezeptor-vermittelte Caspaseaktivierung korreliert mit der Höhe der residualen Bidexpression

Der klassische, Bid-abhängige Apoptoseweg wird über die Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie TNF-R1, Fas, DR4 sowie DR5 induziert. Nach der Bindung ihrer Liganden TNF-α, FasL bzw. TRAIL oder durch Rezeptor-spezifische, aktivierende Antikörper werden Adapter- und regulatorische Proteine sowie die Initiatorcaspasen-8 und -10 an den Rezeptor rekrutiert. In diesem *death inducing signalling complex* erfolgt die Aktivierung der Procaspasen-8 und -10 (siehe S. 7) (Khosravi-Far, 2004).

In den meisten Zelltypen, wie auch in den hier verwendeten HeLa-Zellen, wird nicht genügend aktive Caspase-8 oder -10 gebildet, um die Effektorcaspasen direkt zu aktivieren. Deshalb ist eine Amplifizierung des Signals über die Mitochondrien notwendig, wobei das durch Caspase-8- oder -10-Spaltung entstehende tBid das Bindeglied zwischen dem Rezeptor-vermittelten und dem mitochondrialen Apoptoseweg darstellt (Scaffidi et al., 1998).

Um zu überprüfen, ob sich die verminderte Bidexpression funktionell auswirkt, wurde die Apoptosesensitivität der Bid-profizienten und -depletierten Klone nach Todesrezeptor-Aktivierung untersucht. Die Stimulation der Todesrezeptoren induziert neben der apoptotischen auch eine protektive Signalkaskade, die hauptsächlich durch *mitogen activated protein kinases* (MAPK), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und *nuclear factor-κB* (NF-κB) vermittelt wird und die Transkription antiapoptotischer Gene bewirkt (Barnhart et al., 2004; Falschlehner et al., 2007). Um die Translation anitapoptotischer Genprodukte zu unterbinden, wurde zusätzlich der Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid (CHX) verwendet. Bid kd- und Kontrollklone wurden in Gegenwart von CHX (1 µg/ml) mit zwei verschiedenen Dosen eines agonistischen Fas-Antikörpers (Klon CH11, 5 h) bzw. TNF-α (5 h) inkubiert. Anschließend wurde die Caspaseaktivität der Zellextrakte mit einem fluorimetrischen Assay bestimmt. Das verwendete Substrat Ac-DEVD-AMC wird bevorzugt von den Effektorcaspasen-3 und -7 gespalten (Thornberry et al., 1997). Bei den Bid kd-Klonen war

eine signifikante Reduzierung der Caspaseaktivität nach einer Behandlung mit beiden Todesrezeptor-Liganden im Vergleich zu der Bid-profizienten Kontrolle festzustellen. Dabei wies der Klon (#1) mit der geringsten Bidexpression auch die geringste Caspaseaktivität auf, so dass dieser Klon für die weiteren Experimente ausgewählt wurde. Nachfolgend wird dieser Klon als Bid kd bezeichnet.

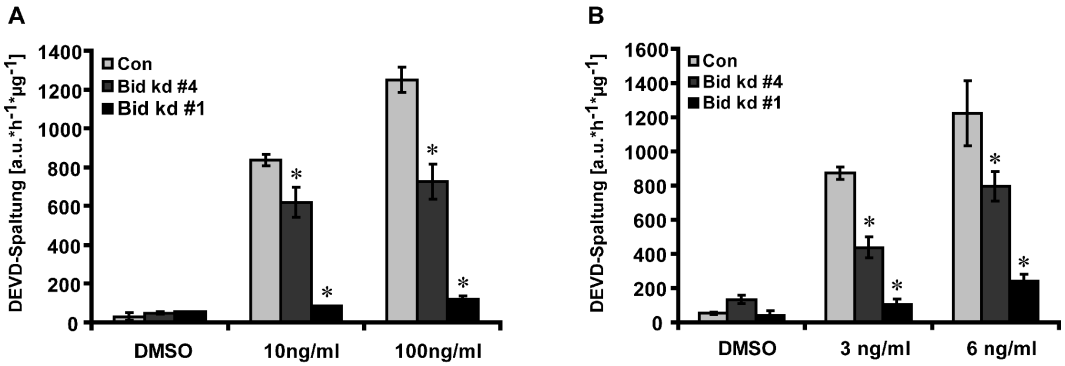

Abbildung 13: shRNA-induzierte Verminderung der Bidexpression reduziert die Todesrezeptor-vermittelte Caspaseaktivierung in HeLa-Zellen.
Bid-profiziente Kontroll-shRNA-exprimierende Zellen (Con) und zwei Bid-shRNA exprimierende Klone (Bid kd #1 und #4) wurden 5 h mit CHX (1 µg/ml) und anti-Fas-Antikörper (Klon CH11, A) oder CHX/TNF-α (B) in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Kontrollansätze erhielten nur Lösungsmittel (DMSO). Die Caspase-3-ähnliche Aktivität der Gesamtzellextrakte wurde in einem fluorimetrischen Assay durch Spaltung des Tetrapeptids Ac-DEVD-AMC bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte ± SD aus n = 3 unabhängigen Experimenten. * markiert signifikante Unterschiede zwischen Bid kd- und Kontrollzellen ($p<0.05$).

1.4 Keine Unterschiede zwischen Bid kd- und Kontrollzellen in der Expression Apoptose-regulatorischer Proteine

Um zu verifizieren, ob die Resistenz des Bid kd-Klons ausschließlich auf die reduzierte Bidexpression zurückzuführen ist, wurde die Expression anderer Apoptose-relevanter Proteine überprüft. Dazu wurden Gesamtzellextrakte logarithmisch wachsender Bid kd- und Kontrollzellen im Western Blot auf die Expression verschiedener Mitglieder der Bcl-2-Familie und anderer Proteine des intrinsischen Apoptoseweges untersucht. Im Bid kd-Klon konnte für keines der untersuchten Proteine eine von den Kontrollzellen abweichende Expression festgestellt werden, so dass die Unterschiede zwischen beiden Klonen auf die Depletion von Bid zurückgeführt werden können.

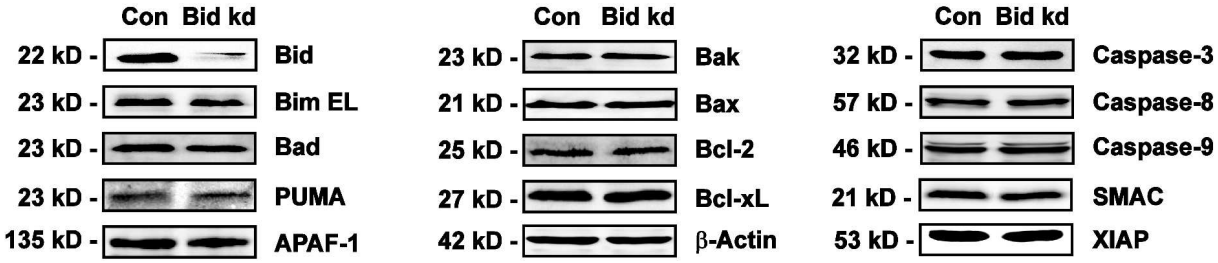

Abbildung 14: Die Bid-spezifische shRNA verändert die Expression anderer Apoptoseregulatoren nicht. Gesamtzellextrakte der Bid kd- und Kontrollzellen wurden im Western Blot auf die Expression verschiedener Caspasen, Mitglieder der Bcl-2-Familie und des intrinsischen Apoptoseweges untersucht. Die Rehybridisierung des Blots mit anti-β-Aktin-Antikörper diente als Ladekontrolle.

2 Der *knock down* von Bid verringert die Caspaseaktivität und die Zelltodrate nach Todesrezeptor-Stimulation

Um den Effekt der reduzierten Bidexpression auf die Todesrezeptor-induzierte Apoptose genauer zu untersuchen, wurden die Bid kd- und Kontrollzellen mit anti-Fas-Antikörper/CHX oder TRAIL/CHX stimuliert und die Anzahl Annexin V-positiver Zellen durch eine FACS-Analyse quantifiziert. In der Bid-profizienten Kontrolle nahmen die Phosphatidylserin-positiven Zellen mit steigender TRAIL- bzw. anti-Fas-Antikörperdosis zu. Dabei wiesen bei der höchsten Konzentration (TRAIL: 50 ng/ml; anti-Fas: 100 ng/ml) fast 50% der Zellen apoptotische Merkmale auf. Im Gegensatz dazu zeigten die Bid kd-Zellen nur nach TRAIL-Behandlung eine Dosis-abhängige Zunahme Annexin V-positiver Zellen, die aber bei höheren Konzentrationen signifikant geringer als im Kontrollklon ausfiel. Inkubation mit dem anti-Fas-Antikörper induzierte bei 15% der Bid kd-Zellen Apoptose, wobei diese Zahl auch bei Erhöhung der Dosis nicht gesteigert werden konnte.

Dass es sich um einen Caspase-vermittelten Prozess handelt, belegen die Daten mit dem Pancaspase-Inhibitor zVAD-fmk (Garcia-Calvo et al., 1998), der in beiden Zelllinien das Auftreten Annexin V-positiver Zellen verhindern konnte. Diese Experimente bestätigen die Funktionalität des Bid kds, der eine signifikante Protektion vor der Todesrezeptor-induzierten Apoptose verleiht.

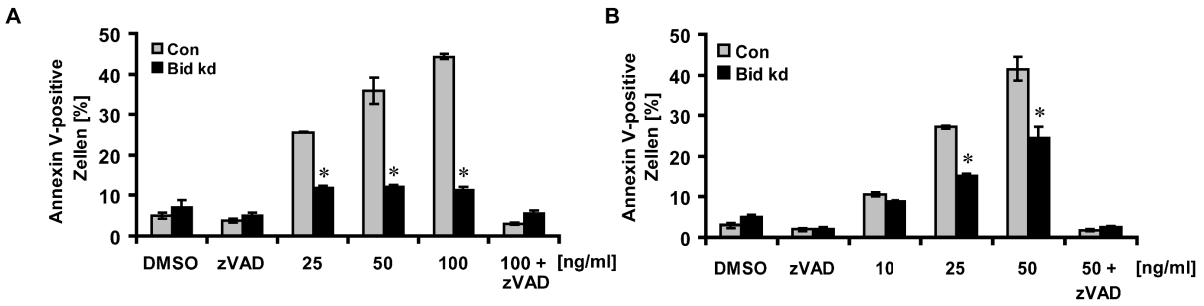

Abbildung 15: Verminderte Bidexpression schützt HeLa-Zellen vor Todesrezeptor-vermitteltem Zelltod.
Kontroll- und Bid kd-Zellen wurden mit CHX (1 µg/ml) und steigenden Dosen eines aktivierenden Fas-Antikörpers (A, Klon CH11, 6 h) oder TRAIL (B, 4 h) mit oder ohne Zugabe des Caspaseinhibitors zVAD-fmk (100 µM) inkubiert. Kontrollansätze enthielten nur zVAD-fmk oder Lösungsmittel (DMSO). Annexin V-positive Zellen wurden durch FACS-Analyse quantifiziert. Jeweils 10 000 Zellen wurden ausgewertet. Die Daten sind Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Experimenten. * markiert signifikante Unterschiede zwischen Con- und Bid kd-Zellen ($p<0.05$).

Um die Caspaseaktivität genauer zu untersuchen, wurden anti-Fas- bzw. TRAIL-behandelte Zelllysate in einem *in vitro* Enzym-Assay mit dem Caspasesubstrat Ac-DEVD-AMC vermessen und die Aktivierung der Effektorcaspase-3 im Western Blot überprüft.

Der Caspase-Assay zeigte eine deutlich geringere Aktivität DEVD-spaltender Caspasen in den Bid kd-Zellen. Dabei war die Protektion durch die verminderte Bidexpression, wie auch die FACS-Analyse gezeigt hatte, nach Fas-Aktivierung größer als nach TRAIL-Behandlung. Dies wurde durch die Western Blot Ergebnisse bestätigt.

Aktive Caspasen entstehen durch limitierte Proteolyse aus ihrer Proform. Im Falle der wichtigsten Effektorcaspase, Caspase-3, wird zunächst die kleine Untereinheit (p12) abgetrennt, bevor von der großen Untereinheit (p20) die Prodomäne abgespalten wird. Die Prozessierung der großen Untereinheit erfolgt autokatalytisch und führt über ein intermediäres p19-Fragment zur ausgereiften Form (p17) (siehe S. 5) (Fernandes-Alnemri et al., 1996).

Im Western Blot war nach zweistündiger anti-Fas/CHX-Inkubation in beiden Zelllinien das p20-Spaltfragment der großen Untereinheit von Caspase-3 nachweisbar. Doch während in den Kontrollzellen Procaspase-3 sukzessive abnahm und nach 8 h vollständig in die aktiven Fragmente p17 und p19 gespalten worden war, erfolgte die Prozessierung der Proform in den Bid kd-Zellen deutlich langsamer und die autokatalytische Spaltung des p20-Fragments unterblieb ganz.

Die signifikant verminderte Effektorcaspase-Aktivität in den Bid kd-Zellen wurde auch durch den anti-Poly- (ADP Ribose) Polymerase (PARP) Western Blot bestätigt, da das Caspase-spezifische 85-kD Spaltfragment nur in den Bid-profizienten Zellen nachweisbar war (Slee et al., 2001).

In den TRAIL-behandelten Zellen begann die Caspase-3-Prozessierung bereits nach 1 h und nach zwei weiteren Stunden waren in den Kontrollzellen nur noch die p17- und p19-Fragmente zu detektieren. Wieder lief die Spaltung der Procaspase-3 und des p20-Fragments in den Bid kd-Zellen verzögert ab, doch wurde die Caspase-3-Aktivierung durch den Bid kd nach TRAIL-Behandlung weniger signifikant inhibiert als nach Fas. Dies bestätigte auch der anti-PARP Western Blot.

Diese Daten zeigen, dass die Todesrezeptor-induzierte Prozessierung der großen Untereinheit von Caspase-3 in Bid kd-Zellen verzögert bzw. inhibiert wird und dass dies mit verminderter Effektorcaspase-Aktivität einhergeht.

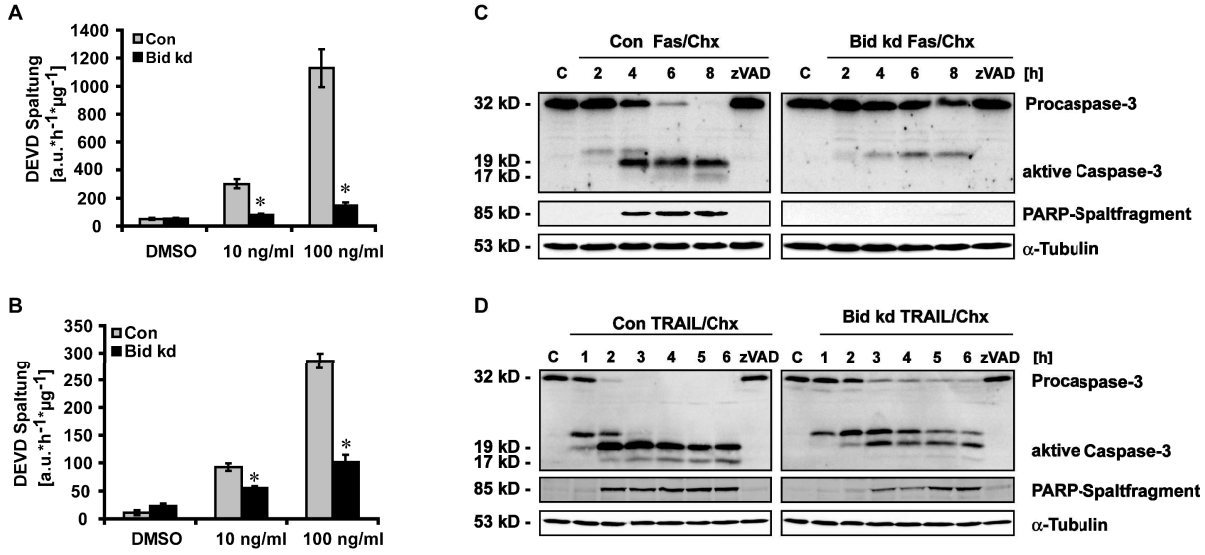

Abbildung 16: Der Bid kd reduziert die Caspaseaktivität nach Todesrezeptor-Stimulation.
(A+B) DEVDase-Aktivität. Bid kd- und Kontrollzellen wurden mit Lösungsmittel (DMSO) oder mit CHX (1 µg/ml) und den angegebenen Konzentrationen des Fas-Antikörpers (A, 4 h) oder TRAIL (B, 3 h) behandelt. Die Caspase-3-ähnliche Aktivität der Zelllysate wurde durch Spaltung des fluoreszierenden Substrats Ac-DEVD-AMC gemessen. Die Mittelwerte ± SD stammen aus drei separaten Experimenten. * markiert signifikante Unterschiede zwischen Con- und Bid kd-Zellen ($p<0.05$). **(C+D) Kinetik der Caspase-3- und PARP-Spaltung in Bid kd- und Kontrollzellen nach Todesrezeptor-Aktivierung.** Gesamtzellextrakte CHX (1 µg/ml)- und anti-Fas-Antikörper- (C, 100 ng/ml) oder TRAIL (D, 50 ng/ml)-behandelter Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten hergestellt. Kontrollansätze enthielten nur Lösungsmittel (C) oder CH11 bzw. TRAIL mit dem Caspaseinhibitor zVAD-fmk (100 µM). Die Caspase-3-Prozessierung und das Caspase-spezifische PARP-Spaltprodukt wurden im Western Blot nachgewiesen. Der Caspase-3-Antikörper erkennt neben der inaktiven Proform (32 kD) auch die aktiven Fragmente der großen Untereinheit (19 kD und 17 kD). Die Rehybridisierung des Blots mit α-Tubulin-Antikörper diente als Ladekontrolle.

2.1 Die Apoptoseresistenz Bid-depletierter Zellen korreliert mit einer höheren Proliferations- und Überlebensrate nach Todesrezeptor-Stimulation

Im Gegensatz zu den bisher durchgeführten FACS- oder DEVD-Assays, die die Caspaseaktivität oder die Apoptoserate einige Stunden oder maximal ein bis zwei Tage nach Stimuluszugabe messen, bestimmen Koloniebildungsassays, ob Zellen trotz der Behandlung

mit einem Apoptose induzierenden Agens noch proliferationsfähig sind. Um zu überprüfen, ob die geringe Caspaseaktivität nach Todesrezeptor-Stimulation das Überleben der Bid kd-Zellen beeinflusst, wurden Bid-profiziente und -depletierte HeLa-Zellen mit TRAIL/CHX (2 h) oder anti-Fas-Antikörper/CHX (3 h) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in geringer Dichte in neue Kulturschalen überführt und die nach zweiwöchiger Inkubation herangewachsenen Klone mit Methylenblau gefärbt und quantifiziert. Erneut war der Bid kd nach Fas- protektiver als nach TRAIL-Stimulation. Bei der höchsten Dosis (50 ng/ml) betrug die Proliferationsrate der Bid kd-Zellen 61% (anti-Fas-Antikörper) im Vergleich zu 22% nach TRAIL-Behandlung. Die Daten des Koloniebildungsassays zeigen, dass die verminderte Bidexpression nicht nur in Kurzzeitexperimenten den Zelltod verzögert, sondern auch einen längerfristigen Überlebensvorteil bietet.

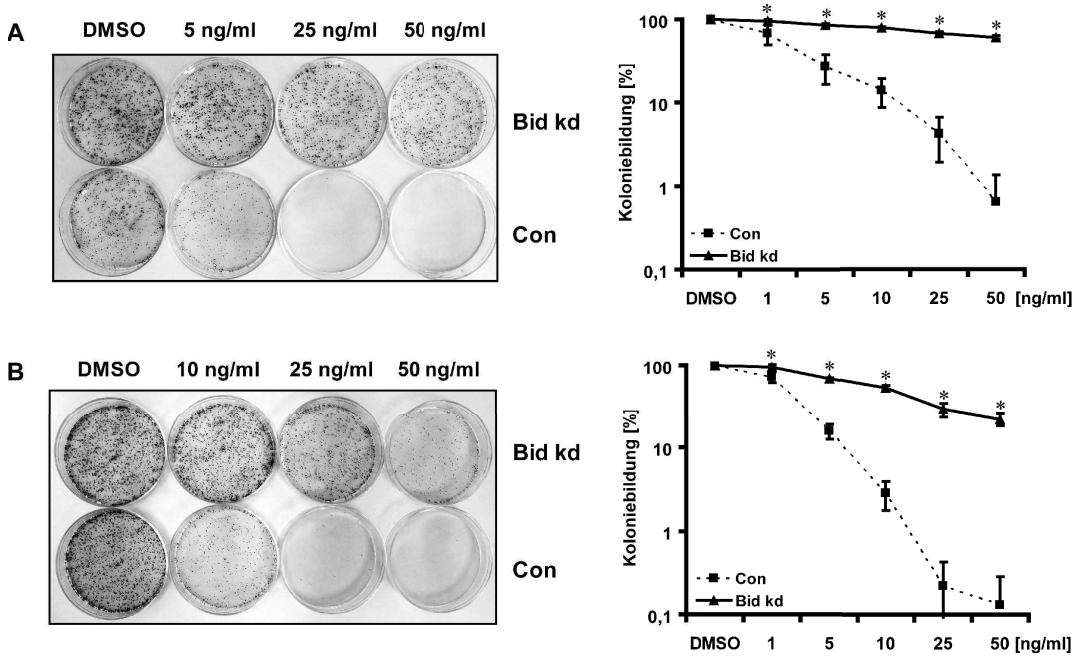

Abbildung 17: Reduzierung der Bidexpression fördert Proliferation und Koloniebildung nach Todesrezeptor-Aktivierung.
(A+B) Nachdem Kontroll- und Bid kd-Zellen mit CHX (1 µg/ml) und den angegebenen Konzentrationen des aktivierenden Fas-Antikörpers (A, 3 h) oder TRAIL (B, 2 h) inkubiert worden waren, wurden 1000 Zellen jedes Ansatzes in 60 mm-Schalen überführt und weitere 14 Tage kultiviert. Die herangewachsenen Kolonien wurden fixiert, Methylenblau-gefärbt und gezählt. Schalen eines repräsentativen Experiments sind abgebildet. Gezeigte Mittelwerte ± SD stammen aus zwei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 3). * markiert signifikante Unterschiede zwischen Con- und Bid kd-Zellen ($p<0.05$).

2.2 Die Überexpression von Bid resensitiviert Bid-depletierte Zellen für die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose

Der folgende Versuch sollte klären, ob die beobachtete Resistenz gegenüber dem Rezeptor-vermittelten Zelltod durch die verminderte Bidexpression hinreichend erklärt werden kann. In

diesem Fall sollten die Bid kd-Zellen durch Wiederherstellen der Bidexpression für den extrinsischen Apoptoseweg resensitiviert werden.

Dazu wurden Bid kd-Zellen stabil mit einem Plasmid (pFRET-Bid) transfiziert, das für ein Bid-Fusionsprotein kodiert, in dem *full-length* Bid (FL-Bid) am N-Terminus von YFP und C-terminal von CFP flankiert wird (Onuki et al., 2002). Dieses Fusionsprotein wird wie das endogene Bid nach Todesrezeptor-Aktivierung gespalten, transloziert zu den Mitochondrien und induziert dort die Freisetzung Caspase-aktivierender Faktoren (Onuki et al., 2002; Ward et al., 2006).

Der Western Blot in Abb. 18 zeigt sowohl die parentalen HeLa- und HeLa Bid kd-Zellen als auch die daraus generierten Bid-FRET-exprimierenden Klone. Trotz der Überexpression des pFRET-Bid-Konstrukts bleibt das endogene Bid in den Bid kd-Bid-FRET-Klonen reduziert. Auch die mRNA des Fusionsproteins wird anscheinend durch RNAi-vermittelte Prozesse teilweise degradiert, da die Überexpression im Vergleich zu dem HeLa-Bid-FRET-Klon geringer ausfällt. Dennoch wird eine signifikante Erhöhung der Bidexpression erreicht.

Zwei der Bid kd-Bid-FRET-Klone wurden ebenso wie die Kontroll- und die Bid kd-Zellen mit anti-Fas-Antikörper bzw. TRAIL stimuliert und in einem DEVD-Assay vermessen. Die Caspaseaktivität der Bid-FRET-Klone erreichte nach beiden Todesrezeptor-Stimuli wieder das Niveau der Bid-profizienten Zellen. Diese Resensitiverung belegt, dass die in den vorigen Abschnitten gezeigte Protektion vor Todesrezeptor-induzierter Apoptose auf den Bid kd zurückzuführen ist und bestätigt die Spezifität der Bid siRNA und die Funktionalität des Bid kds.

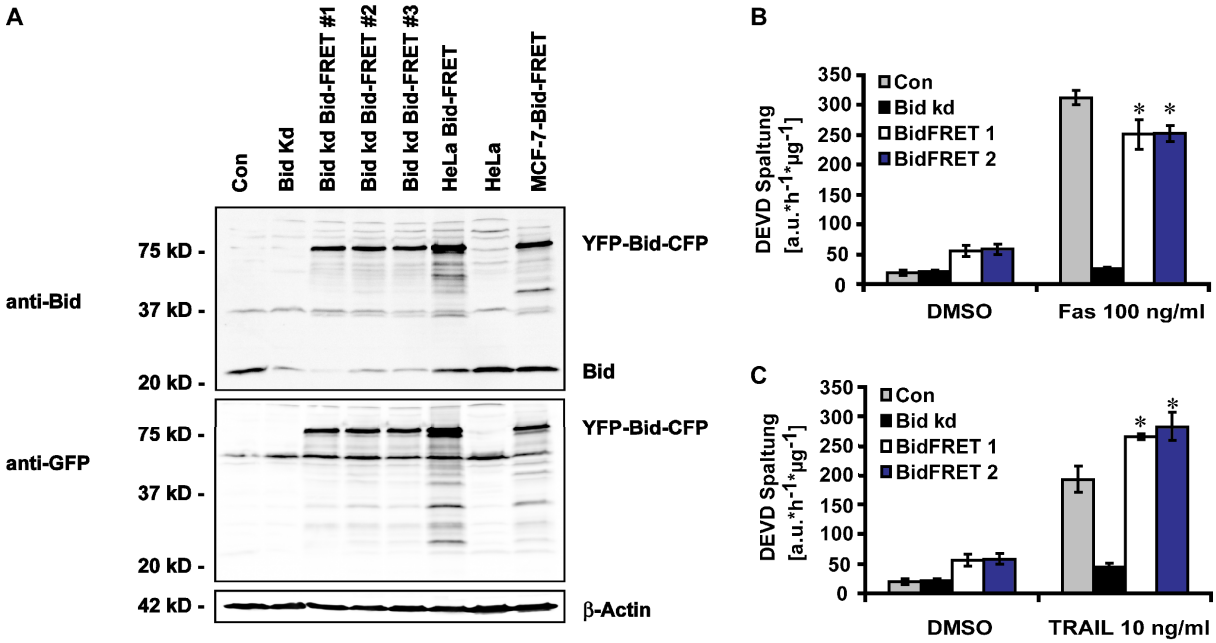

Abbildung 18: Bid-FRET-Überexpression resensitiviert Bid kd-Zellen für die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose.
(A) Nachweis der Bid-FRET-Expression im Western Blot. Bid-profiziente- und Bid kd-HeLa-Zellen wurden mit dem Plasmid pFRET-Bid stabil transfiziert. Die parentalen Zelllinien sowie die generierten Klone wurden auf die Expression des endogenen Bids und des YFP-Bid-CFP-Fusionsproteins mit Bid- bzw. GFP-spezifischen Antikörpern überprüft. Der Nachweis von β-Actin diente als Ladekontrolle. **(B+C) DEVDase-Aktivität der Bid kd-Bid-FRET-Klone.** Con-, Bid kd- oder Bid kd-Bid-FRET-Zellen wurden mit CHX (1 µg/ml) und den angegebenen Konzentrationen eines aktivierenden Fas-Antikörpers (B) oder TRAIL (C) 4 h inkubiert. Anschließend wurde die Caspase-3-ähnliche Aktivität der Zellextrakte durch Spaltung des fluoreszierenden Substrats Ac-DEVD-AMC bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte ± SD aus drei separaten Experimenten. * markiert signifikante Unterschiede zwischen behandelten Bid kd - und Bid-FRET-transfizierten Zellen ($p<0.05$).

3 Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin

Zahlreiche Studien widmen sich dem Beitrag, den Bid durch die Verbindung des extrinsischen mit dem intrinsischen Apoptosewegs für die Caspaseaktivierung nach Todesrezeptor-Stimulation leistet. Die Bedeutung von Bid für die Weiterleitung intrinsischer Apoptosesignale dagegen ist weniger gut charakterisiert. Bei Staurosporin, einem unspezifischen Kinaseinhibitor, handelt es sich um einen klassischen intrinsischen Stimulus, der aufgrund seines Wirkmechanismus schnell und effizient Apoptose auslöst und deshalb oft experimentell zur Zelltodinduktion eingesetzt wird. Untersuchungen in HeLa-Zellen konnten eine durch STS ausgelöste Translokation von FL-Bid zu den Mitochondrien zeigen (Desagher et al., 1999; Tafani et al., 2002; Tafani et al., 2001), doch ein funktioneller Nachweis, ob Bid für die STS-induzierte Apoptose in Zervixkarzinomzellen notwendig ist, steht noch aus.
Um zu untersuchen, ob die Effektorcaspase-Aktivierung in HeLa-Zellen nach STS-Exposition Bid-abhängig erfolgt, wurden die Bid kd- und Kontrollzellen zunächst mit zwei

verschiedenen Konzentrationen STS 4 h inkubiert und die DEVDase-Aktivität fluorimetrisch vermessen. Unabhängig vom Bidstatus ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Zelllinien. Auch in der anschließend durchgeführten Western Blot Analyse war die Kinetik der Caspase-3-Spaltung vergleichbar; nach vierstündiger STS-Exposition (1 µM) waren in beiden Zelllinien die aktiven Fragmente p17 und p19 nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt konnte auch das Caspase-spezifische PARP-Spaltprodukt detektiert werden, dessen Auftreten durch den Caspaseinhibitor zVAD-fmk unterdrückt wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Zellen durch den Bid kd keine generelle Apoptoseresistenz erworben haben und dass Bid für die Effektorcaspase-Aktivierung nach STS-Stimulation in HeLa-Zellen nicht notwendig ist.

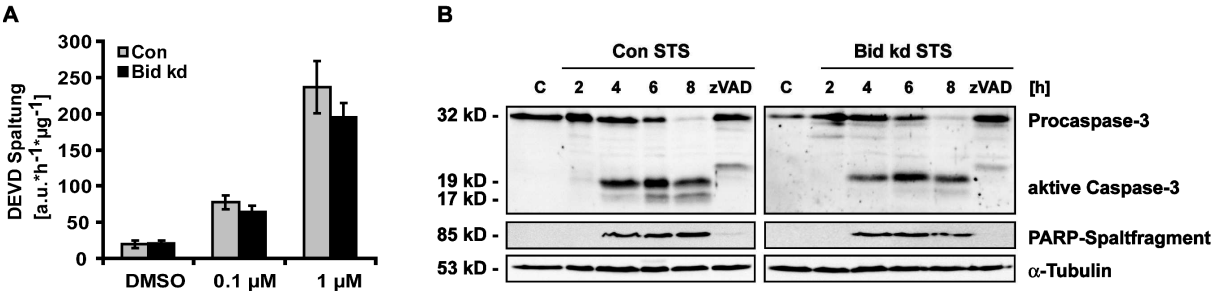

Abbildung 19: Die STS-induzierte Caspaseaktivierung in HeLa-Zellen erfolgt Bid-unabhängig.
(A) Der Bid kd beeinflusst die DEVDase-Aktivität nach STS-Exposition nicht. Kontroll- und Bid kd-Zellen wurden 5 h mit Lösungsmittel (DMSO) oder den angegebenen Konzentrationen des Proteinkinase-Inhibitors behandelt. Die Aktivität Caspase-3-ähnlicher Caspasen wurde mittels Spaltung des fluoreszierenden Substrats Ac-DEVD-AMC bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Experimenten (n = 3). Die Unterschiede zwischen behandelten Bid kd- und Kontrollzellen sind nicht signifikant. **(B) Die STS-induzierte Caspase-3- und PARP-Prozessierung wird durch den Bid kd nicht verzögert.** DMSO-, STS (1 µM)- oder STS- und zVAD (100 µM)-behandelte Kontroll- und Bid kd-Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten lysiert. Procaspase-3 und die aktiven Fragmente der großen Untereinheit p17 und p19 sowie das Caspase-spezifische PARP-Spaltprodukt wurden im Western Blot nachgewiesen. Die Detektion von α-Tubulin diente als interne Kontrolle. Das Experiment wurde mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

4 Proteasominhibition

Das proteasomale System stellt einen der wichtigsten Degradierungswege für intrazelluläre Proteine dar und kontrolliert die Stabilität vieler regulatorischer Proteine. Dadurch beeinflusst es bedeutende zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose, die in Krebszellen dereguliert sind, so dass die Inhibierung des Proteasoms eine attraktive Möglichkeit darstellt, um Tumorzellen für den programmierten Zelltod zu resensitivieren (siehe S. 27). Obwohl der erste Proteasominhibitor (PI), Bortezomib, sich seit mehreren Jahren im klinischen Einsatz befindet (Richardson and Anderson, 2003), sind die Mechanismen der Apoptoseinduktion und die Unterschiede zwischen verschiedenen PI-Klassen auf molekularer Ebene noch nicht genau charaktierisiert. Mehrfach gezeigt wurde

aber, dass PI die Expression vieler DISC-Komponenten (Todesrezeptoren und ihren Liganden sowie FADD und cFLIP) modulieren (Concannon et al., 2007; Hougardy et al., 2006; Liu et al., 2007). Da Studien außerdem eine frühe Caspase-2- (in Pankreasadenokarzinomzellen) bzw. eine frühe Caspase-8-Aktivierung (in Schilddrüsenkarzinomzellen und primären CLL) nachweisen konnten (Kabore et al., 2006; Mitsiades et al., 2006; Yeung et al., 2006), die beide als Bid-aktivierende Proteasen fungieren können, sollte der Einfluss des Bid kd auf die PI-vermittelte Caspaseaktivierung untersucht werden. Verwendet wurde Epoxomicin, das als Vertreter der Epoxyketonpeptide zur Klasse der spezifischsten PI gehört (Meng et al., 1999). Bid kd- und Kontrollzellen wurden 24 h mit 20 und 50 nM Epoxomicin inkubiert. Diese Konzentrationen führen in HeLa- und anderen Karzinomzelllinien zur Akkumulierung ubiquitinierter Proteine, zur Caspaseaktivierung und zur Apoptose (Concannon et al., 2007). Auch in den hier untersuchten Zellen wurde im DEVD-Assay eine deutliche Caspaseaktivität festgestellt, die durch den Bid kd allerdings nicht reduziert werden konnte**,** so dass Bid, zumindest in diesem Zellsystem, nicht zur Epoxomicin-vermittelten Caspaseaktivierung beiträgt.

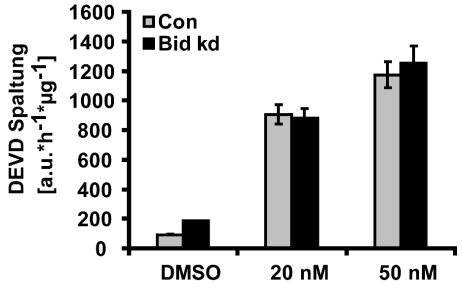

Abbildung 20: Bid beeinflusst die Epxomicin-induzierte Caspaseaktivierung nicht.
Kontroll- und Bid kd-Zellen wurden nach Zugabe von Lösungsmittel (DMSO) oder den aufgeführten Konzentrationen des Proteasominhibitors Epoxomicin 24 h kultiviert. Die Aktivität Caspase-3-ähnlicher Caspasen in den Gesamtzellextrakten wurde mittels Spaltung des fluoreszierenden Tetrapeptids Ac-DEVD-AMC bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte ± SD aus drei separaten Experimenten (n = 3). Die Unterschiede zwischen behandelten Bid kd- und Kontrollzellen sind nicht signifikant.

5 Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER)

Die meisten sekretorischen und membranständigen Proteine eukaryontischer Zellen werden im ER synthetisiert, gefaltet und modifiziert. ER Stress entsteht, wenn die Kapazität des ER nicht ausreicht, um den zellulären Bedarf zu decken, so dass ungefaltete Proteine akkumulieren und aggregieren, was zytotoxisch ist. Falls die protektive Stressantwort, welche die Proteinlast durch verminderte Translation und erhöhte Faltungskapazität reduzieren soll, den Stress nicht beseitigen kann, wird über den intrinsischen Weg Apoptose ausgelöst (Yoshida, 2007). Da eine ER Stress-induzierte Aktivierung der Bid-spaltenden Proteasen

Caspase-8 sowie der ubiquitären Calpaine nachgewiesen werden konnte (Abdelrahim et al., 2006; Harriman et al., 2002; He et al., 2002; Muruganandan and Cribb, 2006; Yamaguchi et al., 2003), sollte mit Hilfe der Bid kd-Zellen eine Beteiligung dieses BH3-only Proteins an der Apoptose nach ER Stress in HeLa-Zellen untersucht werden.

5.1 Die ER Stress induzierenden Agenzien Brefeldin A, Thapsigargin und Tunicamycin

Drei Substanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen wurden eingesetzt, um ER Stress auszulösen. Das Antibiotikum Tunicamycin inhibiert die Synthese lipidverknüpfter Oligosaccharide und verhindert deshalb die N-Glykosylierung von Proteinen (Heifetz et al., 1979; Takatsuki, 1971). Da die meisten im ER synthetisierten Proteine N-glykosyliert werden und nur korrekt modifizierte und gefaltete Proteine die Qualitätskontrolle passieren und das ER verlassen dürfen, stauen sich hypoglykosylierte Proteine im ER an. Die zweite Substanz, Thapsigargin, reduziert die Ca^{2+}-Ionenkonzentration des ER, indem es die sarcoplasmatische/endoplasmatische Ca^{2+}-ATPase (SERCA) inhibiert, die für den Rücktransport von Ca^{2+} aus dem Zytosol ins ER verantwortlich ist (Lytton et al., 1991; Thastrup et al., 1990). Da viele ER Chaperone wie *binding protein* (BiP)/*glucose-regulated protein* (Grp) 78, Grp94 oder Calnexin Ca^{2+}-abhängig sind, vermindert sich die Faltungskapazität und unreife Proteine akkumulieren. Brefeldin A (BFA) dagegen inhibiert die kleine GTPase Arf1 und dadurch die Bildung und Freisetzung von Membranvesikeln (Fujiwara et al., 1988; Misumi et al., 1986). In der Folge kommt der Proteintransport zum Erliegen, der Golgi Apparat wird aufgelöst und Proteine können nicht mehr aus dem ER abtransportiert werden.

5.2 Keine Unterschiede in der Expression der ER Stress Marker BiP/Grp78 und Grp94 zwischen Bid kd- und Kontrollzellen nach Tunicamycin-Behandlung

Um festzustellen, ob Tunicamycin in den Bid kd- und Kontrollzellen gleichermaßen ER Stress auslöst, wurde die Expression der ER-lokalisierten Faltungshelfer BiP/Grp78 und Grp94 im Western Blot untersucht. Beide Chaperone werden bei ER Stress transkriptionell induziert und sind etablierte Indikatoren für ER Stress. Bereits 8 h nach Beginn der Tunicamycin-Behandlung war BiP/Grp78 in beiden Zelllinien induziert, während eine erhöhte Grp94-Proteinexpression nach 16 h nachweisbar war und mit zunehmender Behandlungsdauer kontinuierlich anstieg. Dies lässt darauf schließen, dass weder die Bid-

noch die Kontroll-shRNA die Expression der Chaperone beeinflusst und der protektive Teil der ER Stressantwort in beiden Zelllinien in gleichem Maße induziert wird.

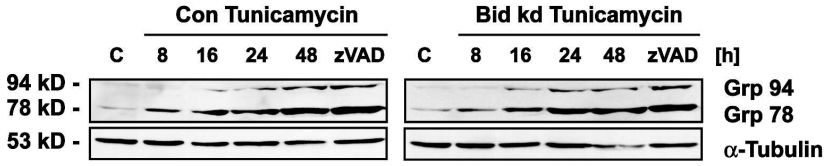

Abbildung 21: Tunicamycin induziert die ER Stress Marker BiP/Grp78 und Grp94.
Bid kd- und Kontrollzellen wurden für die angegebenen Zeiten mit Tunicamycin (3 µM) behandelt. Kontrollansätze enthielten Lösungsmittel (DMSO; C) oder Tunicamycin mit dem Caspaseinhibitor zVAD-fmk (100 µM). Die Gesamtproteinextrakte der Kulturen wurden im Western Blot aufgetrennt und die Expression der ER Chaperone BiP/Grp78 und Grp94 mit einem anti-KDEL Antikörper detektiert. Der α-Tubulin-Nachweis diente als Ladekontrolle.

5.3 Die ER Stress-induzierte Caspaseaktivierung und Apoptose erfolgt Bid-unabhängig

Obwohl eine Steigerung der Faltungskapazität einen protektiven Effekt ausübt, werden bei anhaltendem ER Stress schließlich Caspasen aktiviert. In den Bid kd- und Kontrollzellen wurde die Effektorcaspase-Aktivität nach 24-stündiger Inkubation mit Tunicamycin (0.3 und 3 µM), Thapsigargin (1 µM) und BFA (1 µM) bestimmt. Alle untersuchten Substanzen stimulierten zwar die Aktivität DEVD-spaltender Caspasen, doch zwischen den beiden Zelllinien ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

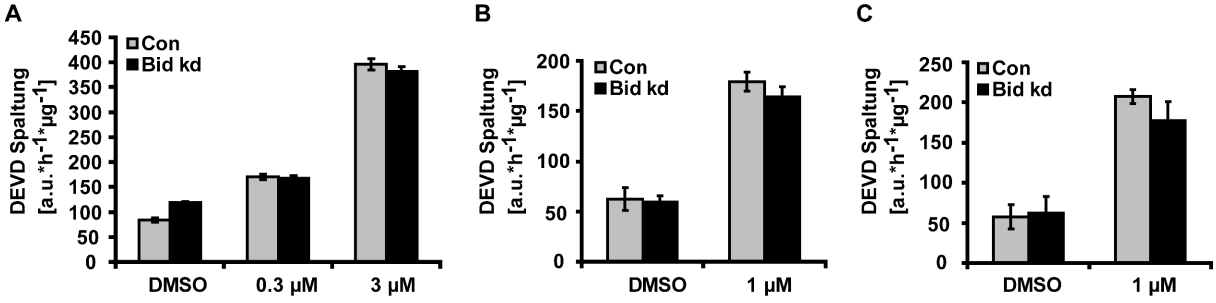

Abbildung 22: Die ER Stress-induzierte DEVDase-Aktivität in Bid kd- und Kontrollzellen ist vergleichbar hoch.
Bid kd- und Kontrollzellen wurden 24 h mit dem Lösungsmittel DMSO oder mit den angegebenen Konzentrationen der ER Stress auslösenden Substanzen Tunicamycin (A), Thapsigargin (B) oder BFA (C) inkubiert. Die Caspase-3-ähnliche Aktivität der Gesamtzellextrakte wurde durch Spaltung des fluoreszierenden Substrats Ac-DEVD-AMC bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die Unterschiede zwischen behandelten Bid kd- und Kontrollzellen sind nicht signifikant.

Um die Ergebnisse der Caspaseaktivitätsassays zu bestätigen, wurde für eine der Substanzen die Kinetik der Effektorcaspase-3-Aktivierung im Western Blot überprüft und die Apoptoserate durch eine FACS-Messung bestimmt. Gesamtzellextrakte Tunicamycin-

behandelter Zellen (3 µM, 16-48 h) wurden im Western Blot auf Caspase-3-Spaltung getestet. Unabhängig vom Bidstatus der Zelle begann die Prozessierung der Procaspase-3 nach 24 h und ab diesem Zeitpunkt war auch das Caspase-3/-7-spezifische PARP-Spaltprodukt nachweisbar. Abschließend wurde der Tunicamycin-induzierte Zelltod durch Bestimmung der Annexin V/PI-positiven Zellen quantifiziert. Nach 48-stündiger Inkubation mit mehreren Dosen des N-Glykosylierungs-Inhibitors war in beiden Zelllinien konzentrationsabhänig 35-55% Zelltod nachweisbar. Auch dieses FACS-Experiment bestätigt, dass bei länger andauerndem ER Stress Caspasen aktiviert und Apoptose induziert werden, der Bid kd jedoch keine protektive Wirkung besitzt.

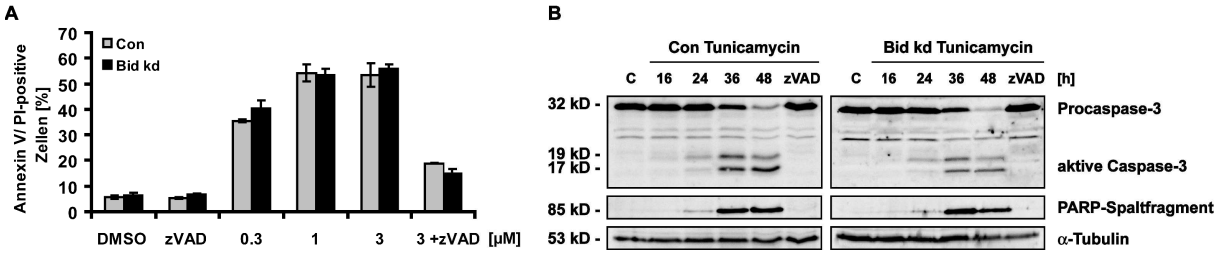

Abbildung 23: Die Tunicamycin-induzierte Apoptose in HeLa-Zellen ist Bid-unabhängig.
(A) Quantifizierung des Zelltods durch FACS-Analyse. Die Kulturen wurden mit den angegebenen Tunicamycindosen mit oder ohne zVAD-fmk (100 µM) 48 h inkubiert. Kontrollen enthielten nur zVAD-fmk oder Lösungsmittel (DMSO). Annexin V/PI-positive Zellen wurden durch FACS-Messung ermittelt. Jeweils 10 000 Zellen wurden ausgewertet. Die Daten sind Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die Unterschiede zwischen behandelten Bid kd- und Kontrollzellen sind nicht signifikant. **(B) Kinetik der Caspase-3- und PARP-Spaltung.** Bid kd- und Kontrollzellen wurden zwischen 16 h und 48 h in Anwesenheit von Tunicamycin (3 µM), dem Lösungsmittel DMSO (C; 48 h) oder Tunicamycin und dem Caspaseinhibitor zVAD-fmk (100 µM, 48 h) kultiviert. Der Nachweis des Caspase-spezifischen PARP-Spaltprodukts und der Caspase-3-Prozessierung erfolgte durch Western Blot Analyse. Der Caspase-Antikörper erkennt sowohl die inaktive Procaspase-3 (32 kD) als auch die aktiven Fragmente der großen Untereinheit (17 kD und 19 kD). Die α-Tubulin-Expression diente als Ladekontrolle.

6 Synergie Tunicamycin-TRAIL

6.1 ER Stress sensitiviert HeLa-Zellen für die TRAIL-induzierte Apoptose

TRAIL und agonistische, TRAIL-Rezeptor-spezifische Antikörper induzieren selektiv in Tumorzellen Apoptose und zeichnen sich, im Gegensatz zu anderen Todesrezeptor-Liganden wie TNF-α oder FasL, durch geringe systemische Toxizität aus (siehe S. 26) (Koschny et al., 2007). Um die Einsatzmöglichkeiten TRAIL-basierter Therapien auszuweiten und TRAIL-resistente Tumore zu sensitivieren, sind kombinierte Behandlungen des Todesrezeptor-Liganden mit anderen Chemotherapeutika sinnvoll. Zu den Substanzklassen, für die eine Verstärkung der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose in Karzinomzellen nachgewiesen werden konnte, zählen ER Stress induzierende Agenzien (Chen et al., 2007; Shiraishi et al., 2005; Wlodkowic et al., 2007).

Ob ER Stress auch HeLa-Zellen für den extrinsischen Apoptoseweg sensitiviert und ob die Depletion von Bid das Zusammenwirken beider Agenzien beeinflusst, obwohl ER Stress in Zervixkarzinomzellen Bid-unabhängig Zelltod auslöst (siehe S. 85f.), wurde im Folgenden untersucht.

Dazu wurden Bid-depletierte und Kontrollzellen zunächst 16 h mit dem N-Glykosylierungs-Inhibitor Tunicamycin (0.3 und 3 µM) inkubiert und anschließend 2.5 h mit 10 ng/ml TRAIL stimuliert. Wie der DEVD-Assay in Abb. 24 zeigt, führte keine der Substanzen allein zu einer starken Effektorcaspase-Aktivierung. In den Kontrollzellen dagegen induzierte die Kombinationsbehandlung einen dramatischen Anstieg der DEVDase-Aktivität, der in den Bid kd-Zellen deutlich geringer ausfiel. Auch eine 16-stündige Vorbehandlung mit Thapsigargin (0.1 und 1 µM), das ER Stress durch Inhibition der Ca^{2+}-ATPase auslöst, erhöhte die Sensitivität für TRAIL selektiv in Bid-profizienten Zellen.

Interessanterweise führte die Kombination aus submaximalem ER Stress gefolgt von subletalen TRAIL-Konzentrationen zu einer signifikanten Verstärkung der Caspaseaktivität, die deutlich höher als die Summe der jeweiligen Einzeleffekte ausfiel.

Bestätigt wurde dieser Synergieeffekt in den anschließenden FACS- und Western Blot-Analysen. Die sequentielle Behandlung mit Tunicamycin (0.3 µM) und TRAIL (10 ng/ml) erhöhte die Zahl Annexin V-positiver Kontrollzellen signifikant und nur in der Bid-profizienten Linie führte die Kombinationsbehandlung zu verstärkter Caspase-3-Prozessierung, Bid- und PARP-Spaltung.

Diese Daten zeigen, dass die Verstärkung der Effektorcaspase-Aktivität und Apoptoserate kein Tunicamycin-spezifischer, sondern ein generell ER Stress-vermittelter Effekt ist, bei dem bereits subtoxische Konzentrationen ausreichen, um eine Potenzierung des TRAIL-abhängigen Apoptosewegs zu induzieren.

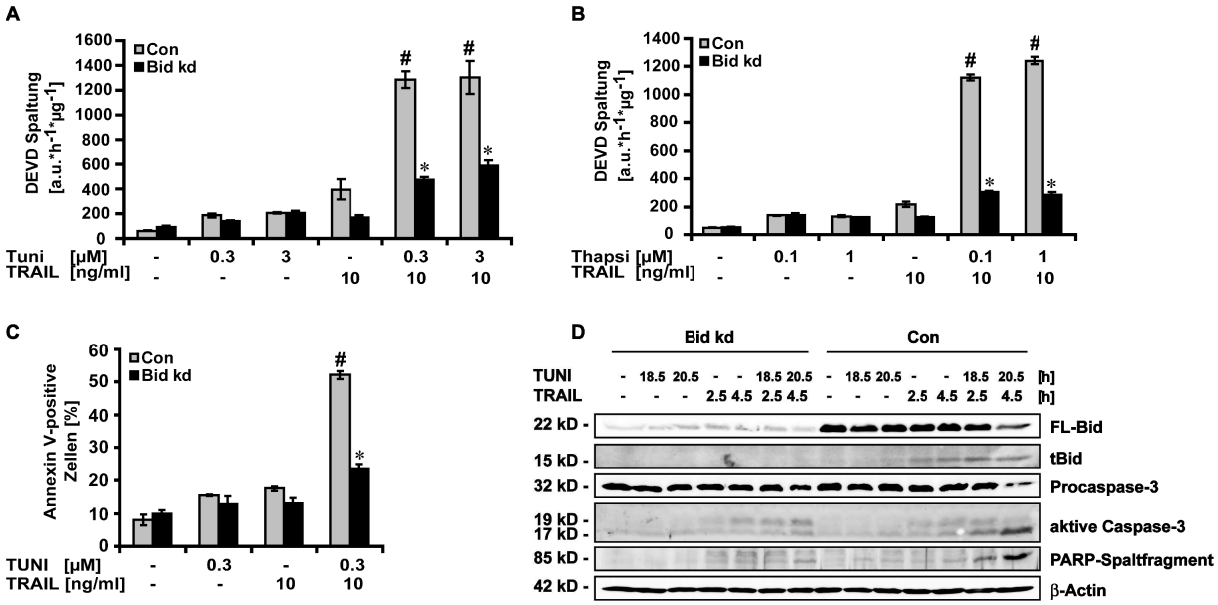

Abbildung 24: Subtoxischer ER Stress sensitiviert Bid-profiziente HeLa-Zellen für TRAIL-induzierte Apoptose.
(A+B) In Bid kd-Zellen ist die ER Stress-vermittelte Potenzierung der TRAIL-induzierten DEVDase-Aktivität unterdrückt. Nach 16-stündiger Vorbehandlung der Kontroll- und Bid kd-Zellen mit den angegebenen Tunicamycin (A, Tuni)- oder Thapsigargin (B, TH)-Konzentrationen wurden die Zellen 2.5 h mit TRAIL inkubiert. Anschließend wurde die DEVDase-Aktivität der Zellextrakte durch Spaltung des fluoreszierenden Substrats Ac-DEVD-AMC bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Experimenten. * und # bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen Bid kd- und Kontrollzellen bzw. zu Proben ohne Kombinationsbehandlung ($p<0.05$). **(C) Die Apoptoserate Tunicamycin/TRAIL-behandelter Zellen wird durch den Bid kd signifikant reduziert.** Beide Zelllinien wurden vor Beginn einer fünfstündigen TRAIL-Exposition (10 ng/ml) 16 h mit Tunicamycin (0.3 µM) oder Lösungsmittel präinkubiert. Die Quantifizierung Annexin V-positiver Zellen erfolgte durchflusszytometrisch. Es wurden jeweils 10 000 Zellen ausgewertet. Die Daten sind Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 2). Signifikanzen wie unter (A+B). **(D) Die Caspase-3- und PARP-Prozessierung ist in Bid kd-Zellen nach Tunicamycin/TRAIL-Exposition signifikant reduziert.** Bid kd- und -profiziente Zellen wurden zunächst mit Tunicamycin (0.3 µM) oder Lösungsmittel (DMSO) 16 h oder 18 h präinkubiert und die letzten 2.5 bzw. 4.5 h zusätzlich in Gegenwart von TRAIL (10 ng/ml) kultiviert. Kontrollansätze erhielten nur den ER-Stressor oder TRAIL. Die Bidspaltung sowie die Prozessierung der großen Caspase-3-Untereinheit und des Caspase-spezifischen PARP-Spaltfragments wurden im Western Blot detektiert. Der β-Aktin-Nachweis diente als interne Kontrolle. Die Wiederholung des Experiments lieferte vergleichbare Ergebnisse.

6.2 Inhibierung der ER Stress-induzierten Proteinsynthese verhindert die Synergie mit dem Todesrezeptor-Liganden TRAIL

ER Stress beeinflusst sowohl die Genexpression als auch die posttranskriptionellen Regulationsmechanismen der betroffenen Zellen (Reimertz et al., 2003; Szegezdi et al., 2006). Ob Tunicamycin-induzierte, transkriptionelle Veränderungen zur Synergie zwischen dem N-Glykosylierungs-Inhibitor und TRAIL beitragen, konnte nicht direkt geklärt werden, da der Transkriptionsinhibitor Actinomycin D auf die HeLa-Zellen stark zytotoxisch wirkte (Daten nicht gezeigt). Stattdessen wurde der Translationsinhibitor CHX verwendet, um zu untersuchen, ob neu synthetisierte Proteine für den Sensitivierungseffekt verantwortlich sind.

Im Gegensatz zu Actinomycin D war CHX in der gewählten Dosis (1 µg/ml) und Versuchsdauer nicht proapoptotisch, sein Effekt war aber abhängig vom Applikationszeitpunkt. Wurde CHX 1 h vor Beginn der Tunicamycin-Behandlung zugegeben, konnte die ER Stress-vermittelte Sensitivierung beider Zelllinien vollständig aufgehoben werden. Eine gleichzeitige Zugabe mit TRAIL 16 h nach dem Start der ER Stress-Vorbehandlung hatte dagegen keinen protektiven Effekt, so dass Tunicamycin-induzierte Veränderungen der Transkription oder der Translation die Verstärkung des Todesrezeptor-abhängigen Apoptosewegs vermitteln.

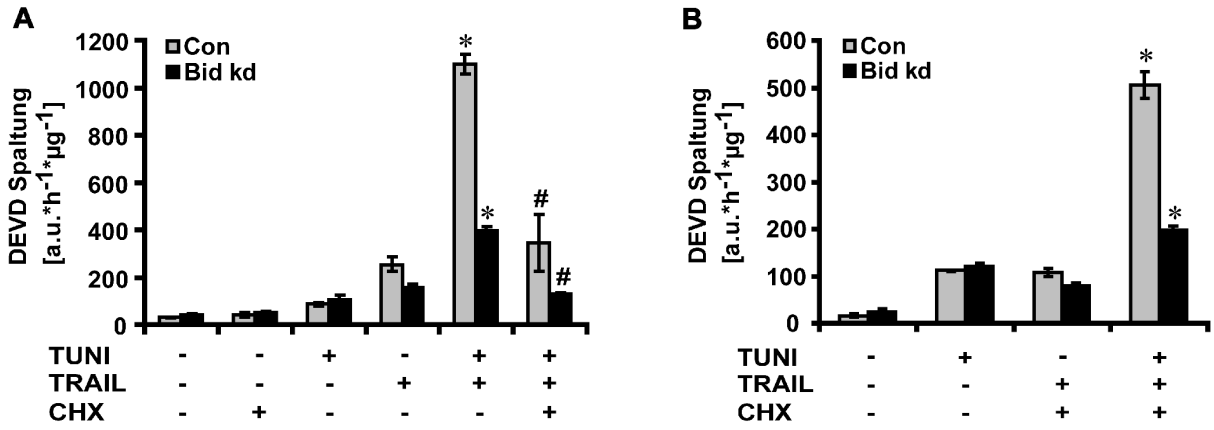

Abbildung 25: ER Stress-induzierte Proteinbiosynthese ist für den Sensitivierungseffekt essentiell.
(A) Kontroll- und Bid kd-Zellen wurden 1 h mit dem Proteinsynthese-Inhibitor CHX (1 µg/ml) oder Lösungsmittel (DMSO) inkubiert, gefolgt von einer 18.5-stündigen Tunicamycin-Behandlung (0.3 µM). Einige Kulturen wurden während der letzten 2.5 h zusätzlich mit TRAIL (10 ng/ml) behandelt. Die Caspase-3-ähnliche Aktivität der Zelllysate wurde durch Spaltung des fluoreszierenden Substrats Ac-DEVD-AMC gemessen. Die Mittelwerte ± SD stammen aus drei unabhängigen Experimenten. * bezeichnet signifikante Unterschiede zu Tunicamycin- oder TRAIL-einzelbehandelten Proben ($p<0.05$); #: signifikant zu Tunicamycin/TRAIL-Kombinationsbehandlung ($p<0.05$). (B) Beide Zelllinien wurden wie unter (A) sequentiell mit Tunicamycin und TRAIL behandelt, allerdings wurde CHX erst 16 h nach Behandlungsbeginn zusammen mit TRAIL zugegeben. Die Messung der DEVDase-Aktivität und die Markierung der Signifikanzen erfolgten wie in (A).

6.3 ER Stress induziert die DR5-Expression in HeLa-Zellen

Microarray-Experimente unserer Arbeitsgruppe in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y hatten gezeigt, dass Tunicamycin die Expression des agonistischen TRAIL-Rezeptors-2/DR5 steigert (Reimertz et al., 2003). Die folgenden Experimente sollten deshalb klären, ob ER Stress die HeLa-Zellen über eine veränderte TRAIL-Rezeptor-Expression für die Apoptose nach Todesrezeptor-Stimulation sensitiviert. Dazu wurden Bid kd- und Kontrollzellen zwischen 8 und 48 h mit Tunicamycin inkubiert und die Expression der TRAIL-Rezeptoren-1 und -2 auf mRNA- und Proteinebene bestimmt. Während sich für DR4 keine Änderung der Proteinmenge durch Tunicamycin nachweisen ließ, ergab die Western Blot Analyse in beiden

Zelllinien eine signifikante Zunahme von DR5 nach 16-24 h. Dass dies vermutlich auf eine verstärkte Transkription des DR5 Gens zurückzuführen war, zeigte die relative Quantifizierung der mRNA durch *real time* RT-PCR, mit der eine zweifache Erhöhung nach 16 h und eine weitere Zunahme nach 24 h nachgewiesen wurde. DR4 war in beiden Zelllinien auch auf Transkriptionsebene nicht reguliert. Nach Thapsigargin-Behandlung war unabhängig von der Bidexpression der Zellen ebenfalls eine Zunahme der DR5-mRNA nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass ER Stress in HeLa-Zellen selektiv die mRNA- und Proteinexpression des TRAIL-Rezeptors-2 erhöht.

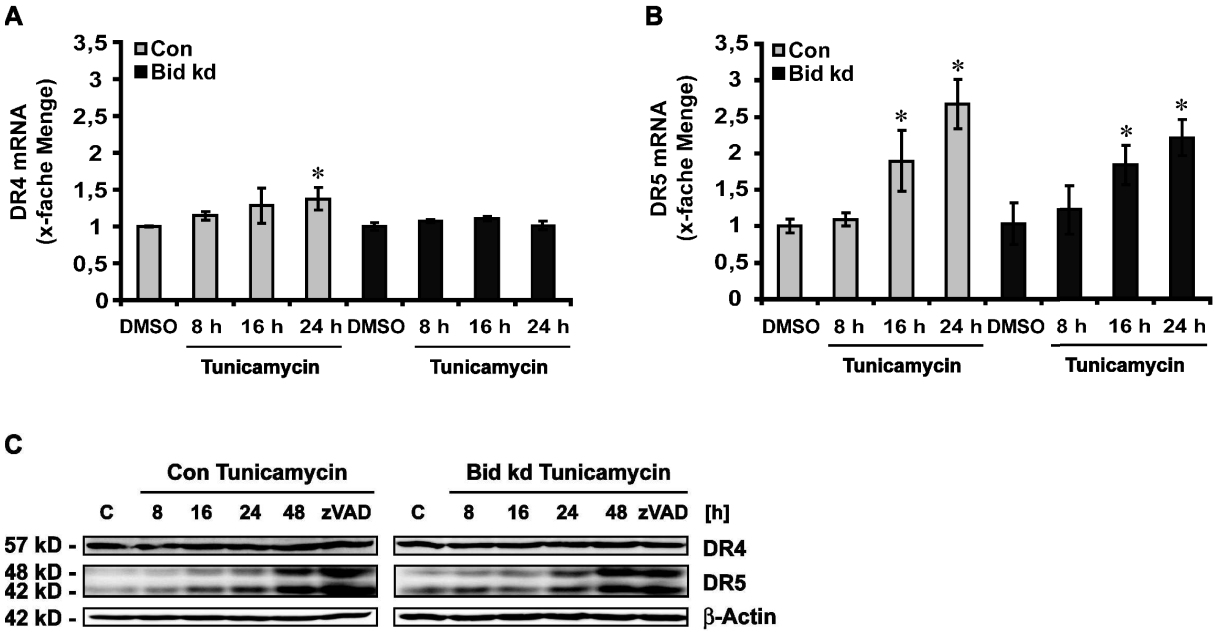

Abbildung 26: Tunicamycin steigert die DR5-Expression in HeLa-Zellen.
(A+B) Erhöhung der DR5-, aber nicht der DR4-mRNA Expression durch Tunicamycin. Kontroll- und Bid kd-Zellen wurden mit Lösungsmittel (DMSO, 24 h) oder für die angegebene Dauer mit Tunicamycin (3 µM) behandelt. Nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wurden DR4 (A)- und DR5 (B)-mRNA-Spiegel mittels *real time* PCR bestimmt und zur Normierung auf die Expression des *housekeeping*-Gens β-Actin bezogen. Die Daten sind Mittelwerte ± SD aus drei separaten Experimenten. * markiert signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle ($p<0.05$). **(C) Tunicamycin erhöht die DR5-Expression auch auf Proteinebene.** Gesamtzellextrakte beider Zelllinien, wie unter (A) behandelt, wurden im Western Blot auf die Expression von DR4 und DR5 untersucht. Der DR5-Antikörper erkennt beide differentiellen Spleißformen des Rezeptors. Die Rehybridisierung der Membranen mit β-Aktin-Antikörper diente als Ladekontrolle. Eine Wiederholung des Experiments lieferte vergleichbare Resultate.

6.4 Die DR5-abhängige Signalkaskade ist für die Synergie zwischen Tunicamycin und TRAIL essentiell

Um zu untersuchen, ob DR5 zur Sensitivierung der HeLa-Zellen nach Tunicamycin-Behandlung beiträgt, wurden die Bid kd- und Kontrollzellen entweder mit einer DR5-spezifischen oder einer Kontroll-siRNA transfiziert (Ren et al., 2004). In einem Vorversuch,

der die Spezifität der siRNAs überprüfen sollte, reduzierte nur die DR5-siRNA die Expression des TRAIL-R-2, während keines der beiden Oligonukleotide die TRAIL-R-1-/DR4-Expression beeinflusste. Die Funktionalität der siRNAs wurde durch einen DEVD-Assay bestätigt, bei dem die Caspaseaktivität TRAIL-behandelter, Bid-profizienter Zellen, die zuvor mit DR5-siRNA transfiziert worden waren, signifikant geringer als in den Kontroll-siRNA-transfizierten Proben ausfiel.

Auch bei einer sequentiellen Exposition der Zellen mit Tunicamycin und TRAIL verminderte nur die DR5-, nicht aber die Kontroll-siRNA die DEVDase-Aktivität der *pSilencer*-Kontrollzellen signifikant. In den Zellen, die aufgrund der Depletion von Bid bereits vor der kombinierten Tunicamycin- und TRAIL-induzierten Apoptose geschützt waren, konnte der DR5 kd keine zusätzliche signifikante Protektion verleihen.

Diese Daten zeigen, dass der Synergieeffekt zwischen Tunicamycin und TRAIL auf einer ER Stress-vermittelten Amplifizierung des Todesrezeptorwegs beruht, zu der die Tunicamycin-induzierte Steigerung der DR5-Expression signifikant beiträgt, so dass eine Blockade der nachgeschalteten Signalkaskade durch den Bid kd die Synergie aufhebt.

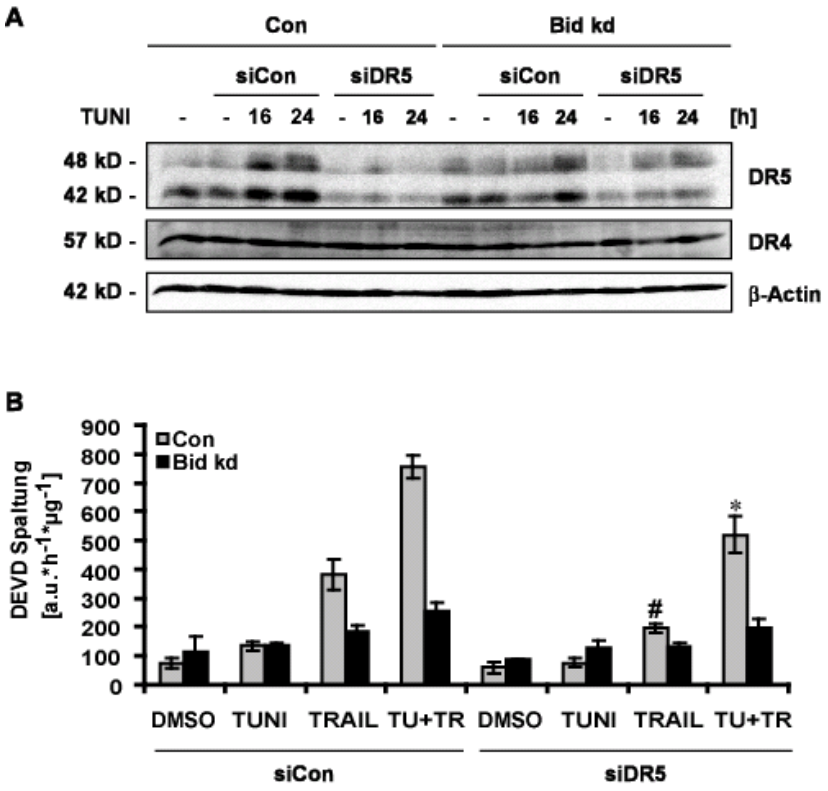

Abbildung 27: DR5-Depletion reduziert die Tunicamycin-vermittelte Sensitivierung für die TRAIL-abhängige Apoptose signifikant.
(A) DR5-spezifische siRNA unterdrückt die basale und die Tunicamycin-induzierte Expression des TRAIL-Rezeptors-2. 24 h nach Transfektion der DR5 (siDR5)- bzw. der Kontroll (siCon)-siRNA wurden die Bid kd- und

Kontrollzellen 16 h oder 24 h mit Tunicamycin (3 µM) inkubiert. Der Nachweis der DR4- und der DR5-Expression erfolgte mittels Western Blot Analyse. Die Rehybridisierung des Blots mit anti-β-Aktin-Antikörper diente als Ladekontrolle. **(B) DR5-spezifische siRNA verringert die Tunicamycin-induzierte Sensitivierung der Bid-profizienten Zellen.** Beide Zelllinien wurden wie in (A) transfiziert, gefolgt von einer 14-stündigen Vorbehandlung mit Lösungsmittel (DMSO) oder Tunicamycin (TU, 0.3 µM). Wo angegeben, wurden die Kulturen zusätzlich für 1.5 h mit TRAIL (TR, 10 ng/ml) inkubiert. Die Caspase-3-ähnliche Aktivität der Zelllysate wurde durch Spaltung des fluoreszierenden Substrats Ac-DEVD-AMC gemessen. Die Mittelwerte ± SD stammen aus drei unabhängigen Experimenten. * und # bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen siCon- und siDR5-behandelten Proben ($p<0.05$).

7 Gentoxische Agenzien

7.1 Topoisomerase-Inhibitoren

Die DNA bildet für viele Zytostatika den wichtigsten zellulären Angriffspunkt. Nukleotidanaloga, alkylierende und DNA-Strangbruch induzierende Agenzien oder Strahlung inhibieren Transkriptions- und Replikationsprozesse und beeinträchtigen deshalb bevorzugt die schnell proliferierenden Zellen eines Tumors, schädigen aber auch andere rasch wachsende Gewebe und induzieren Zellzyklusarrest oder Apoptose über den intrinsischen Weg. DNA-Schädigung aktiviert den Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor p53 (Ryan et al., 2001). Zu den proapoptotischen Zielgenen von p53 gehören auch die BH3-only Proteine Puma, Noxa, Bad und Bid (Jiang et al., 2006b; Nakano and Vousden, 2001; Oda et al., 2000; Sax et al., 2002), die Zelltyp- und Stimulus-abhängig als Vermittler der gentoxischen Todessignale an die Mitochondrien identifiziert werden konnten (Kamer et al., 2005; Michalak et al., 2008; Ranger et al., 2003; Villunger et al., 2003).

Für keines der BH3-only Proteine wird der Beitrag zur Apoptose nach DNA-Schädigung aber so kontrovers diskutiert wie im Fall von Bid. Obwohl Bid *knock out* Mäuse bereits seit 1999 zur Verfügung stehen (Yin et al., 1999), sind bis heute die Befunde widersprüchlich, ob Bid-defiziente MEFs vor gentoxischem Stress geschützt sind oder nicht (Erler et al., 2004; Kamer et al., 2005; Kaufmann et al., 2007; Wei et al., 2001; Yin et al., 1999). Da diese Kontroverse auch in humanen Karzinomzelllinien besteht (Engels et al., 2000; Erler et al., 2004; Karpinich et al., 2006; Wagner et al., 2004; Werner et al., 2004), sollte im Rahmen dieser Arbeit die Bedeutung des Bid kd für die Apoptosesensitivität der HeLa-Zellen nach DNA-Schädigung untersucht werden.

Um DNA-Schäden zu induzieren, wurden Bid kd- und Kontrollzellen mit den Topoisomerase II-Inhibitoren Etoposid und Doxorubicin behandelt. Die Hemmung dieses Enzyms, das transient Phosphodiesterbindungen lösen kann, um den Spiralisierungsgrad der DNA zu verändern, verhindert die Religation der Bindungen und induziert Doppelstrangbrüche (Montecucco and Biamonti, 2007).

Zunächst wurden je zwei verschiedene Konzentrationen der beiden Topoisomerase-Inhibitoren eingesetzt, um die Caspase-3-ähnliche Aktivität nach 24-stündiger Inkubation zu bestimmen. Nachdem beide Agenzien eine signifikant höhere DEVDase-Aktivität in den Bid-profizienten Zellen hervorgerufen hatten, sollte der Befund für Etoposid in zusätzlichen Experimenten bestätigt werden.

Bid kd- und Kontrollzellen wurden über einen Zeitraum von 48 h mit 50 µM Etoposid inkubiert und die Caspase-3- und PARP-Spaltung im Western Blot detektiert. Die Aktivierung der wichtigsten Effektorcaspase und damit einhergehend das Auftreten des Caspase-spezifischen PARP-Fragments erfolgte in den Bid kd-Zellen verzögert. Allerdings war die Protektion durch den Bid kd deutlich geringer als nach Todesrezeptor-Stimulation, wie auch die nachfolgend durchgeführte FACS-Analyse bestätigte. Die Zahl Annexin V/PI-positiver Zellen in den Bid-profizienten Kulturen war moderat, doch signifikant erhöht.

Auch die Proliferationsfähigkeit nach Etoposid-Behandlung fiel Dosis-abhängig in den Kontrollzellen niedriger aus.

Abschließend sollte geklärt werden, ob die geringere Caspaseaktivierung in den Bid kd-Zellen durch Überexpression von Bid wieder auf das Niveau der Kontrollzellen gebracht werden kann. Dazu wurden die parentalen Bid kd-Zellen mit den Bid-FRET-exprimierenden (siehe S. 81) und den Bid-profizienten Zellen mit Etoposid behandelt und nach 24-stündiger Inkubation in einem DEVD-Assay verglichen. Die fluorimetrische Vermessung der Caspaseaktivität ergab, dass beide Bid-FRET-Klone für den Topoisomerase-Inhibitor resensitiviert worden waren. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Bid in HeLa-Zellen einen moderaten, aber signifikanten Beitrag zur Apoptose nach DNA-Schädigung leistet.

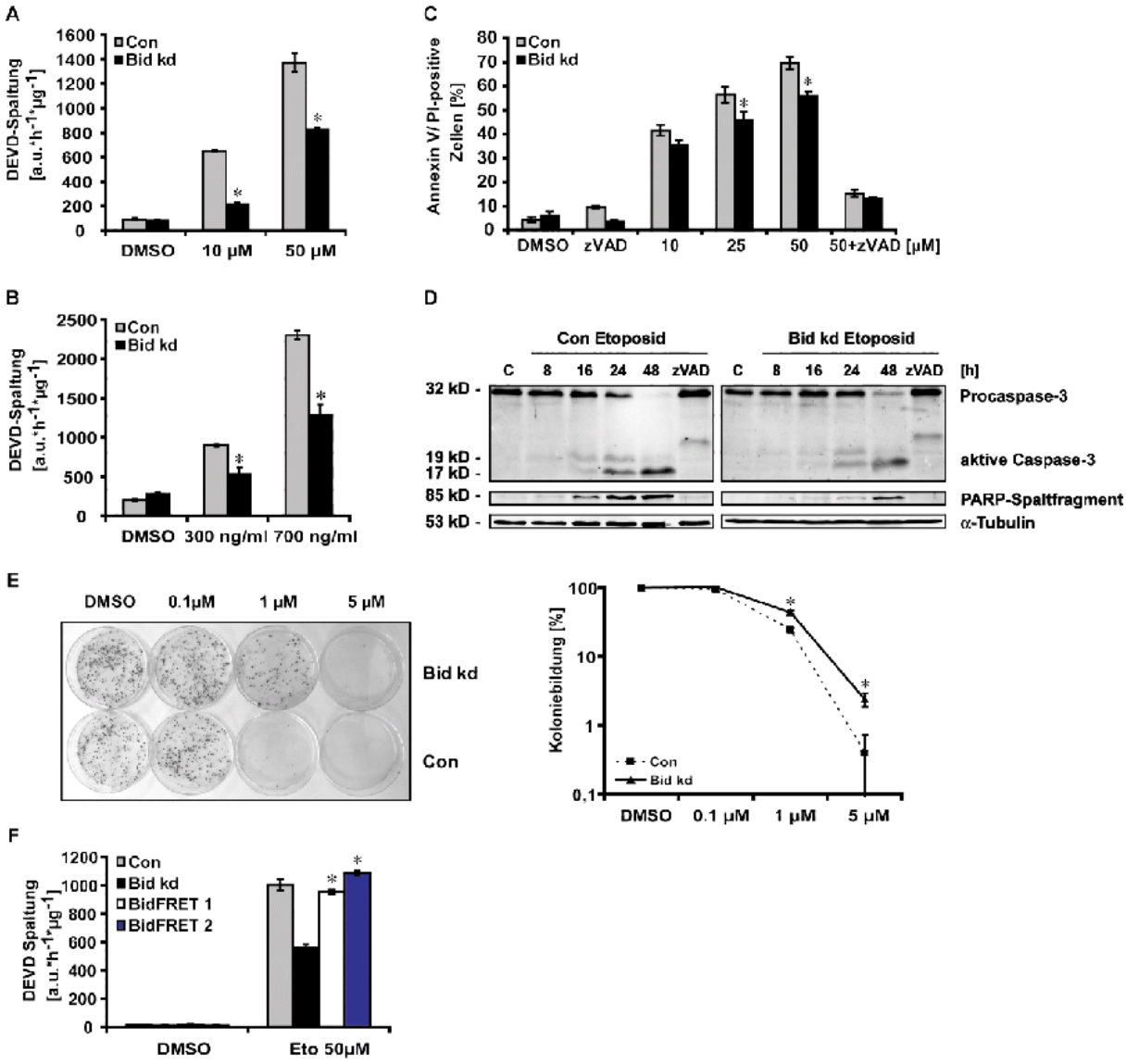

Abbildung 28: Bid ist in HeLa-Zellen an der Apoptose nach DNA-Schädigung beteiligt.
(A+B) Bid kd-Zellen zeigen geringere DEVDase-Aktivität nach gentoxischem Stress. Kontroll- und Bid kd-Zellen wurden 24 h mit den angegebenen Etoposid (A)- oder Doxorubicin (B)-Konzentration oder mit Lösungsmittel (DMSO) inkubiert. Die Caspase-3-ähnliche Aktivität der Gesamtzellextrakte wurde durch Spaltung des fluoreszierenden Tetrapeptids Ac-DEVD-AMC bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Experimenten. * bezeichnet signifikante Unterschiede zwischen Bid kd- und Kontrollzellen ($p<0.05$). **(C) Die Etoposid-induzierte Apoptose ist durch den Bid kd reduziert.** Beide Zelllinien wurden 30 h mit den angegebenen Konzentrationen des Topoisomerase-Inhibitors inkubiert. Kontrollkulturen wurden mit DMSO, zVAD (100 µM) oder Etoposid und zVAD behandelt. Die Quantifizierung Annexin V/PI-positiver Zellen erfolgte durchflusszytometrisch. Jeweils 10 000 Zellen wurden ausgewertet. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD (n=3) eines repräsentativen Experiments. * markiert signifikante Unterschiede zwischen Bid kd- und Kontrollzellen ($p<0.05$). **(D) Geringere Bidexpression verzögert die Caspase-3- und PARP-Spaltung.** Gesamtzellextrakte Etoposid (100 µM)-behandelter Bid kd- und Kontrollzellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten hergestellt. Kontrollansätze enthielten nur Lösungsmittel (C, DMSO) oder Etoposid mit dem Caspaseinhibitor zVAD-fmk (100 µM). Die Caspase-3-Prozessierung und das Caspase-spezifische PARP-Spaltprodukt wurden im Western Blot nachgewiesen. Der Caspase-3-Antikörper erkennt neben der inaktiven Proform (32 kD) auch die aktiven Fragmente der großen Untereinheit (19 kD und 17 kD). Die Rehybridisierung des Blots mit α-Tubulin-Antikörper diente als Ladekontrolle. **(E) Geringere Proliferation und Koloniebildung in Bid-profizienten Zellen nach gentoxischem Stress.** Nach zweistündiger Inkubation beider Zelllinien mit DMSO oder Etoposid (0.1, 1 und 5 µM) wurden je 1000 Zellen in neue Schalen überführt und zwei Wochen kultiviert. Die

herangewachsenen Kolonien wurden fixiert, gefärbt und gezählt. Schalen eines repräsentativen Versuchs sind abgebildet. Die Mittelwerte ± SD stammen aus zwei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 3). Signifikanzen sind markiert wie in (A). **(F) Bid-FRET-Überexpression resensitiviert Bid kd-Zellen gegenüber gentoxischem Stress.** Kontroll-, Bid kd- oder Bid kd-Bid-FRET-Zellen wurden 24 h mit Etoposid (50 µM) oder Lösungsmittel inkubiert. Anschließend wurde die DEVDase-Aktivität der Zellextrakte durch Spaltung des fluoreszierenden Substrats Ac-DEVD-AMC bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Experimenten. * markiert signifikante Unterschiede zwischen behandelten Bid kd- und Bid-FRET-transfizierten Zellen ($p<0.05$).

7.2 Oxaliplatin

7.2.1 Bid trägt zur Oxaliplatin-induzierten Apoptose in HeLa-Zellen bei

Um den protektiven Effekt des Bid kds bei gentoxischem Stress mit einem weiteren Zytostatikum abzusichern, wurde Oxaliplatin ausgewählt, das anstelle der Topoisomerase-Hemmung durch Platinierung benachbarter Basen zur Quervernetzung der DNA führt. Am häufigsten treten Intrastrang-1,2-GG- bzw. Intrastrang-1,2-GA-Addukte auf, welche die Konformation der DNA verändern und damit DNA-Synthese und Transkription blockieren (siehe S. 28) (Saris et al., 1996; Spingler et al., 2001; Woynarowski et al., 2000).
Oxaliplatin weist *in vitro* und *in vivo* eine antiproliferative und zytotoxische Aktivität gegenüber einer Vielzahl humaner und muriner Tumore auf (Rixe et al., 1996; Tashiro et al., 1989), doch ist die apoptotische Signalkaskade noch nicht vollständig aufgeklärt. Die meisten mechanistischen Studien wurden in Kolonkarzinomzellen durchgeführt, da diese Platinverbindung in der Klinik primär zur Behandlung des metastasierenden Kolonkarzinoms eingesetzt wird (Schmoll and Cassidy, 2001). Für Zervixkarzinomzellen liegen bisher nur wenige Daten vor.

Zunächst wurde deshalb die Oxaliplatin-induzierte Apoptoserate der Bid kd- und Kontrollzellen ermittelt. Die Quantifizierung der FACS-Analyse zeigte, dass 20 µg/ml ausreichten, um in beiden Zelllinien nach 24-stündiger Inkubation Zelltod auszulösen, der in den Bid kd-Zellen signifikant geringer ausfiel. Dass der Caspaseinhibitor zVAD-fmk die Zahl Annexin V-positiver Zellen drastisch reduzieren konnte, wies auf einen primär Caspase-vermittelten Zelltod hin. Der anschließend durchgeführte DEVD-Assay bestätigte die Aktivierung Caspase-3-ähnlicher Caspasen und die signifikante Protektion der Zellen durch den Bid kd. Auch der Koloniebildungsassay, in dem die Proliferationsfähigkeit der Zellen nach Oxaliplatin-Behandlung untersucht wurde, ergab einen konzentrationsabhängigen Überlebensvorteil der Bid-depletierten Zellen. Diese Daten zeigen, dass Oxaliplatin in HeLa-Zellen Dosis-abhängig Apoptose auslöst und dass Bid für eine effektive Effektorcaspase- und Zelltodinduktion notwendig ist.

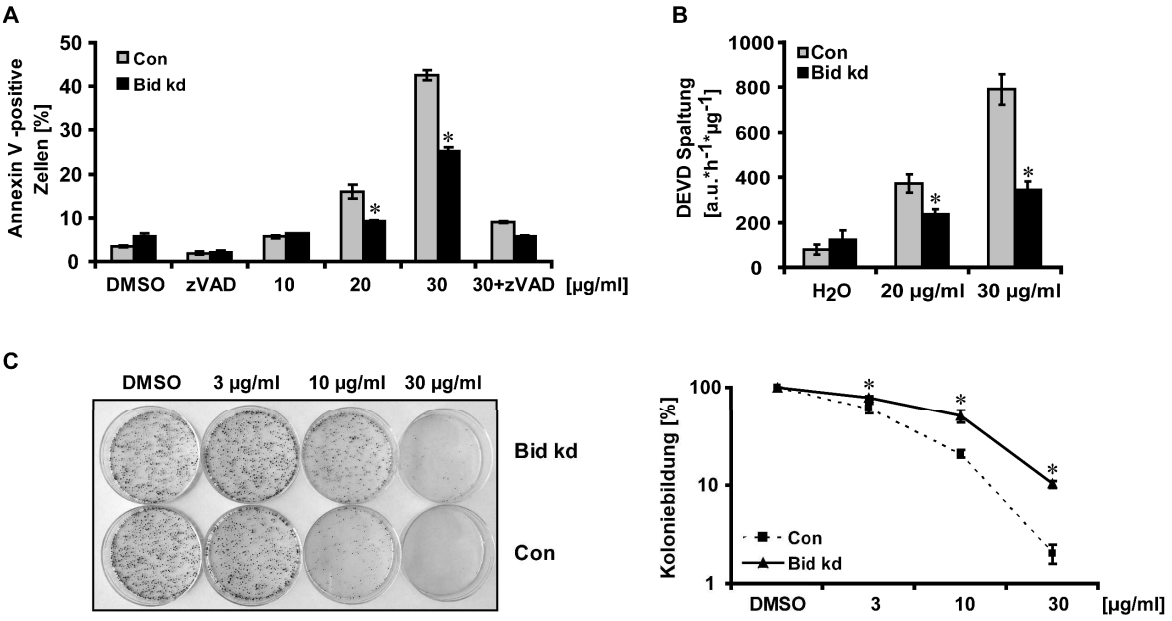

Abbildung 29: Bid und Caspasen sind wichtige Vermittler des Oxaliplatin-induzierten Zelltods in HeLa-Zellen.
(A) Eine verminderte Bidexpression reduziert die Apoptose nach Oxaliplatinexposition. Bid kd- und Kontrollzellen wurden mit Lösungsmittel (DMSO) oder den angegebenen Oxaliplatinkonzentrationen mit oder ohne Zusatz des Caspaseinhibitors zVAD-fmk (100 µM) inkubiert. 24 h später erfolgte die Quantifizierung der Annexin V-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie. Dafür wurden jeweils 10 000 Zellen ausgewertet. Die Daten sind Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. * markiert signifikante Unterschiede zwischen Con- und Bid kd-Zellen ($p<0.05$). **(B) Die Oxaliplatin-induzierte DEVDase-Aktivität ist in Bid kd Zellen signifikant verringert.** Nach 24-stündiger Behandlung beider Zelllinien mit Oxaliplatin (20 und 30 µg/ml) oder Lösungsmittel (H_2O) wurde die Caspase-3-ähnliche Aktivität der Gesamtzellextrakte mittels des fluoreszierenden Substrats Ac-DEVD-AMC bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzen wie in (A). **(C) Der Bid kd erhöht Proliferation und Koloniebildung nach Oxaliplatin-Behandlung.** Bid kd- und Kontrollzellen wurden 1 h in Gegenwart von Oxaliplatin (3, 10 und 30 µg/ml) oder Lösungsmittel kultiviert. Anschließend wurden aus allen Ansätzen je 1000 Zellen in neue Kulturgefäße überführt. Die nach zwei Wochen herangewachsenen Kolonien wurden fixiert, gefärbt und gezählt. Schalen eines repräsentativen Experiments sind abgebildet. Die Mittelwerte ± SD stammen aus zwei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 3). Signifikanzen wie in (A).

7.2.2 Oxaliplatin aktiviert die Initiatorcaspasen-2,-8 und -9

Die bisherigen Ergebnisse hatten ergeben, dass sowohl Bid als auch Caspasen zur Oxaliplatin-induzierten Apoptose beitragen. Damit war allerdings keine Aussage über die Reihenfolge der Aktivierung möglich, da Bid einerseits durch Caspasespaltung aktiviert wird, andererseits via MOMP selbst eine Caspaseaktivierung induziert oder diese verstärkt (Li et al., 1998; Slee et al., 2000). Zunächst wurde daher im Western Blot untersucht, welche der Initiatorcaspasen nach Oxaliplatin-Behandlung aktiviert werden und ob dabei Unterschiede zwischen Bid-profizienten und -depletierten Zellen auftreten. Für beide Zelllinien konnten nach 16-stündiger Oxaliplatin-Inkubation Spaltfragmente der Initiatorcaspasen-2, -8 und -9 nachgewiesen werden. Die Prozessierung der Procaspasen in die aktiven Untereinheiten

erfolgte in den Bid kd-Zellen allerdings verzögert. Dies zeigt, dass Bid an der Caspaseaktivierung entweder direkt beteiligt ist oder durch eine Amplifizierung des Signals zu einer effizienteren Aktivierung beiträgt.

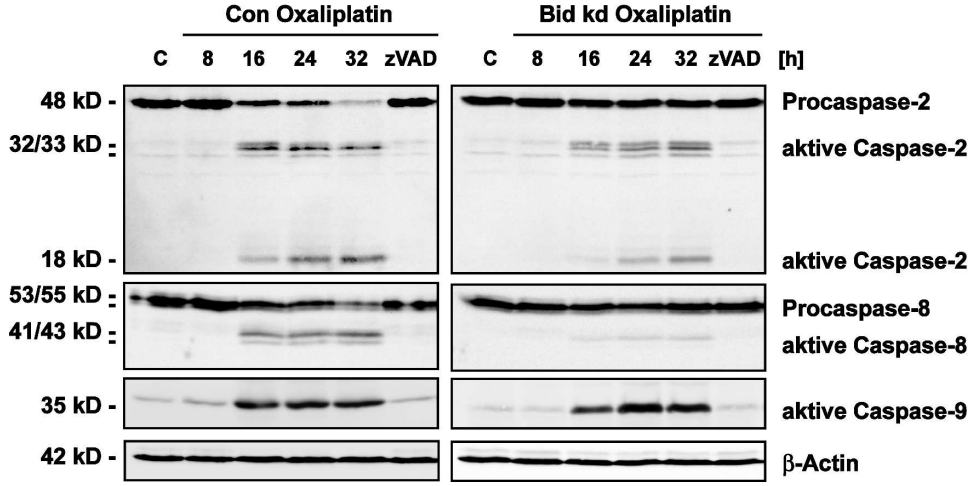

Abbildung 30: Kinetik der Caspase-2-,-8- und-9-Aktivierung in der Oxaliplatin-induzierten Apoptose.
Bid kd- und Kontrollzellen wurden 8-32 h mit Oxaliplatin (30 µg/ml), 32 h mit Lösungsmittel oder 32 h mit Oxaliplatin und dem Caspaseinhibitor zVAD-fmk (100 µM) behandelt. Der Nachweis der Caspasespaltung erfolgte mittels Western Blot Analyse. Während die Antikörper für Caspase-2 und- 8 sowohl die Proform (p48 bzw. p53/p55) als auch die aktiven Spaltfragmente (p32/p33 und p18 bzw. p41/p43) erkennen, ist der Caspase-9-Antikörper spezifisch für aktive Caspase-9 (p35). Der β-Aktin Nachweis diente als Ladekontrolle. Das Experiment wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

7.2.3 Oxaliplatin aktiviert Caspasen postmitochondrial

Da die Western Blots in Abb. 30 eine Aktivierung aller untersuchten Caspasen ergeben hatten, war eine Identifizierung der Initiatorcaspase auf diesem Weg nicht möglich. Die Rolle von Caspase-2 als Initiatorcaspase bei gentoxischem Stress ist umstritten und sollte hier erst nach Ausschluss der anderen Caspasen untersucht werden (Lassus et al., 2002; Lassus, 2004; Paroni et al., 2001; Samraj et al., 2007; Tu et al., 2006). Eine weitere Möglichkeit wäre eine initiale Caspase-8-Aktivierung (Longley et al., 2006); allerdings steigerte Oxaliplatin in den Bid kd- und Kontrollzellen die DR4-Expression nicht und eine erhöhte DR5- und Fas/CD95-Expression auf Proteinebene war erst zwischen 24 h und 48 h und damit später als die Caspaseaktivierung nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob Caspase-9 in HeLa-Zellen als Initiatorcaspase nach Oxaliplatinexposition fungiert, wurden HeLa-Zellen verwendet, in denen durch Bcl-2-Überexpression die Cytc-Freisetzung und die nachfolgende Caspase-9-Aktivierung im Apoptosom inhibiert werden (Yang et al., 1997).

16 h nach Beginn der Oxaliplatin-Behandlung waren in den parentalen HeLa-Zellen die ersten Spaltfragmente der Initiatorcaspen-2, -8, und -9 und der Effektorcaspase-3 nachweisbar, während die HeLa-Bcl-2-Zellen auch nach 48-stündiger Exposition keine aktiven Caspase-

Untereinheiten aufwiesen. Da Bcl-2-Überexpression die Caspaseaktivierung verhindert, beginnt die von Oxaliplatin-induzierte Caspasekaskade in HeLa-Zellen postmitochondrial mit der Aktivierung von Caspase-9.

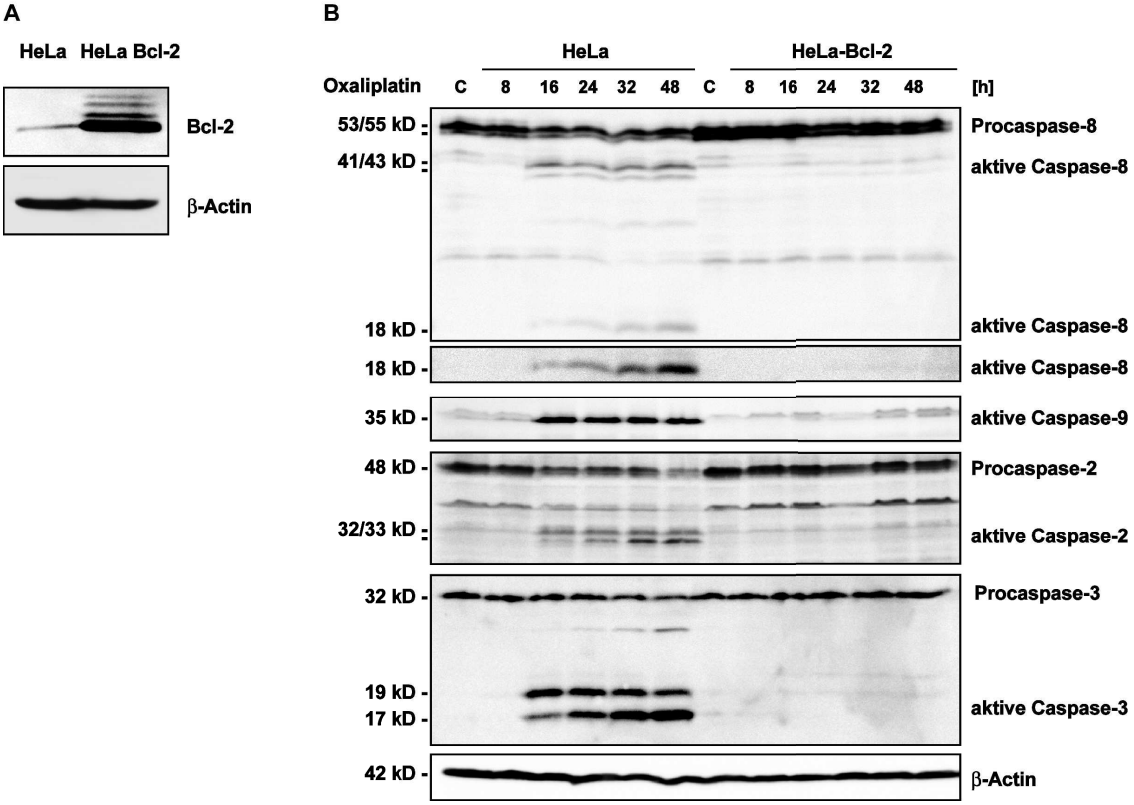

Abbildung 31: Oxaliplatin aktiviert Caspasen postmitochondrial.
(A) Nachweis der Bcl-2-Überexpression. Gesamtproteinextrakte exponentiell wachsender HeLa- und HeLa-Bcl-2-Zellen wurden im Western Blot auf die Expression von Bcl-2 und als Ladekontrolle auch auf β-Aktin getestet. **(B) Bcl-2-Überexpression inhibiert die Oxaliplatin-induzierte Caspaseaktivierung.** HeLa- und HeLa-Bcl-2-Zellen wurden für die angegebene Dauer mit Oxaliplatin (30 µg/ml) inkubiert. Die Procaspasen und ihre Spaltfragmente wurden mittels Western Blot nachgewiesen. Der Caspase-9-Antikörper detektiert nur das aktive Fragment p35, die anderen Antikörper dagegen erkennen neben den prozessierten Untereinheiten auch die Proform. Der β-Aktin-Nachweis diente als Ladekontrolle. Der Versuch wurde einmal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

7.2.4 tBid entsteht auch in Caspase-3-defizienten MCF-7-Zellen nach Oxaliplatin-Behandlung

Nachdem die Initiatorcaspase identifiziert worden war, sollte untersucht werden, wann Bid in die apoptotische Signalkaskade eingeschaltet wird. Bid kann als ungeschnittenes Protein die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran induzieren (Luo et al., 1998), das Protease-prozessierte, trunkierte Protein ist aber vielfach potenter (Madesh et al., 2002). Da die vorausgegangenen Experimente eine postmitochondriale Caspaseaktivierung ergeben hatten, könnte Bid in einem *feedback loop* aktiviert werden. Dabei würde Caspase-3 nach Aktivierung durch Caspase-9 Bid entweder direkt nach D^{60} schneiden oder zusammen mit Caspase-6 oder -7 zur Aktivierung von Caspase-8 führen, welche Bid ebenfalls an D^{60} spalten

kann (Guerrero et al., 2008; Li et al., 1998; Slee et al., 1999; Slee et al., 2000). Desweiteren ist eine Bidprozessierung durch Nicht-Caspase-Proteasen möglich (siehe S. 21) (Yin, 2006). Obwohl noch nicht abschließend geklärt ist, welche Effektorcaspasen zur Aktivierung von Caspase-8 im *feedback loop* führen, scheint Caspase-3 dabei eine Schlüsselstellung zuzukommen (Guerrero et al., 2008). Deshalb wurde die Caspase-3-defiziente, humane Brustadenokarzinomzelllinie MCF-7 im Western Blot auf Caspase- und Bidspaltung nach Oxaliplatin-Behandlung untersucht.

Aktive Caspase-9 war in geringen Mengen bereits nach 8 h, prozessierte Caspase-8 und tBid dagegen nach 16 h nachweisbar, so dass die Caspaseaktivierung in MCF-7-Zellen etwas früher als in HeLa-Zellen einsetzt. Diese Ergebnisse belegen, dass Oxaliplatin eine Caspase-3-unabhängige Spaltung von Bid induzieren und dass der Ausfall von Caspase-3 für die Caspase-8-Aktivierung durch Caspase-6 oder -7 kompensiert werden kann. Da Caspase-9 früher als Caspase-8 oder Bid gespalten wird, ist auch für MCF-7-Zellen eine postmitochondriale Caspaseaktivierung anzunehmen; allerdings können mit den hier durchgeführten Experimenten die Caspasen-2 oder -10 als Initiatorcaspasen nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse zeigen desweiteren, dass im Western Blot nachweisbare tBid-Konzentrationen erst nach der Caspaseaktivierung im *feedback loop* generiert werden.

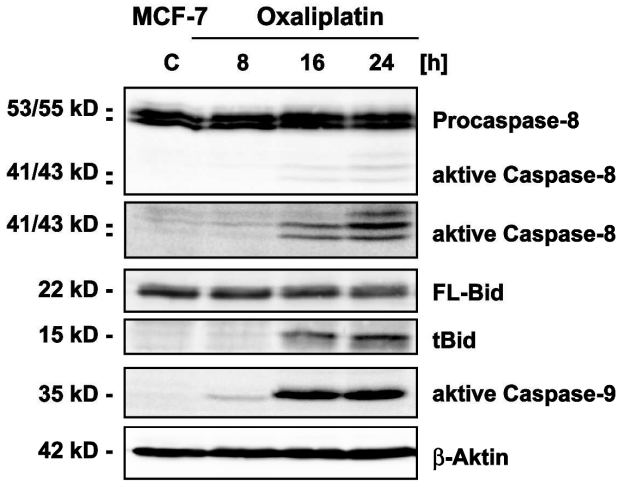

Abbildung 32: Caspase-3-Defizienz verhindert die Bid- und die Caspase-8-/-9-Spaltung nach Oxaliplatinexposition nicht.
Oxaliplatin (30 µg/ml)-behandelte humane Brustadenokarzinomzellen (MCF-7) wurden nach der angegebenen Inkubationsdauer lysiert und im Western Blot auf die Expression von Procaspase-8 und ihren Spaltfragmenten, aktive Caspase-9, FL- und tBid untersucht. Die Rehybridisierung mit β-Aktin-Antikörper diente als interne Kontrolle. Eine Wiederholung des Experiments lieferte vergleichbare Resultate.

7.2.5 IETD-fmk reduziert die Bidspaltung in HeLa-Zellen

Da die Experimente in den MCF-7-Zellen ergeben hatten, dass eine Spaltung von Bid trotz der Caspase-3-Defizienz möglich ist, sollte die Relevanz von Caspase-8 für die Bidprozessierung untersucht werden. Dazu wurde der Einfluss des häufig verwendeten Caspase-8-Inhibitors IETD-fmk auf Oxaliplatin-behandelte, Bid-profiziente HeLa-Zellen ermittelt (Garcia-Calvo et al., 1998). In einem Vorversuch, der die optimale Konzentration und die Spezifität des Inhibitors bestimmen sollte, wurden die Zellen sowohl mit einem Caspase-8-abhängigen (Fas/CHX) als auch mit einem Caspase-8-unabhängigen Stimulus (STS, siehe auch Abb. 38) inkubiert (Engels et al., 2000; Muzio et al., 1996). Konzentrationsabhängig konnte IETD-fmk nicht nur die Fas-induzierte, sondern auch die STS-abhängige DEVDase-Aktivität reduzieren und bei Verwendung von 10 µM auf das Ausgangsniveau zurückbringen. Dies zeigte, dass IETD-fmk neben Caspase-8 auch andere DEVDasen wie Caspase-3 und -7 effektiv hemmte. Da für eine Inaktivierung der Initiatorcaspase-10 geringere IETD-fmk Dosen als für die Hemmung der Effektorcaspasen-3 oder -7 notwendig sind, inhibiert IETD-fmk in den verwendeten Konzentration von 10-25 µM auch Caspase-10 (Garcia-Calvo et al., 1998).

Obwohl IETD-fmk als spezifischer Inhibitor für Caspase-8 ausschied, wurde er in niedriger Konzentration anstelle des Pancaspase-Inhibitors zVAD-fmk eingesetzt, um den Oxaliplatin-induzierten *feedback loop* zu unterbrechen. Bid-profiziente Zellen wurden mit 3 oder 20 µM IETD-fmk präinkubiert und anschließend mit Oxaliplatin behandelt. In den Ansätzen ohne Inhibitor waren nach 16 h und 24 h im Western Blot erwartungsgemäß aktive Caspase-3- und -8-Fragmente sowie tBid nachweisbar. Auch war die Caspase-8-Prozessierung zu beiden Zeitpunkten durch 20 µM IETD-fmk inhibiert und das Auftreten der aktiven Caspase-3-Fragmente signifikant verringert. Die Bidspaltung dagegen war zwar konzentrationsabhängig reduziert, aber nicht vollständig gehemmt.

Diese Ergebnisse belegen einerseits, dass IETD-fmk nicht als spezifischer Inhibitor einzelner Caspasen verwendet werden kann. Andererseits verdeutlichen die Western Blots in Abb. 33 B, dass Caspasen zur Oxaliplatin-induzierten Spaltung von Bid beitragen.

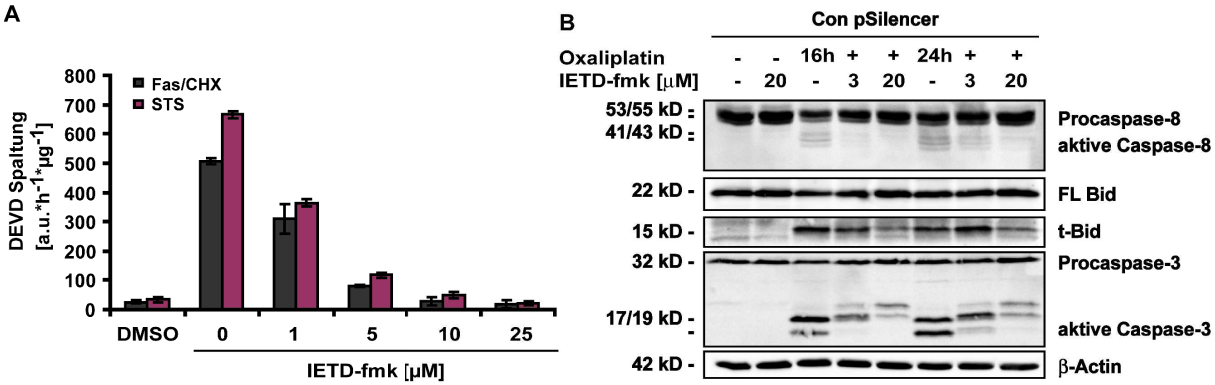

Abbildung 33: Der DEVDase-Inhibitor IETD-fmk unterdrückt die Oxaliplatin-induzierte Bidspaltung nicht vollständig.
(A) IETD-fmk inhibiert neben Caspase-8 auch andere DEVDasen. Vor Beginn einer vierstündigen Fas (100 ng/ml)/CHX (1 µg/ml)- oder STS (1 µM)-Behandlung wurden Bid-profiziente Kontroll-*pSilencer* Zellen entweder 1 h mit Lösungsmittel (DMSO) oder IETD-fmk in den angegebenen Konzentrationen vorinkubiert. Die Aktivität Caspase-3-ähnlicher Caspasen wurde mittels Spaltung des fluoreszierenden Tetrapeptids Ac-DEVD-AMC bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte ± SD eines repräsentativen Experiments (n=3). **(B) Einfluss von IETD-fmk auf die Caspase- und Bidprozessierung nach Oxaliplatinexposition.** Kontroll-*pSilencer* Zellen wurden 1 h mit IETD-fmk (3 oder 20 µM) vorbehandelt und anschließend 16 h oder 24 h in Gegenwart von Oxaliplatin (30 µg/ml) kultiviert. Kontrollansätze erhielten nur DMSO oder 20 µM IETD-fmk. Der Nachweis der Procaspasen-8 und -3 und ihrer prozessierten Untereinheiten sowie des FL-Bid- und tBidproteins erfolgte mittels Western Blot. Die Detektion von β-Aktin diente als interne Kontrolle. Das Experiment wurde mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

7.2.6 Oxaliplatin aktiviert konventionelle Calpaine

Die Ergebnisse des vorherigen Abschnitts hatten gezeigt, dass eine Vorbehandlung mit dem Caspaseinhibitor IETD-fmk die Spaltung von Bid zwar signifikant verringern, aber nicht vollständig verhindern kann. Dies ist entweder auf unvollständige Caspaseinaktivierung durch IETD-fmk oder auf die Aktivierung einer anderen Bid-spaltenden Protease zurückzuführen.
Neben den bereits erwähnten Caspasen können auch verschiedene Granzyme, Kathepsine und die konventionellen Calpaine Bid spezifisch und limitiert prozessieren (siehe S. 21) (Barry et al., 2000; Chen et al., 2001; Cirman et al., 2004; Gil-Parrado et al., 2002; Hou et al., 2008; Stoka et al., 2001; Zhao et al., 2007). Sie generieren dabei trunkierte Bidmoleküle, die je nach Position der Schnittstelle ein Molekulargewicht zwischen 13 kD und 15 kD aufweisen. Die wichtigsten Proteasespaltstellen befinden sich in einem unstrukturierten Bereich des Bidproteins zwischen den α-Helices-α2 und -α3. Diese sog. *loop*-Region enthält in der humanen Sequenz zwei Caspaseschnittstellen (D^{60} und D^{75}), zwei Calpainspaltstellen (Y^{54} und G^{70}) und eine für Granzym B (D^{75}). Auch die Kathepsin-abhängige Bidspaltung ist im Humansystem nachgewiesen, die Schnittstellen wurden aber nur für murines Bid identifiziert (R^{65} und R^{71}).
Von den genannten Proteasen wurden nur Caspasen als Vermittler der Oxaliplatin-induzierten Apoptose beschrieben, doch da andere Platinverbindungen wie Cisplatin oder Carboplatin Calpaine aktivieren können (Ding et al., 2002; Liu et al., 2008; Mandic et al., 2002), sollte auch Oxaliplatin daraufhin untersucht werden.
Bei Calpainen handelt es sich um Ca^{2+}-abhängige, neutrale Cysteinproteasen, die in Säugern eine 14 Mitglieder umfassende Familie bilden, von denen die sog. konventionellen Calpaine µ- und m-Calpain ubiquitär exprimiert werden (siehe S. 24). Die beiden konventionellen Calpaine sind Heterodimere, die aus einer spezifischen katalytischen Untereinheit (Calpain-1 für µ- und Calpain-2 für m-Calpain, jeweils 80 kD) und einer identischen, regulatorischen

Untereinheit (Calpain-4, 28 kD) bestehen. Die Aktivierung der konventionellen Calpaine geht mit einer N-terminalen, autolytischen Prozessierung der großen und der kleinen Untereinheit einher. Dabei wird Calpain-4 zu einem 18 kD-Fragment proteolysiert (Goll et al., 2003). Dieses Spaltprodukt war in SH-SY5Y-Neuroblastomzellen zu detektieren, die als Positivkontrolle für Calpainaktivierung mehrere Stunden einer erhöhten extrazellulären Ca^{2+}-Konzentration (12 mM) und dem Ca^{2+}-Ionophor A23187 ausgesetzt worden waren (Reimertz et al., 2001). In Gegenwart des Calpaininhibitors Calpeptin (30 µM) unterblieb die Calpain-4-Prozessierung. In den Lysaten Oxaliplatin-behandelter Bid kd- und Kontrollzellen war das 18 kD-Fragment nach 16 h, dem Zeitpunkt der Caspaseaktivierung, nachweisbar und auch hier konnte Calpeptin die Spaltung verhindern. Diese Ergebnisse zeigen, dass Oxaliplatin in Hela-Zellen eine Aktivierung der konventionelle Calpaine induziert, die zeitgleich mit der Bid- und der Caspaseprozessierung erfolgt.

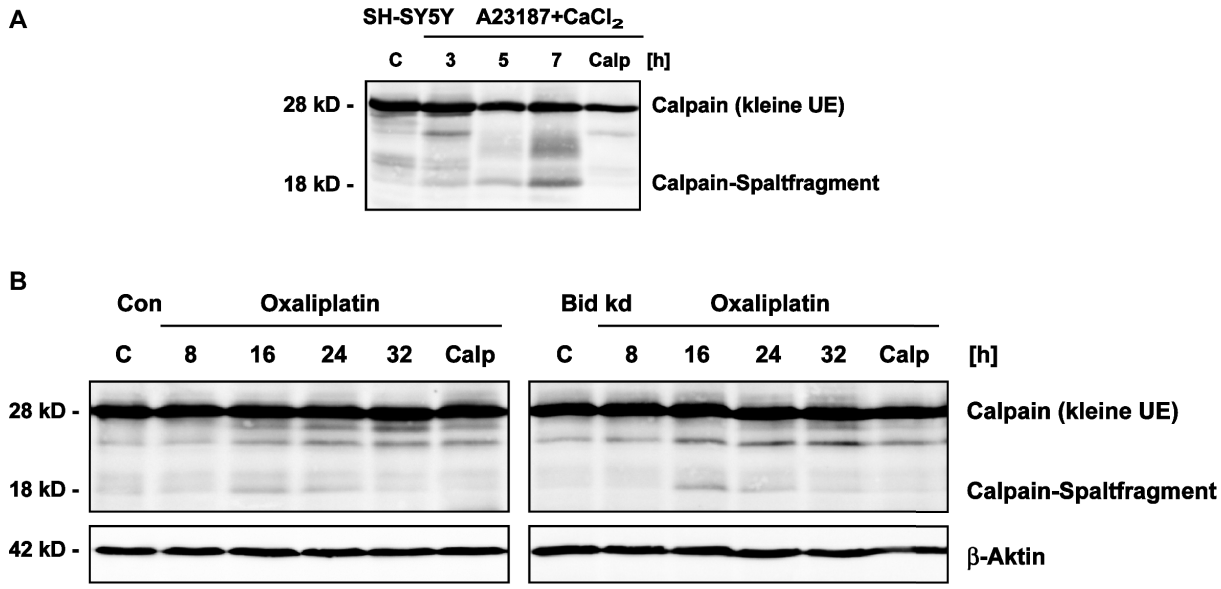

Abbildung 34: Aktivierung konventioneller Calpaine nach Oxaliplatinexposition.
(A) Ca^{2+}-abhängige Calpainaktivierung in humanen Neuroblastomzellen. Als Positivkontrolle für die Calpainaktivierung wurden SH-SY5Y-Neuroblastomzellen mit dem Ca^{2+}-Ionophor A23187 (3 µM) und $CaCl_2$ (12 mM) behandelt. Kontrollen erhielten nur Lösungsmittel (C, DMSO) oder wurden 1 h vor Zugabe von A23187/$CaCl_2$ mit dem Calpaininhibitor Calpeptin (Calp, 30 µM) präinkubiert. Nach Lyse der Zellen zu den angegebenen Zeiten wurde die Calpainaktivierung im Western Blot nachgewiesen. Der verwendete Antikörper erkennt neben der unprozessierten Form der kleinen Calpainuntereinheit Calpain-4 (28 kD) auch das nach der Aktivierung abgespaltene 18 kD-Fragment. **(B) Oxaliplatin-induzierte Calpainaktivierung in HeLa-Zellen.** Kontroll- und Bid kd-Zellen wurden für die angegebene Dauer mit Oxaliplatin (30 µg/ml) oder für 32 h mit Lösungsmittel (DMSO) behandelt. Calpeptin (Calp, 30 µM) wurde 1 h vor Beginn der Oxaliplatinexposition zugesetzt. Der Nachweis der kleinen Calpainuntereinheit und des autolytischen Spaltprodukts erfolgte mittels Western Blot. Die Rehybridisierung der Membranen mit anti-β-Aktin-Antikörper diente als Ladekontrolle. Eine Wiederholung des Experiments lieferte vergleichbare Resultate.

7.2.7 Calpaininhibition vermindert die Oxaliplatin-induzierte Bid- und Caspasespaltung

Calpaine können einerseits Stimulus- und Zelltyp-abhängig zur Aktivierung bzw. zur Inaktivierung von Bcl-2-Mitgliedern und Caspasen beitragen, andererseits aber auch erst nach oder von diesen aktiviert oder modifiziert werden (Blomgren et al., 2001; Chua et al., 2000; Gil-Parrado et al., 2002; Goll et al., 2003; Nakagawa and Yuan, 2000; Porn-Ares et al., 1998; Wood et al., 1998). Deshalb wurde mittels Western Blot untersucht, ob eine Calpaininhibierung die Oxaliplatin-induzierte Bidspaltung und Caspaseaktivierung beeinflusst.

Erwartungsgemäß war nur in den Bid-profizienten HeLa-Zellen 16 h nach Beginn der Oxaliplatinexposition eine Abnahme des FL-Bidproteins festzustellen, die mit dem Erscheinen der tBid-Bande korrelierte. Bemerkenswert war, dass Calpeptin die Bidspaltung effektiv inhibierte.

In beiden Zelllinien waren die aktiven Caspase-3-Fragmente p19 und p17 sowie das Caspase-spezifische PARP-Fragment nach 16 h zu detektieren, doch während in den Kontrollzellen nach 32 h fast der gesamte Caspase-3-Pool aktiviert bzw. PARP gespalten war, nahmen die Caspase-3-Proform und PARP in den Bid kd-Zellen nur geringfügig ab und auch die Prozessierung des p20 Fragments war verzögert.

Durch Vorbehandlung der Zellen mit Calpeptin wurden die Caspase-3-Aktivierung und die PARP-Spaltung signifikant reduziert. Auch der nachfolgend durchgeführte DEVD-Assay bestätigte den Effekt des Calpaininhibitors auf die Aktivität Caspase-3-ähnlicher Caspasen. Konzentrationsabhängig verminderte Calpeptin die DEVDase-Aktivität, die durch 24-stündige Inkubation mit Oxaliplatin induziert worden war. Falls eine direkte, unspezifische Hemmung der Caspasen durch Calpeptin auszuschließen ist, zeigt die signifikante Verminderung der Caspase-3- und der DEVDase-Aktivität nach Calpaininhibierung, dass Oxaliplatin Calpaine früher als Effektorcaspasen aktiviert.

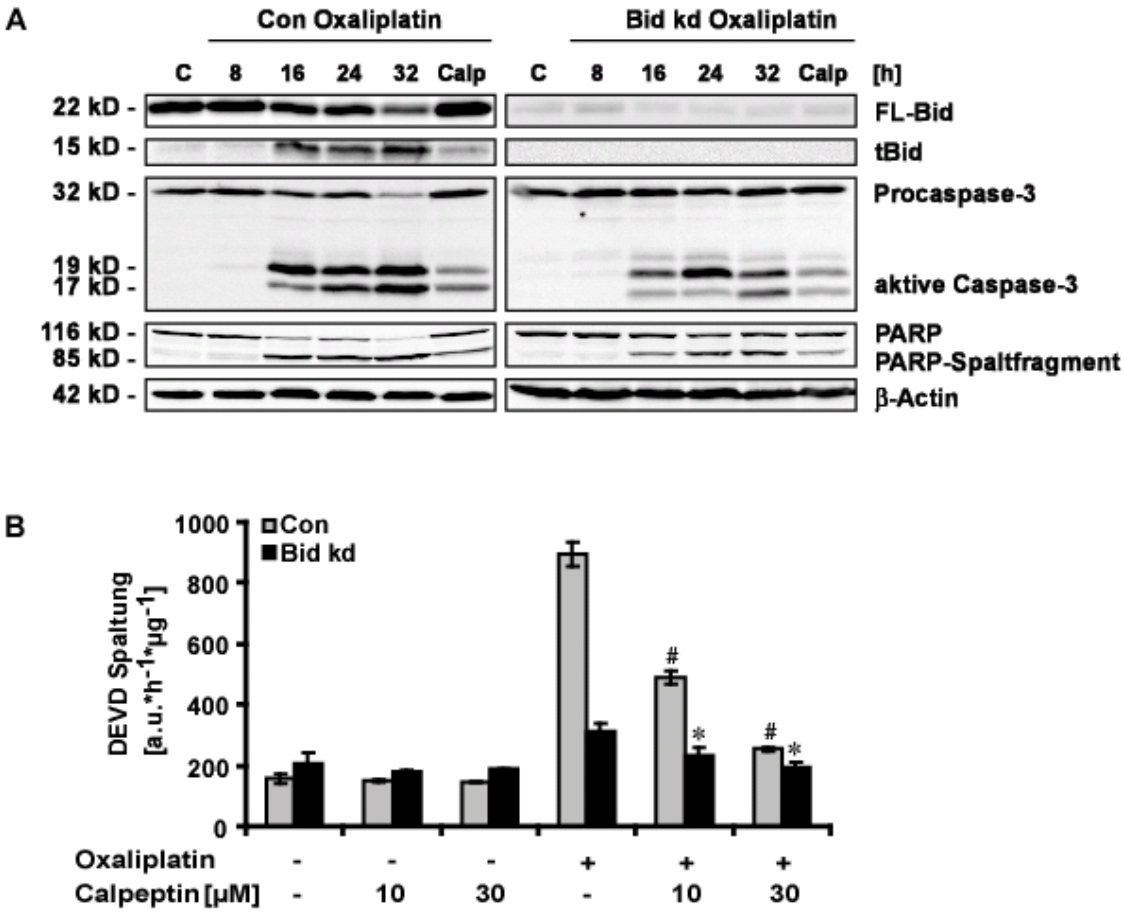

Abbildung 35: Einfluss der Calpaininhibition auf die Oxaliplatin-induzierte Bid- und Caspaseaktivierung. **(A) Western Blot Analyse.** Kontroll- und Bid kd-Zellen wurden zwischen 8- und 32 h mit Oxaliplatin (30 µg/ml) inkubiert. Einem Kontrollansatz (C) wurde nur Lösungsmittel (DMSO) zugesetzt. Calpeptin (Calp, 30 µM) wurde 1 h vor Oxaliplatin zugegeben. Die Kontroll-und Inhibitoransätze wurden 32 h kultiviert. Der Caspase-3-Antikörper erkennt neben der Proform (32 kD) auch die prozessierten Fragmente der großen Untereinheit (20 kD, 19 kD und 17 kD). Auch der Bid- und der PARP-Antikörper detektieren jeweils das ungeschnittene sowie das Protease-gespaltene Protein. Zur internen Kontrolle erfolgte eine Reinkubation der Membranen mit β-Aktin-Antikörper. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse eines zweifach reproduzierten Experiments. **(B) DEVD-Assay.** Beide Zelllinien wurden mit Oxaliplatin (30 µg/ml) allein oder nach einstündiger Vorbehandlung mit Calpeptin (10 bzw. 30 µM) 24 h kultiviert. Kontrollansätze erhielten über den gleichen Zeitraum nur Lösungsmittel oder nur Calpeptin. Die DEVDase-Aktivität der Zellextrakte wurde durch Spaltung des fluoreszierenden Substrats Ac-DEVD-AMC bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte ± SD aus drei separaten Experimenten. * und # markieren signifikante Unterschiede zwischen Oxaliplatin-behandelten Ansätzen mit und ohne Calpaininhibitor ($p<0.05$).

7.2.8 Reihenfolge der Caspase- und Calpainaktivierung nach Oxaliplatin-Exposition

Etablierung der DEVD-FRET-exprimierenden HeLa-Zellen

Um sowohl die Reihenfolge der Calpain - bzw. Caspaseaktivierung als auch die Spezifität des Calpain- und Caspaseinhibitors genauer zu untersuchen, wurden HeLa- bzw. HeLa Bid kd-Zellen verwendet, die stabil mit dem Plasmid pmyc-CFP-DEVD-YFP transfiziert worden waren. Wie auch bei dem bereits in Kapitel 2.2 verwendeten Bid-FRET-Fusionsprotein bilden

CFP und YFP ein FRET-Paar. Beide Fluorophore sind in diesem Fall allerdings nicht durch die Bidsequenz, sondern durch einen aus 18 Aminosäuren bestehenden *linker* getrennt, der die Caspaseschnittstelle DEVD enthält. Sobald DEVDasen aktiviert werden, führt die Spaltung des Fusionsproteins zu einer FRET-Löschung und zu einer Erhöhung der CFP- im Verhältnis zur YFP-Emission (Rehm et al., 2002; Tyas, 2000).

Während die HeLa-DEVD-Zellen von Dr. Markus Morrison zur Verfügung gestellt worden waren, musste eine stabile HeLa Bid kd-DEVD-Zelllinie erst etabliert werden. In Abb. 36 sind die Ausgangszellinien sowie die daraus generierten DEVD-FRET-exprimierenden Klone dargestellt. Die Expression der FRET-Sonde, die im Western Blot mit anti-GFP-Antikörpern nachweisbar ist, beeinflusste die Expression der Bid shRNA nicht. Die Menge des Bidproteins in beiden untersuchten Bid kd-DEVD-Klonen und in den parentalen Bid kd Zellen unterschied sich nicht und blieb deutlich reduziert.

Um nachzuweisen, dass die FRET-Sonde *in vivo* von DEVDasen gespalten wird, wurden die DEVD-FRET-exprimierenden und die parentalen Zelllinien mit TRAIL/CHX inkubiert und die Lysate im Western Blot untersucht. In den HeLa-DEVD-Zellen war nach 2,5-stündiger Inkubation mit dem Todesrezeptor-Stimulus das Fusionsprotein vollständig gespalten, wobei das CFP-Fragment, das aufgrund eines c-Myc-*tags* ein höheres Molekulargewicht besitzt, von dem YFP-Fragment separiert werden konnte. TRAIL ist ein Bid-abhängiger Stimulus (siehe S. 78), weshalb die Prozessierung der FRET-Sonde in den Bid kd-DEVD-Zellen langsamer erfolgte, wie an der deutlich geringeren Abnahme des FL-Fusionsproteins zu sehen ist. Da Caspase-8 DEVDase-Aktivität besitzt und Caspase-3 außerdem direkt aktivieren kann, waren die beiden Spaltfragmente in geringerem Umfang aber auch in den Bid kd-DEVD-Zellen nachweisbar.

Diese Kontrollexperimente zeigen, dass die FRET-Sonde in Bid-profizienten und -kd-Zellen exprimiert und nach der Aktivierung Caspase-3-ähnlicher Caspasen gespalten wird, so dass sie *in vivo* als Reporter für die DEVDase-Aktivität verwendet werden kann.

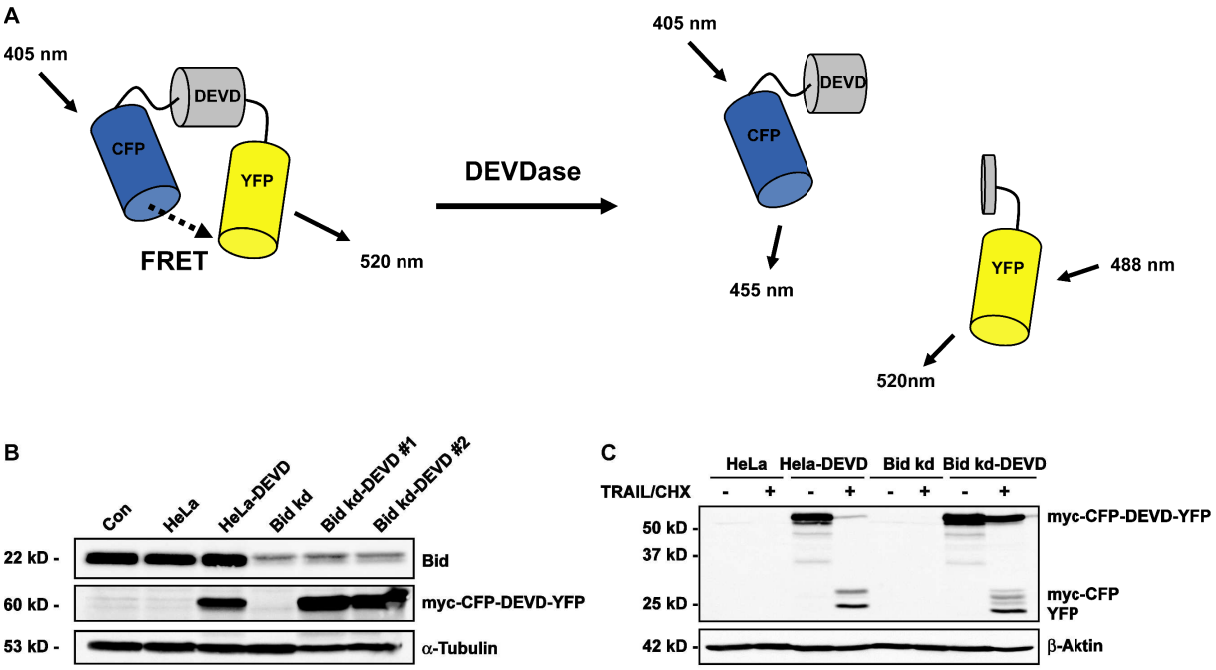

Abbildung 36: Charakterisierung der DEVD-FRET-exprimierenden HeLa-Zellen.
(A) Schematische Abbildung des CFP-DEVD-YFP-Fusionsproteins. Beide Fluorophore sind durch eine aus 18 Aminosäuren bestehende Sequenz, die die Caspaseschnittstelle DEVD enthält, von einander getrennt. Im intakten Fusionsprotein wird die Anregungsenergie des Donors (CFP, bei 405 nm) durch FRET auf den Akzeptor YFP übertragen, dessen emittierte, längerwellige Fluoreszenz bei 520 nm detektiert wurde. Nach Spaltung des Proteins durch DEVDasen sind Donor und Akzeptor zu weit von einander entfernt, so dass FRET nicht mehr stattfinden kann. In der Folge reduziert sich die FRET-Emission bei 520 nm bei gleichzeitiger Erhöhung der CFP-Emission, die bei 455 nm gemessen wurde. **(B) Nachweis der DEVD-FRET-Sonde im Western Blot.** Bid-profiziente und Bid kd-HeLa-Zellen, die stabil mit dem Plasmid pmyc-CFP-DEVD-YFP transfiziert worden waren, wurden zusammen mit den Ausgangszelllinien mittels eines GFP-spezifischen Antikörpers auf die Expression des Fusionsproteins getestet. Rehybridisierungen der Membran mit Bid- bzw. α-Tubulin-Antikörpern dienten zum Überprüfen des Bid kd-Status und als Ladekontrolle. **(C) Spaltung der DEVD-FRET-Sonde nach Aktivierung von DEVDasen.** Parentale HeLa- und HeLa Bid kd-Zellen sowie die daraus generierten DEVD-FRET-exprimierenden Klone wurden 2.5 h mit DMSO oder TRAIL (50 ng/ml) und CHX (1 µg/ml) inkubiert und nach Zelllyse im Western Blot analysiert. Der Nachweis des intakten Fusionsproteins und der Spaltfragmente erfolgte mit einem GFP-Antikörper. Die Inkubation mit β-Aktin-Antikörper diente als Ladekontrolle.

Einfluss der Caspase- bzw. Calpaininhibition auf das mitochondriale Membranpotential und die DEVDase-Aktivität TRAIL-, STS- oder Oxaliplatin-behandelter HeLa-Zellen

Die HeLa-DEVD-Zellen wurden für FACS-Experimente eingesetzt, in denen das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_M$) und die Aktivierung Caspase-3-ähnlicher Caspasen simultan untersucht wurde. Während die DEVDase-Aktivität durch die Abnahme FRET-positiver Zellen und die Zunahme von Zellen mit erhöhter CFP-Emission ermittelt wurde, erfolgte die Bestimmung des $\Delta\Psi_M$ mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM), der spannungsabhängig in der mitochondrialen Matrix akkumuliert (Ehrenberg et al., 1988; Scaduto and Grotyohann, 1999). Kommt es ausgelöst durch MOMP und die folgende Freisetzung der Intermembranproteine zur Verringerung des $\Delta\Psi_M$, wird TMRM nicht mehr in die Mitochondrien aufgenommen. Durch das gleichzeitige Bestimmen

der beiden Parameter in Kombination mit dem Caspase- bzw. Calpaininhibitor sollte die Reihenfolge der Caspase- und der Calpainaktivierung nach Oxaliplatin-Behandlung untersucht werden.
Zur Validierung des Systems wurde zunächst je ein Stimulus mit prämitochondrialer (TRAIL/CHX) bzw. postmitochondrialer (STS) Caspaseaktivierung vermessen.

TRAIL induziert eine prämitochondriale Caspaseaktivität

Eine vierstündige Behandlung der HeLa-DEVD-Zellen mit TRAIL/CHX induzierte die Spaltung der DEVD-FRET-Sonde und eine signifikante Abnahme TMRM-positiver Zellen. Beides konnte durch eine Koinkubation der Zellen mit zVAD-fmk verhindert werden, während eine Vorbehandlung mit Calpeptin keine Protektion bot.
Die Western Blot Analyse TRAIL/CHX-behandelter HeLa- und HeLa-Bcl-2-Zellen bestätigte nochmals den Ablauf des apoptotischen Signalwegs. Caspase-8, die Initiatorcaspase nach Todesrezeptor-Stimulation, wurde noch vor der mitochondrialen Depolarisierung aktiviert, weshalb eine signifikante Prozessierung auch in den HeLa-Bcl-2-Zellen erfolgte. Gleiches galt für das Caspase-8-Substrat Bid (Falschlehner et al., 2007).
Da in den Bcl-2-überexprimierenden Zellen der mitochondriale *feedback loop* unterbrochen war, wie das Fehlen aktiver Caspase-9-Fragmente belegte, erfolgte die Spaltung von Caspase-8 und Bid allerdings langsamer als in den parentalen HeLa-Zellen.
Die Caspase-3-Prozessierung in den HeLa-Bcl-2-Zellen war drastisch reduziert, weil sie nur direkt durch Caspase-8, nicht aber durch das Apoptosom aktiviert werden konnte (Scaffidi et al., 1998).
zVAD-fmk verhinderte durch Caspase-8-Inhibierung die Initiation der gesamten Kaskade und damit auch die Depolarisierung der Mitochondrien, während Calpeptin weder die Bid- noch die Caspasespaltung beeinflusste.
Diese Ergebnisse bestätigen, dass Caspase-8 nach TRAIL-Exposition *upstream* von MOMP aktiviert wird. Da Calpeptin außerdem keinen Einfluss auf die mitochondriale Depolarisierung oder die Caspaseaktivierung hat, ist weder eine unspezifische Caspasehemmung durch Calpeptin in den verwendeten Konzentrationen noch ein Beitrag der Calpaine zur TRAIL-induzierten Apoptose in HeLa-Zellen nachweisbar.

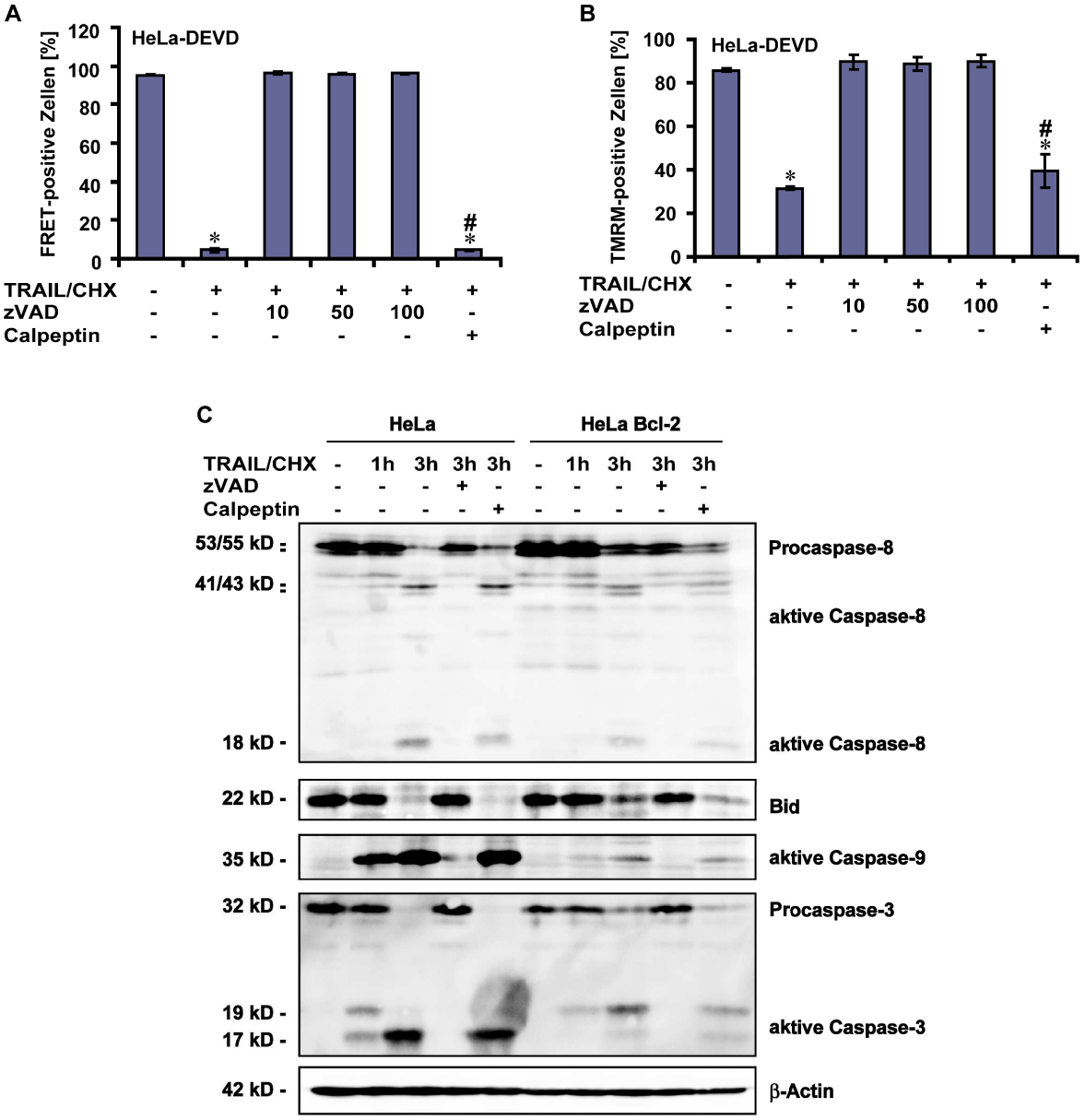

Abbildung 37: Prämitochondriale Caspaseaktivierung nach Todesrezeptor-Stimulierung.
(A+B) Nur Caspaseinhibition verhindert die TRAIL-induzierte FRET-Löschung und die mitochondriale Depolarisierung. HeLa-DEVD-Zellen wurden 4 h in Gegenwart von TRAIL (50 ng/ml)/CHX (1 µg/ml) mit oder ohne Zugabe von Caspase- oder Calpaininhibitoren kultiviert. zVAD-fmk (10, 50 oder 100 µM) wurde gleichzeitig, Calpeptin (30 µM) 1 h vor Todesrezeptor-Aktivierung zugegeben. 1 h vor Beendigung der Inkubation wurden alle Ansätze mit 90 nM TMRM versetzt. In der anschließenden FACS-Analyse wurde die DEVDase-Aktivität durch die Abnahme FRET-positiver Zellen ermittelt (A), während der TMRM-Nachweis zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials diente (B). Jeweils 10 000 Zellen wurden ausgewertet. Die Daten sind Mittelwerte ± SD eines repräsentativen Experiments (n = 3). * signifikant zur unbehandelten Kontrolle. # kein signifikanter Unterschied zur TRAIL/CHX-behandelten Probe ($p<0.05$). **(C) Bcl-2-Überexpression inhibiert die TRAIL-induzierte Caspase-9-, aber nicht die Caspase-8- und Bidaktivierung.** HeLa- und Hela-Bcl-2-Zellen wurden für 1 h oder 3 h mit TRAIL (50 ng/ml)/CHX (1 µg/ml) behandelt. Eine Kontrolle enthielt nur Lösungsmittel (DMSO). Die Zugabe von zVAD-fmk (100 µM) erfolgte gleichzeitig mit dem Todesrezeptor-Stimulus, Calpeptin (30 µM) wurde 1 h vorher hinzugefügt. Die Gesamtzellextrakte wurden im Western Blot auf die Abnahme des FL-Bidproteins und die Prozessierung der Caspasen-8, -9 und -3 untersucht. Der β-Aktin-Nachweis diente als interne Kontrolle.

Postmitochondriale Caspaseaktivierung nach STS-Behandlung

Die Ergebnisse in Abb. 19 hatten ergeben, dass Bid an der STS-induzierten Apoptose nicht beteiligt ist. Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials und der FRET-Spaltung nach 6-stündiger STS-Behandlung mit gleichzeitiger Caspaseinhibition bestätigen außerdem, dass der Proteinkinase-Inhibitor Caspasen erst postmitochondrial aktiviert, da zVAD-fmk zwar konzentrationsabhängig die durchflusszytometrisch gemessene Spaltung der DEVD-FRET-Sonde, nicht aber den Anteil der Zellen mit niedrigem $\Delta\Psi_M$ veränderte. Dies bedeutet, dass eine Caspase-abhängige Bidspaltung in HeLa-Zellen nach STS-Exposition erst in einem postmitochondrialen *feedback loop* erfolgen kann, der für eine effektive Permeabilisierung der Mitochondrien allerdings bedeutungslos ist.

Wie auch in der TRAIL-induzierten Apoptose interferierte Calpeptin in STS-behandelten Bid kd- und Kontrollzellen weder mit der DEVD-Spaltung noch der mitochondrialen Depolarisierung. Dies zeigt einerseits, dass konventionelle Calpaine zum STS-induzierten Zelltod in HeLa-Zellen nicht beitragen. Andererseits ist damit eine unspezifische Caspaseinhibierung durch den Calpaininhibitor auszuschließen. Auf die bisherigen Ergebnisse mit Oxaliplatin übertragen bedeutet es zudem, dass Calpaine früher als Caspasen aktivert werden, da eine Calpaininibition auch die Caspaseprozessierung vermindert (siehe Abb. 35 und Daten nicht gezeigt).

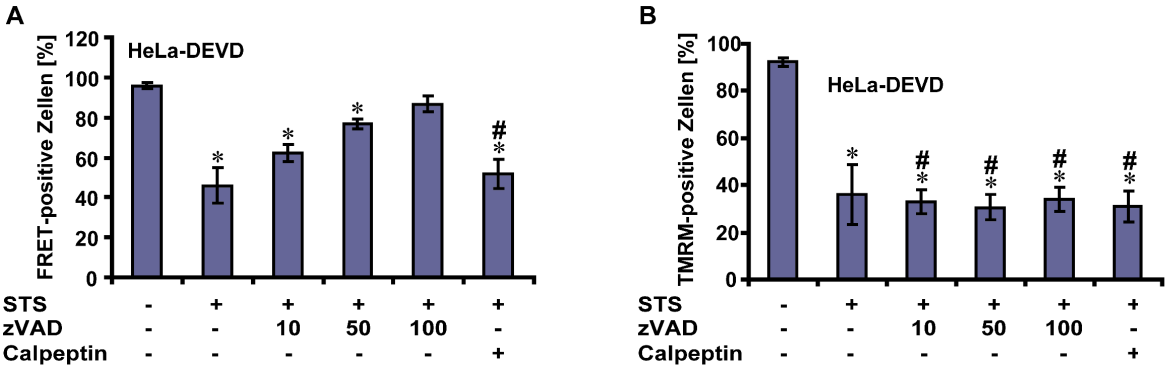

Abbildung 38: STS aktiviert Caspasen postmitochondrial.
HeLa-DEVD-Zellen wurden 6 h mit STS behandelt. Einige Kulturen wurden gleichzeitig mit zVAD-fmk (10, 50 oder 100 µM) koinkubiert. Die Zugabe des Calpaininhibitors Calpeptin (30 µM) erfolgte 1 h vor der STS-Exposition. TMRM (90 nM) wurde dem Kulturmedium 1 h vor der Zellernte hinzugefügt. Die Abnahme FRET-positiver Zellen als Maß für die DEVDase-Aktivität (A) sowie die Quantifizierung TMRM-positiver Zellen als Indikator für $\Delta\Psi_M$ (B) wurde durchflusszytometrisch gemessen. Jeweils 10 000 Zellen wurden ausgewertet. Die Daten sind Mittelwerte ± SD eines repräsentativen Experiments (n = 3). * signifikant zur unbehandelten Kontrolle. # kein signifikanter Unterschied zur STS-behandelten Probe ($p<0.05$).

Oxaliplatin aktiviert Calpaine früher als Caspasen

Die Caspaseaktivierung erfolgt postmitochondrial

Die Experimente in Abb. 31 hatten gezeigt, dass die Caspaseaktivierung in Oxaliplatin-behandelten HeLa-Zellen durch die Überexpression des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins verhindert werden kann. Zur Bestätigung der postmitochondrialen Caspaseaktivierung wurden HeLa-DEVD-Zellen mit Oxaliplatin und verschiedenen zVAD-fmk-Konzentrationen inkubiert.

Wie die FACS-Analyse zeigte, wiesen 24 h nach Behandlungsbeginn nur noch 40% der Zellen eine intakte DEVD-FRET-Sonde auf. Erwartungsgemäß ließ sich die Quote durch Zugabe des Caspaseinhibitors zVAD-fmk steigern und erreichte bei Verwendung der höchsten Konzentration (100 µM) mit 84% wieder das Ausgangsniveau. zVAD-fmk konnte dagegen die Anzahl TMRM-positiver Zellen, die nach Oxaliplatinexposition auf 40% gesunken war, nicht erhöhen. So konnte auch mit Hilfe eines zweiten Modells bestätigt werden, dass in der Oxaliplatin-induzierten Apoptose Caspasen erst *downstream* von MOMP aktiviert werden.

Die Calpainaktivierung erfolgt upstream der Mitochondrien

Die Experimente in STS- und TRAIL-behandelten HeLa-DEVD-Zellen hatten eine unspezifische Caspasehemmung durch Calpeptin ausgeschlossen (Abb. 37 und 38), so dass die gleichzeitige Inhibierung der Caspasen durch Calpeptin auf eine übergeordnete Position der Calpaine hinwies.

Um zu untersuchen, ob eine Calpaininhibition die Oxaliplatin-induzierte $\Delta\Psi_M$ Depolarisierung beeinflusst, wurden HeLa-DEVD- und Bid kd-DEVD-Zellen durchflusszytometrisch vermessen, die zuvor mit Oxaliplatin und in einigen Ansätzen zusätzlich mit Calpeptin oder zVAD-fmk behandelt worden waren. Nach 24-stündiger Exposition mit dem Chemotherapeutikum allein besaßen 63% der Bid-depletierten Zellen, aber nur noch 36% der Bid-profizienten Zellen eine intakte DEVD-FRET-Sonde. Der Bid kd verringerte auch die $\Delta\Psi_M$ Depolarisierung signifikant. 60% TMRM-positiven Zellen in den Kulturen mit verminderter Bidexpression standen nur 33% in der HeLa-DEVD-Linie gegenüber. Die Zugabe des Caspaseinhibitors verringerte erwartungsgemäß die FRET-Löschung in beiden Zelllinien signifikant, konnte aber die Reduktion des $\Delta\Psi_M$ nicht beeinflussen. Die Ergebnisse zeigen, dass Bid an der Permeabilisierung der Mitochondrien beteiligt ist, eine Caspase-vermittelte Bidspaltung im *feedback loop* dazu aber nicht beiträgt.

Calpeptin dagegen, das die Oxaliplatin-induzierte Caspase-3-Aktivierung bereits im Western Blot und im DEVD-Assay reduziert hatte (siehe Abb. 35), verminderte die Spaltung des DEVD-Fusionsproteins und erhöhte außerdem die Zahl TMRM-positiver Zellen. Interessanterweise fiel die Protektion durch die Calpaininhibierung nur in den Bid-profizienten Zellen signifikant aus. Diese Daten belegen eine prämitochondriale Calpainakivierung durch Oxaliplatin und weisen darauf hin, dass Calpaine, zumindest indirekt, an der Bidaktivierung beteiligt sind.

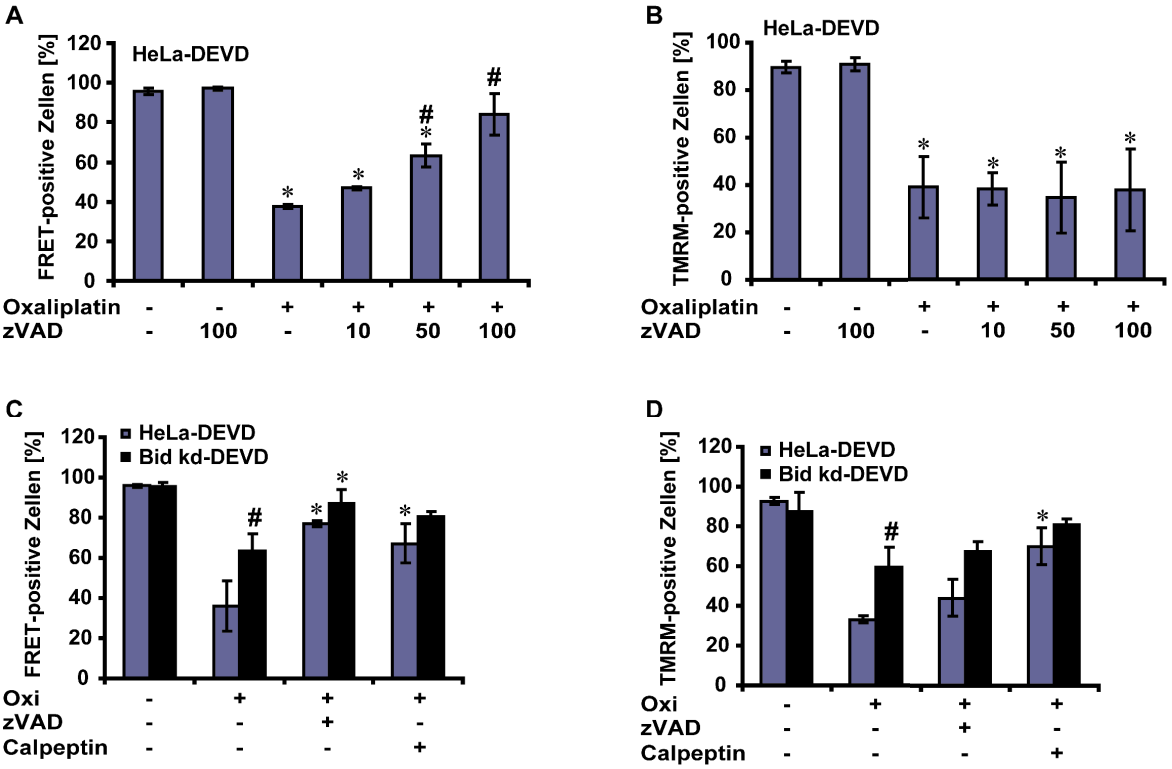

Abbildung 39: Oxaliplatin aktiviert Calpaine früher als Caspasen.
(A+B) Caspaseinhibition verhindert die Oxaliplatin-induzierte Spaltung der DEVD-FRET-Sonde, aber nicht die Depolarisierung des $\Delta\Psi_M$. HeLa-DEVD-Zellen wurden 24 h in Gegenwart von Oxaliplatin (30 µg/ml) mit oder ohne Zusatz von zVAD-fmk (10, 50 oder 100 µM) kultiviert. 1 h vor dem Beginn der Zellernte wurde zusätzlich TMRM (90 nM) zugegeben. Die Abnahme FRET-positiver Zellen als Maß für die DEVDase-Aktivität (A) sowie die Quantifizierung TMRM-positiver Zellen als Indikator für $\Delta\Psi_M$ (B) wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Jeweils 10 000 Zellen wurden ausgewertet. Die Daten sind Mittelwerte ± SD aus drei separaten Experimenten. * signifikant zur unbehandelten Kontrolle. # signifikant zur Oxaliplatin-behandelten Probe ($p<0.05$).
(C+D) Calpaininhibition reduziert die Oxaliplatin-induzierte Spaltung der DEVD-FRET-Sonde und die Depolarisierung des $\Delta\Psi_M$ signifikant. HeLa- und Bid kd-DEVD-Zellen wurden 24 h mit Oxaliplatin (Oxi, 30 µg/ml) behandelt. zVAD-fmk (100 µM) wurde gleichzeitig, Calpeptin (30 µM) 1 h vor der Oxaliplatinexposition hinzugefügt. Die Inkubation mit TMRM und die anschließende FACS-Analyse erfolgten wie unter (A+B) beschrieben. # markiert signifikante Unterschiede zwischen Bid kd- und Kontrollzellen. * signifikant zur Oxaliplatin-behandelten Probe ($p<0.05$).

7.2.9 Die Bidmutante D59A wird nach Todesrezeptor-Stimulation nicht gespalten

Wie in den Experimenten des vorigen Abschnitts gezeigt, werden Calpaine deutlich früher als Caspasen, nämlich bereits vor der $\Delta\Psi_M$ Depolarisierung, aktiviert. Da der protektive Effekt

des Calpaininhibitors in den Bid kd-Zellen signifikant geringer ausfällt, könnte es sich um eine direkte Interaktion zwischen Bid und Calpainen handeln. In Abb. 35 konnte bisher nur gezeigt werden, dass Calpeptin die Generierung des tBid-Fragments inhibiert. Um dies genauer zu untersuchen, wurden Bid kd-Zellen mit induzierbaren, adenoviralen Vektoren transduziert, die entweder murines, FLAG-markiertes wt-Bid oder die Bidmutante D59A kodieren. Bei letzterer führt der Aminosäure-Austausch (D59A) zur Mutation der wichtigsten Caspaseschnittstelle des Bidmoleküls, ohne die beiden Calpainspaltstellen (Y^{54} und G^{70}) zu beeinflussen (siehe S. 21) (Chen et al., 2001; Gil-Parrado et al., 2002; Sarig et al., 2003).

Wie Abb. 40 zeigt, führt die Ko-Transduktion der Bid kd-Zellen mit einem der Bidkonstrukte und dem reversen tet-Transaktivator nach Doxyzyklininduktion zur Expression des Bidproteins, das aufgrund der FLAG-Markierung im Western Blot von endogenem Bid separiert werden kann.

Um die Caspaseresistenz der D59A-Mutante zu überprüfen, wurde wt- oder D59A-Bid in Bid kd-Zellen überexprimiert, die Kulturen mit TRAIL/CHX inkubiert und im Western Blot untersucht. Nach Doxyzyklinstimulation war eine deutliche Expression des exogenen Bidproteins nachweisbar. Zeigten die Ansätze, die mit wt-Bid transduziert worden waren, nach einstündiger TRAIL/CHX-Exposition eine deutliche Abnahme der Bidbande, so war das FL-Protein nach weiteren zwei Stunden gar nicht mehr detektierbar. Die Spaltung von Bid konnte aber durch Koinkubation mit zVAD-fmk inhibiert werden. Erwartungsgemäß führte die TRAIL/CHX-Behandlung, die eine Caspase-8- bzw. eine Caspase-3-abhängige Bidspaltung induziert (Falschlehner et al., 2007), unabhängig von der Inkubationsdauer nicht zu einer Verminderung des mutanten FL-Bidproteins.

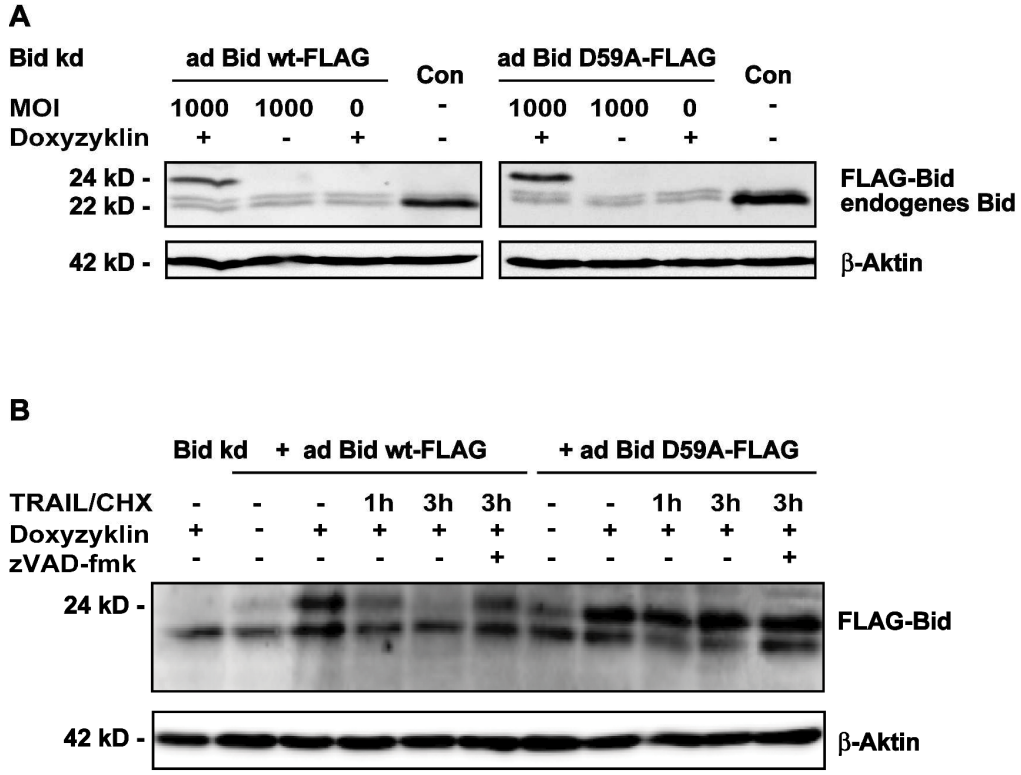

Abbildung 40: Kontrollinfektionen mit den Bid-kodierenden Adenoviren.
(A) Nachweis der Tetrazyklin-induzierbaren Expression von wt- und mutantem FLAG-Bid in HeLa-Zellen. Bid kd-Zellen wurden nicht oder mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 1000 mit den wt-Bid oder den Bid (D59A) kodierenden Viren und dem reversen tet-Transaktivator (rtTA)-Virus infiziert. Bei der Hälfte der transduzierten Ansätze wurde die Expression des rekombinanten Bids durch Zugabe von Doxyzyklin (1 µg/ml) induziert. Untransduzierte Kontrollansätze wurden auch mit Doxyzyklin inkubiert. 6 h nach Doxyzyklinstimulation wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und im Western Blot auf die Expression des rekombinanten und des endogenen Bidproteins untersucht. In jeweils einer Spur wurden Lysate untransduzierter, Bid-profizienter HeLa-Zellen (Con) mit aufgetrennt. Der β-Aktin-Nachweis diente als interne Kontrolle. **(B) Nur das rekombinante wt-Bid wird nach Todesrezeptor-Aktivierung gespalten.** Bid kd-Zellen wurden wie in (A) infiziert. Kontrollansätze wurden zwar infiziert, aber nicht mit Doxyzyklin induziert oder blieben gänzlich untransduziert. 6 h nach Doxyzyklinstimulation wurden einige Kulturen für die angegebene Dauer mit TRAIL (50 ng/ml)/CHX (1 µg/ml) mit oder ohne Zusatz von zVAD-fmk (100 µM) inkubiert. Die Expression der rekombinanten Bidproteine und die TRAIL-induzierte Abnahme der FL-Form wurden im Western Blot detektiert. Die Rehybridisierung der Membranen mit β-Aktin-Antikörper diente als Ladekontrolle.

7.2.10 Die Spaltung der Bidmutante D59A nach Oxaliplatinexposition wird durch den Calpaininhibitor reduziert

Nachdem die Funktionalität der beiden Bidkonstrukte bestätigt worden war, wurden sie erneut in den Bid kd-Zellen exprimiert und die Kulturen anschließend 24 h mit Oxaliplatin behandelt. Einige Ansätze wurden zusätzlich mit zVAD-fmk oder Calpeptin koinkubiert. Bemerkenswert war, dass tBid, im Gegensatz zur Behandlung mit TRAIL/CHX, nicht nur in den Proben mit wt-Bid, sondern auch in denen der Bidmutante nachweisbar war. Der Caspaseinhibitor zVAD-fmk konnte die Spaltung der beiden Bidkonstrukte nicht verhindern. Eine Vorbehandlung mit Calpeptin führte dagegen zu einer signifikanten Reduktion des

Bidfragments, so dass Calpaine an der Oxaliplatin-induzierten Spaltung von Bid beteiligt sind.

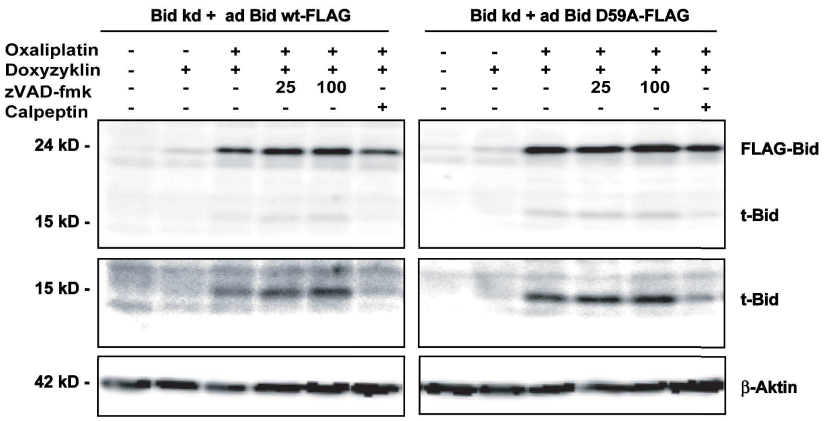

Abbildung 41: Die Oxaliplatin-induzierte Spaltung des wt- und des mutanten Bidproteins wird durch Calpain-, nicht durch Caspaseinhibition, reduziert.
Bid kd-Zellen wurden mit den wt-Bid- oder den D59A-Bid-kodierenden Viren und dem rtTA-Virus infiziert und die Bidexpression durch Zugabe von Doxyzyklin (1 µg/ml) induziert. Kontrollansätze blieben untransduziert oder wurden nicht induziert. 6 h nach Doxyzyklinstimulation wurden einige Kulturen 1 h mit Calpeptin (30 µM) inkubiert, gefolgt von einer 24-stündigen Oxaliplatin-Behandlung (30 µg/ml) mit oder ohne Zusatz von zVAD-fmk (25 oder 100 µM). Der Nachweis der rekombinanten Bidproteine und des Oxaliplatin-induzierten tBid-Fragments erfolgte mittels Western Blot Analyse. Die Rehybridisierung der Membranen mit β-Aktin-Antikörper diente als interne Kontrolle. Eine Wiederholung des Experiments lieferte vergleichbare Resultate.

7.2.11 Keine Unterschiede zwischen wt- und D59A-Bid-exprimierenden HeLa-Zellen in der Caspaseaktivierung nach Oxaliplatin-Behandlung

Da Oxaliplatingabe die Prozessierung des wt- und des D59A-Bidproteins induzierte, sollte im Folgenden die Kinetik untersucht werden, mit der die beiden Proteine nach Behandlung mit dem Zytostatikum Caspasen aktivieren. Die Western Blots zeigten, dass zwar die Bande der jeweiligen Bidvariante nach 32 h Doxyzyklininduktion deutlich nachweisbar war, die Überexpression des BH3-only Proteins allein aber nicht zur Caspaseaktivierung ausreichte.
Wurden die transduzierten Zellen zusätzlich mit Oxaliplatin inkubiert, waren sowohl in den Proben mit wt-Bid als auch in den Ansätzen mit der Mutante nach 12 h Spaltfragmente der Caspasen-9, -3 und -8 nachweisbar. Da das mutante Bid, bis auf Caspase-10, von Caspasen nicht gespalten werden kann, weisen diese Daten darauf hin, dass Caspase-prozessiertes Bid für die Oxaliplatin-induzierte Aktivierung der Caspasekaskade nicht benötigt wird.

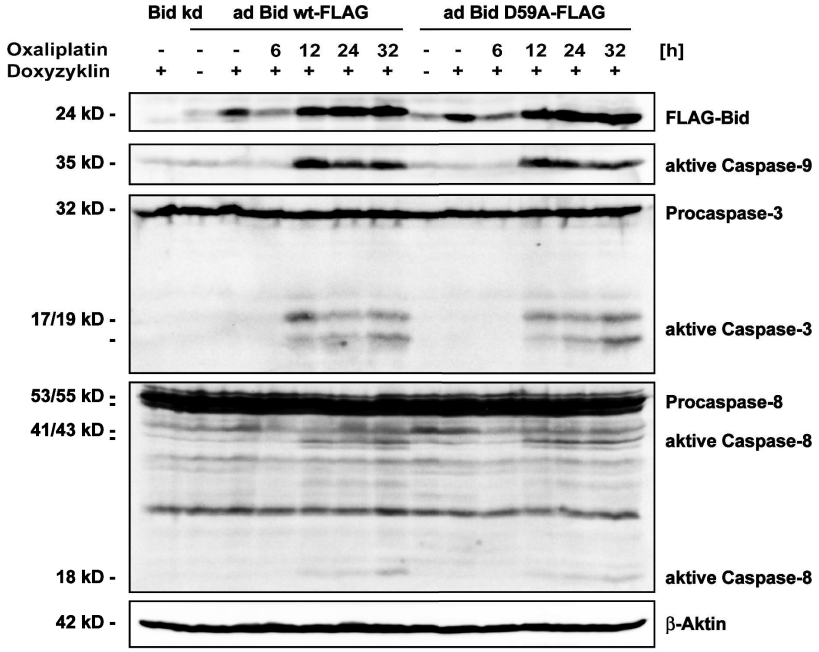

Abbildung 42: Keine Unterschiede zwischen wt- und D59A-Bid überexprimierenden HeLa-Zellen in der Caspaseaktivierung nach Oxaliplatin-Behandlung.
Bid kd-Zellen wurden mit den wt- oder mut-Bid kodierenden Viren und dem rtTA-Virus infiziert und die Bidexpression durch Zugabe von Doxyzyklin (1 µg/ml) induziert. Kontrollansätze blieben untransduziert oder wurden nicht induziert. 6 h nach Doxyzyklinstimulation erfolgte die Zugabe von Oxaliplatin (30 µg/ml) für die angegebenen Zeiten. Der Nachweis der rekombinanten Bidproteine und der Caspasen-8, -9 und -3 erfolgte mittels Western Blot Analyse. Die Exposition der Membranen mit β-Aktin-Antikörper diente als Ladekontrolle. Eine Wiederholung des Experiments lieferte vergleichbare Resultate.

7.2.12 Bid und Puma sind an der Oxaliplatin-induzierten Caspaseaktivierung in HeLa-Zellen beteiligt

Wie in den vorigen Abschnitten gezeigt, ist Bid in HeLa-Zellen ein notwendiger Bestandteil der proapototischen Signalkaskade, die von Oxaliplatin induziert wird. Eine Verminderung der Bidexpression durch shRNA reduziert die $\Delta\Psi_M$ Depolarisierung, die Caspaseaktivierung und den Zelltod und fördert die Proliferation signifikant, kann diese Ereignisse jedoch nicht vollständig unterdrücken. Puma ist ein weiteres BH3-only Protein, das nach DNA-Schädigung aktiviert werden kann (Han et al., 2001; Villunger et al., 2003). Ob es in dem hier verwendeten Modellsystem eine Rolle spielt, sollte im Folgenden geklärt werden.

Puma wird im Gegensatz zu Bid hauptsächlich transkriptionell reguliert (Han et al., 2001; Nakano and Vousden, 2001; Yu et al., 2001), weshalb zunächst untersucht wurde, ob Oxaliplatin die Expression des Puma-Gens induzieren kann. Nach einer 4- bis maximal 24-stündigen Inkubation der Bid kd- und Kontrollzellen mit Oxaliplatin wurden die erhaltenen Lysate mittels *real time* RT-PCR auf die Expression von Puma-mRNA getestet. Nach 16 h war in beiden Zelllinien eine signifikante Zunahme zu detektieren, die nach weiteren 8 h nochmals gesteigert war. Eine Koinkubation der Zellen mit Oxaliplatin und zVAD-fmk, die

eine Caspase-vermittelte Degradierung des internen RNA-Standards (β-Aktin und GAPDH) verhindern sollte, wich von den erhaltenen Ergebnissen nicht ab (Daten nicht gezeigt). Eine Bestätigung der Befunde auf Proteinebene war nicht möglich, da Probleme mit der Spezifität des Puma-Antikörpers nicht zufriedenstellend gelöst werden konnten.

Um die funktionelle Bedeutung der gesteigerten Expression von Puma zu überprüfen, wurde eine Puma-spezifische siRNA abgeleitet und für transiente Transfektionsexperimente eingesetzt. Wie in Abb. 43 zu sehen ist, ergab die *real time* PCR-Analyse beider Zelllinien sowohl nach 24- als auch nach 48-stündiger Inkubation mit der siRNA eine Reduktion der Puma-mRNA um 50-70%. Die Effekte der Kontroll siRNA dagegen waren uneinheitlich und führten in den Kontrollzellen zu einer geringen Erhöhung, in den Bid kd-Zellen dagegen zu einer 20%igen Verminderung der Pumaexpression. Im Vergleich zu der Kontroll siRNA war die Expression von Puma in den Ansätzen mit der spezifischen siRNA aber in beiden Linien um mindestens 50% reduziert, so dass Effekte nachweisbar sein sollten.

24 h nach der Transfektion beider HeLa-Zelllinien mit einer der beiden siRNAs wurden die Ansätze für weitere 18 h mit Oxaliplatin oder Lösungsmittel kultiviert. Im anschließend durchgeführten DEVD-Assay zeigten die Bid kd-Zellen unabhängig von der verwendeten siRNA eine geringere Aktivität Caspase-3-ähnlicher Caspasen als die Bid-profizienten Zellen. Bemerkenswerter aber war, dass die Puma-siRNA den Bid kd-Zellen zusätzliche Protektivität verleihen konnte und auch in den Kontrollzellen die DEVDase-Aktivität signifikant reduzierte. Diese Ergebnisse zeigen, dass Oxaliplatin Puma transkriptionell aktiviert und dass Bid und Puma in HeLa-Zellen gemeinsam zur Oxaliplatin-induzierten Effektorcaspase-Aktivierung beitragen.

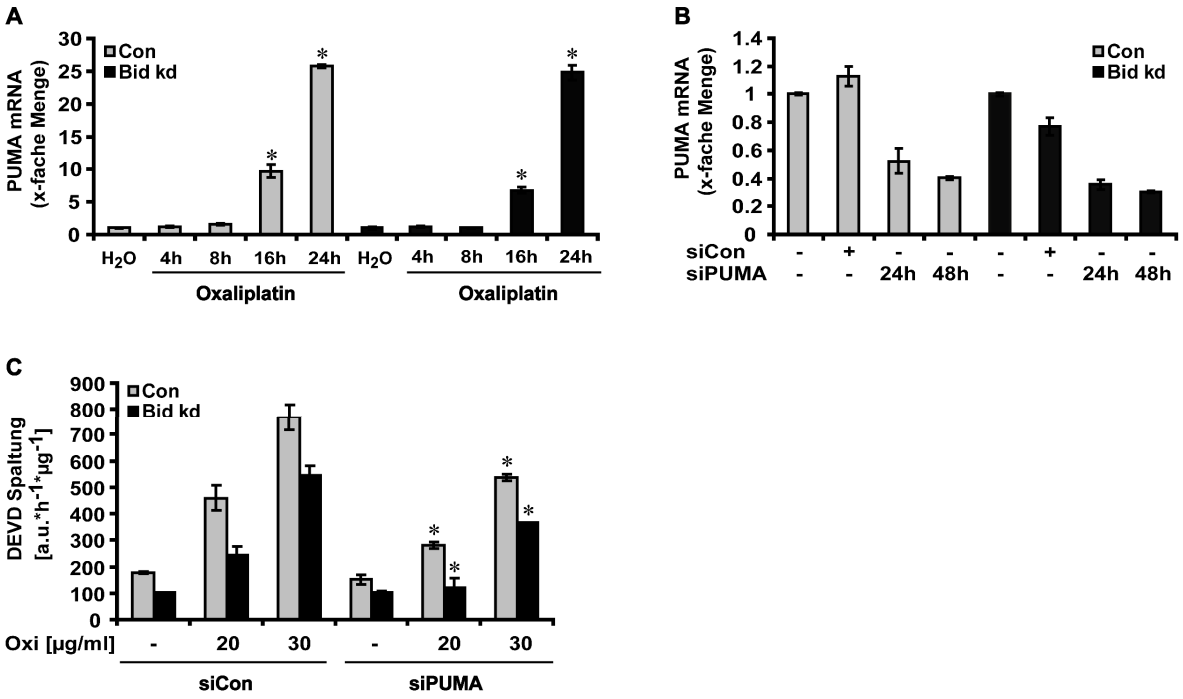

Abbildung 43: Puma und Bid vermitteln die Oxaliplatin-induzierte Caspaseaktivierung in HeLa-Zellen.
(A) Oxaliplatin erhöht die Expression der Puma-mRNA. Kontroll- und Bid kd-Zellen wurden 24 h mit Lösungsmittel (H_2O) oder 4 h bis maximal 24 h mit Oxaliplatin (30 µg/ml) behandelt. Die Expression der Puma-mRNA wurde mittels *real time* RT-PCR bestimmt und ist auf die Expression des *house keeping*-Gens GAPDH bezogen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n = 3). * markiert signifikante Unterschiede zur Lösungsmittel-behandelten Kontrolle ($p<0.05$). **(B) siRNA-vermittelte, transiente Reduktion der Puma-Expression.** Beide Zelllinien wurden mit Puma-spezifischer (siPUMA)- oder Kontroll-siRNA (siCon) transient transfiziert. 24 h bzw. 48 h später wurden *real time* RT-PCR-Analysen zur relativen Quantifizierung der Puma-mRNA durchgeführt. Als Referenz wurde GAPDH-mRNA amplifiziert. **(C) Puma- und Bid kd reduzieren die Oxaliplatin-induzierte DEVDase-Aktivität.** 24 h nach Transfektion der Puma-spezifischen bzw. der Kontroll-siRNA wurden die Bid kd- und die Kontrollzellen 24 h mit Oxaliplatin (20 oder 30 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde die Caspase-3-ähnliche Aktivität der Zellextrakte durch Spaltung des fluoreszierenden Tetrapeptids Ac-DEVD-AMC bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte ± SD aus drei separaten Experimenten. * signifikante Unterschiede zwischen siCon- und siPUMA-transfizierten Proben ($p<0.05$).

V. Diskussion

Apoptose ist ein intrinsisches Zelltodprogramm, mit dem vielzellige Organismen überflüssige, defekte oder entartete Zellen kontrolliert beseitigen können. Um der Eliminierung zu entgehen, zählt der Erwerb von Apoptoseresistenz zu den Voraussetzungen der Tumorgenese, während therapeutische Interventionen häufig auf die (Re-)Aktivierung apoptotischer Signalkaskaden in den Tumorzellen zielen.

Wichtige Regulatoren der mitochondrialen (intrinsischen) Apoptose sind die Proteine der Bcl-2-Familie, die aus pro- und antiapoptotischen Mitgliedern besteht. Zu den proapoptotischen Bcl-2-Proteinen gehören die Multidomänenproteine Bax und Bak sowie die BH3-only Proteine. Letztere werden durch zellulären Stress aktiviert und translozieren zu den Mitochondrien, wo sie die Bax- und Bak-abhängige Freisetzung Caspase-aktivierender Proteine aus dem Intermembranraum induzieren (Youle and Strasser, 2008).

Bid zählt zu den potentesten BH3-only Proteinen, da es die Permeabilisierung der Mitochondrien nicht nur durch eine Neutralisierung aller antiapoptotischen Bcl-2-Proteine, sondern auch durch die direkte Aktivierung von Bax und Bak effizient fördert (Cartron et al., 2004; Chen et al., 2005; Kim et al., 2006; Kuwana et al., 2005). Ziel dieser Arbeit war es, in einem humanen Modellsystem, in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa D98, den Beitrag von Bid zur Apoptose zu untersuchen, die durch zellulären Stress, konventionelle sowie neuartige Chemotherapeutika induziert wird.

1 Bid vermittelt die Todesrezeptor-induzierte Apoptose in HeLa-Zellen

Bid kann bereits als ungeschnittenes Protein aktiv sein (Luo et al., 1998), die proapoptotische Aktivität wird aber durch Proteasespaltung signifikant gesteigert (siehe S. 21) (Madesh et al., 2002), so dass es nach Caspase-, Kathepsin-, Calpain- oder Granzymaktivierung als spezifischer Vermittler diverser Stress-Signale (u. a. Ischämie, lysosomale Schädigung, zytotoxische T-Lymphozyten) dient (Barry et al., 2000; Chen et al., 2001; Plesnila et al., 2001; Stoka et al., 2001). Da Bid auch von den Caspasen-8 und -10 gespalten wird, ist das trunkierte Bid als einziges BH3-only Protein in der Lage, den Todesrezeptor-vermittelten (extrinsischen) mit dem intrinsischen Apoptoseweg zu verbinden (Gross et al., 1999; Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Die Amplifizierung der Caspasekaskade über die Mitochondrien ist in den sog. Typ II-Zellen, zu denen auch Zervixkarzinomzellen gehören, für eine effiziente

Apoptoseinduktion nach Todesrezeptor-Stimulation notwendig (Engels et al., 2000; Scaffidi et al., 1998).

Wie die Experimente dieser Arbeit bestätigen, reduziert der Bid kd die Fas- und TRAIL-induzierte Caspaseaktivierung und Apoptose und erhöht die Proliferationsfähigkeit nach Todesrezeptor-Stimulation in HeLa-Zellen signifikant (siehe Abb. 15-17). Dabei weist der in Abb. 16 dargestellte Caspase-3-Western Blot auf den Mechanismus hin, der in Bid-depletierten Zellen die Aktivierung der Effektorcaspasen verhindert.

Nach anti-Fas- und in geringerem Umfang auch nach TRAIL-Behandlung endet die Caspase-3-Prozessierung in Bid kd-Zellen mit der Generierung des p20-Fragments der großen Untereinheit (Abb. 16). Dies zeigt, dass zwar eine Caspase-8- und -10-abhängige Spaltung der Caspase-3 an D^{175} in die große und kleine Untereinheit erfolgt (Fernandes-Alnemri et al., 1996; Stennicke et al., 1998), aber dass der dabei generierte p20/p12-Komplex katalytisch inaktiv ist, da die autokatalytische Prozessierung der großen Untereinheit zu den p19- und p17-Fragmenten unterbleibt (siehe auch Abb. 2). Dies wird durch das Fehlen des 89 kD-PARP-Spaltprodukts in Fas-stimulierten Bid kd-Zellen bestätigt (Abb. 16), das durch Effektorcaspase-abhängige Prozessierung entsteht (Slee et al., 2001).

Da einerseits die p20-Prozessierung in Bid-profizienten Zellen nicht gehemmt wird (Abb. 16), andererseits ein rekombinanter p20/p12-Komplex *in vitro* intrinsische Aktivität besitzt (Schlegel et al., 1996; Stennicke et al., 1998), weist die Arretierung der Caspase-3-Prozessierung in Bid-depletierten Zellen auf intrazelluläre Caspaseinhibitoren hin, die in Bid-profizienten Zellen inaktiviert werden (Deveraux et al., 1998; Li et al., 2002).

Die Caspasen-3, -7 und -9 werden von XIAP und einigen anderen Mitgliedern der IAP-Familie gehemmt (siehe S. 13) (Deveraux et al., 1998). Wie frühere Arbeiten gezeigt haben, reicht die Todesrezeptor-induzierte Caspase-8-Aktivität in Typ II-Zellen nicht aus, um genügend Caspase-3 zu aktivieren und die Inhibierung zu überwinden (Li et al., 2002; Scaffidi et al., 1998; Sun et al., 2002). Erst die Bid-vermittelte Freisetzung von Cytc, das über die Apoptosombildung die Caspase-3-Aktivierung verstärkt, und des IAP-Inhibitors Smac aus den Mitochondrien induziert die Inaktivierung von XIAP und damit eine effiziente Effektorcaspase-Aktivität und Apoptose (Li et al., 2002; Sun et al., 2002).

1.1 Der protektive Effekt ist Bid-spezifisch

Im Gegensatz zu allen anderen BH3-only Proteinen, die nur im Bereich der 9-16 AS umfassenden BH-Domäne Sequenzähnlichkeit besitzen, weist Bid Struktur- und Sequenzhomologie zu den Multidomänenproteinen der Bcl-2-Familie auf (Youle and Strasser,

2008). Mehrere Experimente dieser Arbeit belegen, dass die Protektion durch den Bid kd nicht auf unspezifische oder klonale Effekte, sondern auf die reduzierte Bidexpression der Zellen zurückzuführen ist. So zeigen die Western Blot-Daten in Abb. 14, dass die Expression aller untersuchten Bcl-2-Familienmitglieder und anderer an der Apoptose beteiligter Proteine durch die Bid-spezifische shRNA nicht beeinflusst wird. Einen weiteren Hinweis auf die Spezifität liefern die Caspase-Assays nach anti-Fas- und TNF-α-Behandlung in Klonen mit unterschiedlich effizientem Bid *knock down*, in denen die DEVDase-Aktivität proportional zur Bidexpression der Klone ansteigt (Abb. 13). Dies wird durch die Experimente in Abb. 18 und 28F bestätigt, in denen die Bid kd-Zellen durch die Überexpression des Bid-FRET-Proteins für die Todesrezeptor- und die Etoposid-vermittelte Apoptose resensitiviert werden.

2 Die Staurosporin-induzierte Apoptose in HeLa-Zellen ist Bid-unabhängig

Staurosporin (STS), ein aus *Streptomyces staurosporeus* isoliertes Alkaloid (Omura et al., 1995), ist ein unspezifischer Proteinkinase-Inhibitor, der kompetitiv die Anlagerung von ATP an die ATP-Bindungsstellen der Kinasedomänen verhindert. Im Gegensatz zu einigen seiner Derivate (UCN-01 oder 7-Hydroxy-Staurosporin und PKC412 oder N-Benzoyl-Staurosporin), die sich momentan in klinischen Studien befinden (Propper et al., 2001; Welch et al., 2007), ist STS selbst für den Einsatz in der Krebstherapie zu toxisch. Es wird aber häufig zur experimentellen Zelltodinduktion verwendet, da es in zahlreichen primären Zellen und Zelllinien schnell und umfassend Apoptose auslöst.

STS ist ein Stimulus des intrinsischen Signalwegs der Apoptose, so dass Bax-/Bak-doppeldefiziente embryonale Mausfibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) und Bcl-2- bzw. Bcl-X_L-überexprimierende Zellen nach STS-Behandlung weder Cytc freisetzen noch Caspase-9 oder die nachgeschalteten Effektorcaspasen aktivieren (Jacobson et al., 1994; Neise et al., 2008; Wei et al., 2001). Der funktionelle Beitrag der BH3-only Proteine zur STS-vermittelten Bax-/Bak-Aktivierung ist erst ansatzweise charakterisiert, obwohl die Aktivität von Bad, Bid, Bik und Bim durch Phosphorylierungen modifiziert wird und STS als unspezifischer Kinaseinhibitor diese Signalwege beeinflussen kann (Willis and Adams, 2005). Während eine STS-induzierte Bik-Aktivierung bisher nicht beschrieben wurde, führt STS-Exposition in HeLa-Zellen zu erhöhter Bim-Expression, deren funktionelle Bedeutung für die STS-vermittelte Apoptose allerdings ungeklärt ist (Dr. M. Morrison, persönliche Mitteilung).

Ebenfalls in HeLa-Zellen vermindert STS die Phosphorylierung von Bad an Ser^{112} und Ser^{136}, ein Effekt, der durch Überexpression der Proteinkinase B/Akt verhindert wird (Tafani et al.,

2001). Eine Dephosphorylierung von Bad aktiviert dieses BH3-only Protein, da die Sequestrierung an 14-3-3 Proteine im Zytosol aufgehoben und eine Neutralisierung der antiapoptotischen Bcl-2-Mitglieder Bcl-2 und Bcl-X_L durch Bad ermöglicht wird (Zha et al., 1996). Auch in Chondrozyten reduziert STS die Interaktion zwischen Bad und 14-3-3 Proteinen, so dass ebenfalls in diesen Zellen ein Beitrag von Bad zur STS-induzierten Apoptose wahrscheinlich ist (Lee et al., 2007).

Die proapoptotische Aktivität von Bid wird hauptsächlich durch Proteasespaltung reguliert, aber Phosphorylierung dieses BH3-only Proteins durch Proteinkinase CK1 oder CK2 an Thr^{58} und Ser^{61} im murinen Bidmolekül, die neben der Hauptcaspaseschnittstelle (Asp^{59} in der Maus) positioniert sind, reduziert eine Caspase-8-Spaltung *in vitro* und die FasL-induzierte Apoptose *in vivo* (Desagher et al., 2001). Da eine Inhibierung von Proteinkinase CK1 und CK2 durch STS beschrieben wurde (Desagher et al., 2001), könnte dieser Kinaseinhibitor durch Verminderung der Phosphorylierung die Aktivierung von Bid fördern.

Mittels der HeLa Bid kd-Zellen wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Bid in der Zervixkarzinomzelllinie für eine STS-induzierte Caspaseaktivierung notwendig ist. Da weder in DEVDase-Assays noch in der Prozessierung der wichtigsten Effektorcaspase, Caspase-3, Unterschiede zwischen Bid-profizienten und Bid kd-Zellen festgestellt werden konnten (Abb. 19), trägt Bid in diesem Zellsystem nicht zur Apoptose nach STS-Exposition bei. Diese Ergebnisse werden durch Untersuchungen in anderen Zelllinien und primären Zellen bestätigt. In Caspase-3-defizienten MCF-7-Zellen, in denen eine Amplifizierung des mitochondrialen Weges über Caspase-3-, Caspase-6- und Caspase-8-Aktivierung, gefolgt von der tBid-Generierung, nicht möglich ist, erfolgt im Gegensatz zu MCF-7-Zellen, in denen Caspase-3 ektopisch exprimiert wird, keine Caspase-8- und Bidspaltung (Xue et al., 2003). Dies weist darauf hin, dass es sich bei der Bidaktivierung in MCF-7-Zellen um ein postmitochondriales Ereignis handelt. Außerdem sind weder Kolonkarzinomzellen, die mit einer Bid-spezifischen siRNA transfiziert wurden, noch Bid-defiziente MEFs oder Beta-Zellen vor dem STS-induzierten Zelltod geschützt (McKenzie et al., 2008; Wagner et al., 2004; Wei et al., 2001; Yin et al., 1999). Da der Bid kd STS-behandelten HeLa-Zellen keine Apoptoseprotektion verleiht, leistet auch die nach STS-Exposition in HeLa-Zellen mehrfach beobachtete Translokation von FL-Bid zu den Mitochondrien keinen funktionellen Beitrag zur STS-vermittelten Bax-/Bak- und Caspaseaktivierung (Desagher et al., 1999; Tafani et al., 2002; Tafani et al., 2001). Während Bid keine Rolle spielt, könnten Bad und evt. Bim und Puma, das in murinen Thymozyten vor STS-Behandlung schützt (Villunger et al., 2003), in HeLa-Zellen die STS-induzierte Apoptose vermitteln.

3 Keine Apoptoseresistenz Bid-depletierter Zellen bei Proteasominhibition

Die Aktivität vieler regulatorischer Proteine, die Proliferations-, Differenzierungs- oder Apoptoseprozesse kontrollieren, wird über ihre Halbwertszeit gesteuert. Da einer der wichtigsten Wege der intrazellulären Proteolyse über die Multienzymkomplexe des proteasomalen Systems verläuft, wurden Proteasominhibitoren (PI) als neue Tumortherapeutika identifiziert (siehe S. 27). PI beeinflussen die Konzentration von Proteinsubstraten direkt, indem sie deren Degradierung verhindern, können aber außerdem die transkriptionelle Aktivität einzelner Gene modulieren. Beides betrifft auch Mitglieder der Bcl-2-Familie und andere Apoptoseregulatoren. Zu den proteasomalen Substraten zählen sowohl pro- (Bax, Bid, Bik, Bim, Smac) als auch antiapoptotische (Mcl-1, Bcl-2, cFLIP, XIAP) Proteine (Adams, 2004; Fennell et al., 2008). Für Bid hat die proteasomale Regulation sowohl aktivierende als auch inhibitorische Effekte. Einerseits wird nach einer Protease-vermittelten Spaltung von Bid das N-terminale Fragment mit der inhibitorischen BH3-Domäne ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut, wodurch das C-terminale tBid freigesetzt wird, um MOMP zu induzieren (Tait et al., 2007). Andererseits wird auch die proapoptotische Aktivität von tBid durch proteasomale Degradierung begrenzt, da Mutationen der Akzeptoraminosäuren für Ubiquitin die Stabilität von Bid signifikant erhöhen (Breitschopf et al., 2000). Für Bid wurde bisher keine transkriptionelle Induktion nach Proteasomhemmung beschrieben, obwohl p53 durch PI stabilisiert wird und der Bidpromotor von p53 aktiviert werden kann (Hougardy et al., 2006; Sax et al., 2002). Arbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen konnten dagegen, abhängig vom Zelltyp und dem verwendeten PI, eine transkriptionelle Aktivierung der BH3-only Proteine Bim, Noxa oder Puma nachweisen (Concannon et al., 2007; Fernandez et al., 2005; Perez-Galan et al., 2006). Funktionelle Studien in Zellen mit BH3-only Protein-spezifischem Gen *knock out* oder RNA-Interferenz bestätigten einen Beitrag von Puma, Noxa und Bik. Während Puma an der Epoxomicin-induzierten Apoptose in humanen HCT-Kolonkarzinomzellen und MEFs beteiligt ist (Concannon et al., 2007), vermittelt Noxa in B-Zell-Lymphom- und Jurkatzellen (Perez-Galan et al., 2006) und Bik in humanen DLD1-Kolonkarzinomzellen und MEFs die Bortezomib-induzierte Apoptose (Zhu et al., 2005). Eine reduzierte Expression bzw. der Verlust eines dieser drei BH3-only Proteine bot aber nur eine partielle Protektion vor Apoptose.

Eine funktionelle Beteiligung von Bid bei der PI-induzierten Apoptose wurde noch nicht untersucht, jedoch konnte gezeigt werden, dass PI in Zervix- und anderen Karzinomzelllinien die Expression von Todesrezeptoren und ihren Liganden erhöhen (Concannon et al., 2007;

Hougardy et al., 2006; Liu et al., 2007). Eine Studie in einer Burkitt-Lymphomzelllinie und primären CLL zeigt, dass der reversible PI MG-132 eine Rekrutierung von FADD an DR5 mit nachfolgender Caspase-8- und Bidaktivierung induziert. In diesem Modell reduziert der Einsatz von DR4-blockierenden Peptiden sowie DR4- und DR5-spezifischer siRNA die Apoptose signifikant (Kabore et al., 2006). Auch in Schilddrüsenkarzinomzellen wird Caspase-8 früher als Caspase-9 oder -3 aktiviert und eine Spaltung von Bid ist nach Behandlung mit Bortezomib nachweisbar (Mitsiades et al., 2006).

Der in dieser Arbeit verwendete irreversible PI Epoxomicin, ein natürlich vorkommendes α',β'-Epoxyketonpeptid, gehört zur Klasse der selektivsten Proteasominhibitoren (Meng et al., 1999). Eine geringere DEVDase-Aktivität nach Epoxomicin-Behandlung war in den HeLa Bid kd-Zellen allerdings nicht nachweisbar, so dass Bid in dieser Zervixkarzinomzelllinie für eine Epoxomicin-vermittelte Caspaseaktivierung nicht notwendig ist (Abb. 20). Weitere Untersuchungen in HeLa-Zellen konzentrierten sich deshalb auf die BH3-only Proteine Bim und Puma, deren Expression in SH-SY5Y-Neuroblastomzellen durch Epoxomicin erhöht wird (Concannon et al., 2007). Auch in parentalen HeLa-Zellen steigerte dieser PI die Expression der Bim EL-mRNA in *real time* RT-PCR-Experimenten und erhöhte die Aktivität eines transient transfizierten Bim- bzw. eines Puma-Promotor-Luciferasekonstrukts (Daten nicht gezeigt). Eine gesteigerte Luciferaseaktivität eines Puma-Promotors mit mutierter p53-Bindungsstelle war nach Epoxomicin-Behandlung nicht nachweisbar, so dass die transkriptionelle Induktion von Puma p53-abhängig erfolgt (Concannon et al., 2007). Dies wird durch Befunde in HCT-Zellen bestätigt, in denen die Expression von Puma nur in p53-profizienten, nicht jedoch in p53-defizienten Zellen durch Epoxomicin erhöht werden kann (Concannon et al., 2007).

Obwohl die Bim-Expression in HeLa-Zellen nach Proteasominhibition signifikant zunimmt, ist die Epoxomicin-induzierte Effektorcaspase-Aktivität in HeLa-Zellen, die eine Bim-spezifische shRNA exprimieren, im Vergleich zu Kontroll-shRNA-transfizierten Zellen nicht vermindert (Daten nicht gezeigt). Daraus folgt, dass weder die transkriptionelle Induktion von Bim noch seine Stabilisierung auf Proteinebene zur Apoptose nach PI-Exposition in Zervixkarzinomzellen beitragen. Dieser Effekt wurde auch für Bim siRNA-transfizierte HCT-Zellen und Bim-defiziente MEFs gezeigt, die keinerlei Protektion vor Epoxomicin-induziertem Zelltod zeigen (Concannon et al., 2007). So weisen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente darauf hin, dass auch in HeLa-Zellen weder Bid noch Bim, dafür aber eine p53-vermittelte Puma-Aktivierung zur Epoxomicin-induzierten Apoptose beitragen

könnte, auch wenn eine direkte funktionelle Bestätigung durch Experimente mit Puma-spezifischer siRNA noch aussteht.

4 Bid beeinflusst die ER Stress-induzierte Apoptose in HeLa-Zellen nicht

Das Endoplasmatische Retikulum ist die Organelle, in der die Synthese, Faltung und Modifizierung sekretorischer und membranständiger Proteine stattfindet. Dabei handelt es sich um Energie-abhängige Prozesse, die für die Ausbildung der Disulfidbrücken zusätzlich auf ein oxidatives Milieu angewiesen sind und eine hohe Ca^{2+}-Konzentration erfordern, da viele der Faltungsenzyme (Chaperone) Ca^{2+}-Ionen als Kofaktoren benötigen. Um einen ungestörten Ablauf der Proteinfaltung zu gewährleisten, muss deshalb eine ausreichende Energieversorgung der Zelle, der Redoxstatus und die hohe Ca^{2+}-Ionenkonzentration des ER-Lumens aufrechterhalten werden (Yoshida, 2007).

Störungen eines oder mehrerer dieser Faktoren verringern die Faltungskapazität und führen zur Akkumulation und Aggregation falsch bzw. ungefalteter Proteine. Dies ist zytotoxisch und wird als ER Stress bezeichnet. Die Zellen reagieren darauf mit der Aktivierung eines protektiven Programms, der *unfolded protein response* (UPR). Die UPR hat das Ziel, durch generelle Translationsattenuation, gesteigerte Proteindegradierung und erhöhte Chaperonsynthese die Proteinlast zu reduzieren und die Funktionsfähigkeit des ER wieder herzustellen. Falls das nicht gelingt und der Stress andauert, werden statt der protektiven apoptotische Signalkaskaden aktiviert (Ron and Walter, 2007).

So sind Zellverluste und pathologische Effekte verschiedener chronischer (Diabetes, M. Alzheimer, M. Parkinson) und akuter (Ischämie nach Herzinfarkt oder Schlaganfall) Erkrankungen auch auf akuten oder persistierenden ER Stress zurückzuführen. Andererseits eröffnen die protektiven Zweige der UPR den Zellen im Inneren eines Tumors die Möglichkeit, sich besser an die fluktuierende Versorgung mit O_2 und Glukose anzupassen, sie fördern die Selektion resistenter Klone und verringern die Sensitivität der Tumore gegenüber Chemo- und Strahlentherapie (Yoshida, 2007).

Trotz der vielfältigen Beiträge zu pathophysiologischen Prozessen sind viele der molekularen Mechanismen des ER Stress-induzierten Zelltods noch nicht geklärt. Arbeiten von Wei et al. und Distelhorst und McCormick lieferten die ersten Hinweise, dass die ER Stress-induzierte Apoptose von Mitgliedern der Bcl-2-Familie reguliert wird, da Zellen, die Bcl-2 überexprimieren oder Bax- und Bak-defizient sind, eine signifikante Protektion gegenüber

experimentell ausgelöstem ER Stress aufweisen (Distelhorst and McCormick, 1996; Wei et al., 2001).

Nachfolgende Studien untersuchten den Beitrag einzelner BH3-only Proteine zur Bax- und Bak-Aktivierung nach ER Stress, der Zelltyp-abhängig reguliert ist. Puma wird in humanen Neuroblastom-, Osteosarkom- und Kolonkarzinomzelllinien, in Kardiomyozyten der Ratte und in MEFs durch die ER Stress auslösenden Substanzen Tunicamycin und Thapsigargin transkriptionell induziert (Li et al., 2006; Nickson et al., 2007; Reimertz et al., 2003). Die Aktivierung des Puma-Promotors nach ER Stress erfolgt in MEFs, nicht jedoch in Osteosarkom- und Kolonkarzinomzellen über den Transkriptionsfaktor p53. Zellen, deren Pumaexpression durch *knock out* oder RNAi reduziert bzw. ausgeschaltet war, waren deutlich resistenter gegenüber ER Stress-induzierter Apoptose als die wt-Kontrollen. In MEFs scheint zusätzlich auch Noxa p53-abhängig zum Tunicamycin- und Thapsigargin-induzierten Zelltod beizutragen (Li et al., 2006). Bim kann durch ER Stress über CHOP-C/EBPα transkriptionell aktiviert werden; zusätzlich kann die Stabilität des Proteins durch Proteinphosphatase 2A-vermittelte Dephosphorylierung verlängert werden, die die Degradierung im Proteasom verhindert. Bim-Defizienz muriner Thymozyten und Makrophagen ebenso wie Bim-spezifische siRNA in humanen Brustadenokarzinomzellen vermindert die Sensitivität gegenüber ER Stress signifikant (Puthalakath et al., 2007).

Eine Aktivierung der Initiatorcaspase-8 und eine Bidspaltung nach Tunicamycin- oder Thapsigarginexposition wurde in verschiedenen humanen Karzinomzelllinien (HCT116, HT29, DU145, MCF-7, Panc-1, Panc-28) nachgewiesen (Abdelrahim et al., 2006; He et al., 2002; Yamaguchi et al., 2003). Dabei konnte nicht unterschieden werden, ob das von Caspase-8 gespaltene Bid für die mitochondriale Permeabilisierung verantwortlich war oder ob es sich um eine postmitochondriale Caspase-8- und Bidprozessierung durch die Effektorcaspasen-3 und -6 handelte. Belege für eine funktionelle Beteiligung von Caspase-8 únd Bid lieferte die Untersuchung von Jimbo et al., die in Caspase-8-defizienten MEFs und durch die Überexpression von dominant negativem FADD die Bidspaltung und die Cytc-Freisetzung aus den Mitochondrien reduzieren konnten (Jimbo et al., 2003). Arbeiten, die den direkten Einfluss einer verminderten Bidexpression auf die Apoptose nach ER Stress untersuchten, fielen widersprüchlich aus. Während Bid-defiziente MEFs vor Tunicamycin- oder Thapsigargin-induziertem Zelltod nicht signifikant geschützt waren (Wei et al., 2001), zeigten zwei Studien mit Thapsigargin-behandelten Kolonkarzinomzellen (HCT116), dass RNAi-vermittelter Bid kd Protektion verlieh (Futami et al., 2005; Yamaguchi and Wang, 2004). Die Bid-Prozessierung der HCT-Zellen wurde mit der ER Stress-vermittelten

transkriptionellen Induzierung des Todesrezeptors DR5 und nachfolgender Caspase-8-Aktivierung erklärt.

Die BH3-only Proteine, die in HeLa-Zervixkarzinomzellen den Zelltod nach persistierendem ER Stress vermitteln, wurden noch nicht identifiziert, aber auch in HeLa-Zellen wird die DR5-Expression von Tunicamycin oder Thapsigargin gesteigert (Abb. 26 und Daten nicht gezeigt). In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob Bid in HeLa-Zellen an der Apoptose nach ER Stress beteiligt ist. Um ER Stress auszulösen, wurden drei Substanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen verwendet: den N-Glykosylierungs-Inhibitor Tunicamycin, den Ca^{2+}-ATPase-Inhibitor Thapsigargin und Brefeldin A, das den Vesikeltransport zwischen ER und Golgi Apparat hemmt. Um auszuschließen, dass die verwendeten shRNA-Konstrukte die zelluläre Stressantwort beeinflussen, wurde die Tunicamycin-induzierte Expression der ER Chaperone *binding protein* (BiP)/*glucose-regulated protein* (Grp)78 und Grp94 in Bid kd- und Kontrollzellen verglichen. Die Aufgabe dieser Chaperone besteht in der Bindung und ATP-abhängig induzierten Konformationsänderung ungefalteter Proteine (Yoshida, 2007). Beide Faltungshelfer werden bei ER Stress induziert und ihre Expression im Western Blot war in beiden Zelllinien vergleichbar (Abb. 21). Obwohl in den parentalen HeLa-Zellen 24 h nach Tunicamycin-Behandlung eine Abnahme der FL-Bid-Bande im Western Blot nachweisbar war, die durch den Caspaseinhibitor zVAD-fmk verhindert werden konnte (Daten nicht gezeigt), waren keine Unterschiede zwischen den Bid-profizienten und -defizienten Zellen in der Caspaseaktivierung nach Behandlung mit den drei ER Stress Stimuli und in der Apoptoserate nach Tunicamycin festzustellen (Abb. 22 und 23). Diese Ergebnisse zeigen, dass Bid in HeLa-Zellen zwar im Verlauf der Apoptose, vermutlich durch Caspase-8 oder Caspase-3, nach der Permeabilisierung der Mitochondrien in einem *feedback loop* prozessiert wird und dadurch zu einer Amplifizierung des Signals beitragen könnte, für die Initiation und das Fortschreiten des Apoptoseprozesses aber nicht notwendig ist.

Zusätzliche Untersuchungen in parentalen HeLa-Zellen mit einem transient transfizierten Bim-Promotor-Luziferase-Konstrukt ergaben, dass Thapsigargin eine signifikante Erhöhung der Promotoraktivität von Bim induzieren konnte, die durch *real time* RT-PCR-Ergebnisse bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). So könnte Bim in HeLa-Zellen an der ER Stress-induzierten Apoptose beteiligt sein, dies müsste allerdings durch weitere Untersuchungen, z. B. Bim-spezifische siRNA, funktionell abgesichert werden.

5 ER Stress sensitiviert HeLa-Zellen für die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose

Der Todesrezeptor-Ligand TRAIL und TRAIL-Rezeptor-1- bzw. -2-spezifische, agonistische Antikörper werden derzeit in klinischen Studien auf ihre Einsatzfähigkeit in der Chemotherapie geprüft, da sie bevorzugt in Tumorzellen Apoptose auslösen (siehe S. 26) (Secchiero et al., 2004; Yagita et al., 2004). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass TRAIL in Kombination mit anderen Apoptose induzierenden Agenzien effektiver wirkt, da Resistenzentwicklungen reduziert und TRAIL-resistente Tumorzellen für die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose resensitiviert werden können (Hetschko et al., 2008; Jiang et al., 2007; Li et al., 2007; Verbrugge et al., 2008; Wu et al., 2007). Durch die geeignete Kombination von Substanzen, die sich gegenseitig in ihrer Wirkung verstärken, können außerdem die eingesetzten Dosen verringert werden, um bei besserer Effektivität gegenüber dem Tumor geringere Nebenwirkungen zu induzieren.

Todesrezeptor-Stimulation induziert in den hier verwendeten HeLa D98-Zellen, auch ohne die Translation antiapoptotischer Gene durch CHX-Zugabe zu verhindern, Dosis-abhängig Caspaseaktivierung und Zelltod (Abb. 27 und Daten nicht gezeigt). Wie die Ergebnisse in Abb. 24 zeigen, werden die HeLa-Zellen aber durch Vorbehandlung mit subletalen Dosen der ER Stress induzierenden Substanzen Tunicamycin und Thapsigargin für die TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert, so dass im Vergleich zur Einzelexposition subtoxische TRAIL-Konzentrationen und kürzere Inkubationszeiten genügen, um bei 50% der Zellen Apoptose auszulösen.

Diese Ergebnisse bestätigen Daten in Prostatakarzinom- und Melanomzelllinien, in denen ER Stress in Kombination mit Todesrezeptor-Liganden synergistisch wirkt, da signifikant mehr Zelltod induziert wird, als die Apoptoserate der jeweiligen Einzelbehandlungen erwarten lässt (Chen et al., 2007; Jiang et al., 2007; Shiraishi et al., 2005).

Während die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose in HeLa-Zellen Bid-abhängig erfolgt, wird die Überlebensrate der Zellen nach ER Stress von Bid nicht beeinflusst (siehe S. 78, 85). Die simultane Exposition mit Tunicamycin und TRAIL dagegen steigert die Spaltung von Bid in den Kontrollzellen signifikant, doch in Bid-depletierten Zellen kann die Kombinationsbehandlung einen maximal additiven Effekt induzieren (Abb. 24). Dies zeigt, dass Bid ein essentieller Bestandteil der Signalkaskade ist, die den Synergieeffekt der Kombinationsbehandlung vermittelt und weist darauf hin, dass ER Stress den extrinsischen Apoptoseweg moduliert.

Im Gegensatz zum Todesrezeptor-induzierten Zelltod, bei dem eine simultane Applikation des Proteinsynthese-Inhibitors CHX die proapoptotische Aktivität verstärkt, verhindert CHX-Zugabe die synergistische Caspaseaktivierung nach einer kombinierten Tunicamycin- und TRAIL-Exposition (Abb. 25A). Die inhibierende Wirkung tritt aber nur ein, wenn CHX zusammen mit Tunicamycin zu Anfang der Behandlung zugegeben wird; eine Koapplikation mit TRAIL 16 h nach Inkubationsbeginn beeinflusst die Synergie nicht (Abb. 25B). Dies zeigt, dass ER Stress die Zellen durch Änderungen in der Genexpression bzw. in der Stabilität der mRNA für den extrinsischen Apoptoseweg sensitiviert.

Frühere Arbeiten unserer und anderer Gruppen konnten nachweisen, dass ER Stress die Expression des TRAIL-Rezeptors DR5 steigert (He et al., 2002; Reimertz et al., 2003; Shiraishi et al., 2005). Wie die Experimente in Abb. 26 belegen, induziert Tunicamycin auch in HeLa-Zellen die DR5-Expression auf mRNA- und Proteinebene, während die basale Expression des zweiten agonistischen TRAIL-Rezeptors, DR4, nicht erhöht wird. Eine spezifische Steigerung der DR5-mRNA-Expression war auch in Thapsigargin-behandelten HeLa-Zellen nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Die Bedeutung von DR5 und der TRAIL-Rezeptor-Interaktion für die Synergie belegen die Ergebnisse in Abb. 27, in denen eine DR5-spezifische siRNA und ein DR5-Fc-Peptid (Daten nicht gezeigt) die Effektorcaspase-Aktivität nach einer Kombinationsbehandlung mit Tunicamycin und TRAIL signifikant reduzieren.

Allerdings zeigen einige Studien, dass die Expressionshöhe der Rezeptoren nicht in jedem Fall mit der Sensitivität der Zellen korreliert, da eine effiziente Initiatorcaspase-8- oder -10-Aktivierung nicht nur von der Anzahl exprimierter Rezeptoren, sondern auch von einer effizienten Rekrutierung aller DISC-Komponenten in den Aktivierungskomplex oder dem stöchiometrischen Verhältnis zwischen den Caspase-8- und -10- und Regulatormolekülen wie c-FLIP oder *Decoy*-Rezeptoren im DISC abhängig ist (Ganten et al., 2004; Ganten et al., 2005; Merino et al., 2006; Verbrugge et al., 2008).

Die Experimente mit der DR5-siRNA oder dem DR5-Fc-Peptid können eine effizientere DISC-Rekrutierung und Caspaseaktivierung, deren molekulare Grundlagen noch weitgehend unverstanden sind, als Ursache der Synergie in den HeLa-Zellen nicht ausschließen, da sie auch die basale Expression des Rezeptors bzw. die Interaktion zwischen TRAIL und den Rezeptoren beeinflussen. Falls ER Stress die Aktivität des DISC erhöht, kann dies in HeLa-Zellen allerdings nicht auf posttranskriptionelle Modifikationen zurückzuführen sein, da die Hemmung der Proteinbiosynthese die Synergie aufhebt (Abb. 25). Aus diesem Grund sind

auch andere, Tunicamycin-spezifische Mechanismen wie ein verstärkter Transport der Rezeptoren zur Zellmembran, der in TRAIL-resistenten Kolonadenokarzinomzellen eine Sensitivierung herbeiführt, oder die Modifikation der DR4-Moleküle durch Hemmung der N-Glykosylierung als Erklärung in den HeLa-Zellen unwahrscheinlich (Jin et al., 2004; Yoshida et al., 2007).

Die transkriptionellen Änderungen nach Tunicamycin-Behandlung betreffend ergaben *Microarray*-Experimente unserer Gruppe in Neuroblastomzellen, dass mit Ausnahme von DR5 die Expression weiteren DISC-Komponenten oder -regulatoren wie Caspase-8 und -10, FADD, DR4, cFLIP, DcR1 und DcR2 nicht beeinflusst wird (Reimertz et al., 2003). Dies spricht zusammen mit der signifikanten Reduktion der Caspaseaktivität in DR5-depletierten Zellen dafür, dass die Tunicamycin-induzierte Erhöhung der DR5-Expression für die Synergie wichtig ist. Hinzu kommt, dass die TRAIL-Exposition im verwendeten Behandlungsschema erst 16 h nach ER Stress-Induktion zu einem Zeitpunkt erfolgt, an dem beide Spleißvarianten von DR5 auf Proteinebene bereits signifikant hochreguliert sind (Abb. 26).

Da Tunicamycin bereits in geringen Konzentrationen durch Erhöhung der DR5-Expression und ggf. weiteren (post)transkriptionellen Mechanismen den extrinsischen Apoptoseweg verstärkt, ist der N-Glykosylierungs-Inhibitor für die Sensitivierung TRAIL-resistenter Tumorzellen interessant. Wie die hier untersuchten HeLa-Zellen gehören allerdings auch viele primäre Tumorzellen dem Typ II an, so dass eine effektive Kombinationsbehandlung nur in Bid-profizienten Zellen möglich ist.

6 Topoisomerase-Inhibitoren

Die DNA-schädigende Wirkung der Zytostatika Etoposid und Doxorubicin beruht auf der Inhibierung der Topoisomerase II (Nitiss et al., 1993; Tewey et al., 1984). Dieses Enzym verändert den Spiralisierungsgrad der DNA, indem es transient Doppelstrangbrüche einführt, durch die es eine intakte DNA-Doppelhelix führen kann. Die Hemmung der Topoisomerase verhindert eine Religation der DNA-Stränge und induziert die Bildung von Doppelstrangbrüchen, die zytotoxisch wirken, da sie Transkription, Replikation, Rekombination und letztlich auch die Zellteilung stören (Burden et al., 1996; Montecucco and Biamonti, 2007).

Abhängig vom Zelltyp und dem Ausmaß des Schadens aktivieren Zellen entweder einen transienten Zellzyklusarrest, um Zeit für die DNA-Reparatur zu gewinnen, verhindern die Weitergabe geschädigter Erbinformation durch permanenten G1- oder G2-Phasenarrest oder induzieren Apoptose über den intrinsischen Signalweg.

6.1 Sensitivierende und protektive Funktionen von Bid nach gentoxischem Stress

Zell- und Stimulus-spezifisch vermitteln verschiedene BH3-only Proteine die gentoxischen Todessignale an die Mitochondrien. Besonders kontrovers wird derzeit der Beitrag von Bid zur Apoptose nach DNA-Schädigung diskutiert. Dazu tragen im Besonderen zwei Arbeiten aus dem Jahr 2005 bei, die neben der konventionell proapoptotischen auch eine zytoprotektive Rolle für Bid nach DNA-Schädigung nachweisen konnten. Sie zeigen, dass Bid am Zellzyklusarrest in der S- und der G2-Phase nach DNA-Doppelstrangbruch induzierenden (Kamer et al., 2005) bzw. generell nach gentoxischen Agenzien (Zinkel et al., 2005) beteiligt ist und damit eine Reparatur der induzierten DNA-Schäden ermöglicht. Für den S-Phasenarrest ist eine Phosphorylierung von Bid an Serinresten durch die nukleären Ser/Thr-Kinasen ATM und ATR erforderlich, so dass Bid ko-Zellen, die eine nicht-phophorylierbare Bidmutante ektopisch exprimieren, eine höhere Sensitivität gegenüber Etoposid als wt-Bid-exprimierende Zellen aufweisen (Kamer et al., 2005).

Für Bid werden deshalb sowohl sensitivierende als auch protektive Funktionen nach gentoxischem Stress postuliert, während andere Studien diesem BH3-only Protein einen essentiellen Beitrag zur zellulären Antwort auf DNA-Schädigung absprechen. Mag dies teilweise auf Zelltyp-spezifische oder Inkubationsdauer- und Dosis-abhängige Unterschiede zurückzuführen sein, da eine Bidphosphorylierung bereits bei niedrigen Konzentrationen und deutlich vor einer Caspaseaktivierung nachweisbar ist (Kamer et al., 2005), so sind die widersprüchlichen Ergebnisse in embryonalen Mausfibroblasten und einigen anderen primären Zellen ebenso wie in humanen T-Zell- oder Kolonkarzinomzelllinien damit nicht zu erklären.

Eine Arbeit von Engels et al., die die Caspase- und Bidspaltung nach Etoposid-Exposition in Jurkat-Zellen untersucht, zeigt, dass die Caspaseaktivierung erst postmitochondrial erfolgt und dass die Überexpression von Bcl-X_L oder dominant negativer Caspase-9 eine Bidspaltung verhindern (Engels et al., 2000). Dies lässt auf eine nachgeordnete Bidaktivierung in einem *feedback loop* schließen und weist auf eine eher amplifizierende als auf eine Apoptose initiierende Funktion von Bid in diesem System hin. Vereinbar mit der postmitochondrialen Caspaseaktivierung wäre nur eine Translokation von FL-Bid zu den Mitochondrien, die in dieser Studie allerdings nicht untersucht wurde. Dies wird dagegen in einer anderen Arbeit in Etoposid-behandelten Jurkat-Zellen postuliert, in der eine Bcl-2-inhibierbare FL-Bid-induzierte Cytc-Freisetzung und Caspaseaktivierung nachgewiesen wurde (Karpinich et al., 2006). Dies steht allerdings im Widerspruch zu den Ergebnissen von Werner et al., nach

denen Asp-gespaltenes Bid für die Cytc-Freisetzung in Jurkat-Zellen nach Etoposid-Exposition notwendig ist, da ein Etoposid-behandeltes, Bid-depletiertes Zytosol nach der Substitution mit D60E/D75E-mutantem Bid nicht in der Lage ist, eine Cytc-Freisetzung aus murinen Mitochondrien zu induzieren (Werner et al., 2004).

Widersprüchlich sind die Daten auch in HCT116-Kolonkarzinomzellen, die sowohl eine fehlende als auch eine signifikante Protektion durch Bid-spezifische siRNAs in der Etoposid-induzierten Apoptose belegen (Erler et al., 2004; Wagner et al., 2004).

Obwohl die ersten Bid *knock out* Mäuse bereits 1999 im Labor von Stanley Korsmeyer generiert wurden, sind auch die Studien in primären Zellen bisher wenig hilfreich, die Kontroverse um die Bedeutung von Bid in der DNA-schadensinduzierten Apoptose aufzulösen.

Bei der erstmaligen Charakterisierung der Bid *knock out* Mäuse wiesen Bid-defiziente MEFs im Vergleich zu Zellen aus wt-Tieren keine Resistenz gegenüber γ-Strahlen auf (Yin et al., 1999). In einer späteren Publikation aus diesem Labor wurde Etoposid verwendet, das wie γ-Strahlung DNA-Doppelstrangbrüche erzeugt. Während die Bax-/Bak-doppeldefizienten MEFs dramatisch vor Apoptose geschützt waren und damit bestätigten, dass es sich bei Etoposid um einen Stimulus des intrinsischen Signalwegs handelt, waren Bid ko-MEFs nicht Apoptose-resistenter als wt-Fibroblasten (Wei et al., 2001).

Nachfolgende Arbeiten mit Zellen der Bid-deletierten Mäuse dagegen unterstützten die proapoptotische Rolle dieses BH3-only Proteins, da $Bid^{-/-}$-MEFs gegenüber einer Reihe gentoxischer Agenzien (Doxorubicin, Etoposid, 5-Fluorouracil, Cisplatin, UV- und γ-Strahlen) signifikant geschützt waren (Erler et al., 2004; Kamer et al., 2005; Oberkovitz et al., 2007; Sax et al., 2002), wobei die Etoposid-Resistenz auch in Milzzellen bestätigt werden konnte (Kamer et al., 2005). Myeloide Vorläuferzellen (*myeloid precursor cells*, MCP), aus Bid ko-Mäusen isoliert, wiesen dagegen keine UV- und γ-Strahlenresistenz und nur einen moderaten Schutz vor Etoposid auf, während der Bid ko diese Zellen sogar für die Apoptose nach replikativem Stress durch Mitomycin C-, Hydoxyharnstoff- oder Aphidicolin-Exposition sensitivierte (Zinkel et al., 2005). Auch Bid-defiziente primäre T-Zellen zeigten keine UV- oder γ-Strahlenresistenz im Vergleich zu Bid-profizienten Zellen und reagierten hypersensitiv auf Mitomycin C-Behandlung. Im Falle der T-Zellen und MPCs wurde die Hypersensitivität gegenüber replikativem Stress mit dem Fehlen des protektiven S-Phasenarrests in den Bid-defizienten Zellen begründet (Zinkel et al., 2005).

Im Jahr 2007 wurden im Labor von Andreas Strasser neue Bid ko-Mäuse generiert, bei denen im Gegensatz zu den Korsmeyer-Tieren durch Kreuzung mit Cre-Rekombinase-transgenen

Mäusen das Neomycin-Resistenzgen deletiert wurde (Kaufmann et al., 2007). Untersuchungen γ-bestrahlter bzw. Etoposid-behandelter Lymphozytensubpopulationen, E1A/Ras- sowie SV40-transformierter MEFs und die Bestimmung der Anzahl hämatopoetischer Zellpopulationen in Milz, Thymus und Lymphknoten γ-bestrahlter Mäuse ergaben keine Unterschiede in der Apoptoserate zwischen Bid ko- und wt-Zellen. Ebenso wenig beeinflusste die Bid-Defizienz das Überleben oder die Zellzyklusprogression myeloider Vorläuferzellen nach γ-Strahlung, Topoisomerase-Inhibition oder replikativem Stress (Kaufmann et al., 2007). Auch eine Reevaluierung verschiedener Lymphozytensubpopulationen der originalen Bid ko-Mäuse konnte keine Protektion der Bid ko- gegenüber den wt-Zellen nach DNA-Schädigung oder replikativem Stress feststellen, so dass genetische Unterschiede zwischen den Mausstämmen oder die Deletion der Neomycin-Kassette in den neuen Bid ko-Tieren als Erklärung ausscheiden (Kaufmann et al., 2007). Die Diskrepanz der Studien in murinen Fibroblasten lässt sich auch nicht durch die Verwendung von primären gegenüber immortalisierten Zellen auflösen. Die transformierten Fibroblasten zeigen zwar generell eine höhere Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien, doch während bei Erler et al. immortalisierte und bei Kamer et al. primäre und transformierte Bid-defiziente MEFs gegenüber gentoxischen Substanzen signifikante Resistenz aufweisen (Erler et al., 2004; Kamer et al., 2005), verwenden Wei et al. primäre Bid $^{-/-}$-MEFs, Kaufmann et al. dagegen transformierte Fibroblasten, doch beide konnten keinen Unterschied in der Apoptosesensitivität zwischen Bid ko- und wt-Zellen feststellen (Kaufmann et al., 2007; Wei et al., 2001).

6.2 Bid ist an der Topoisomerase-Inhibitor-induzierten Apoptose in HeLa-Zellen beteiligt

Aufgrund der kontroversen Datenlage wurde in dieser Arbeit die Caspaseaktivierung und Apoptose der Bid-depletierten und der Bid-wt-Zervixkarzinomzellen nach DNA-Schädigung untersucht. Die Ergebnisse mit Topoisomerase-Inhibitor-behandelten Bid kd- und Kontrollzellen zeigen, dass in HeLa-Zellen die proapoptotische Funktion von Bid überwiegt. Eine ATM-/ATR-abhängige Bid-Phosphorylierung wurde zwar nicht untersucht, so dass ein Beitrag von Bid zur Zellzyklusregulation nicht ausgeschlossen werden kann, doch die Daten belegen, dass Bid an der Etoposid- und Doxorubicin-induzierten Caspaseaktivierung beteiligt ist (Abb. 28). Dass es sich dabei um Bid-spezifische Effekte handelt, beweisen die Bid-Reexpressionsexperimente in den Bid kd-Zellen, in denen die Caspaseaktivität der Bid-substituierten Zellen wieder das Niveau der wt-Kontrollzellen erreicht (Abb. 28F). Besonders

die Apoptose- und Koloniebildungsassays zeigen aber auch, dass die Protektion durch den Bid kd nach DNA-Schädigung deutlich geringer ausfällt als in der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose, so dass weitere BH3-only Proteine wichtig sein könnten. Daraus ergibt sich einerseits die Frage, wie Bid nach DNA-Schädigung aktiviert werden kann und andererseits, welche BH3-only Proteine außer Bid zur Apoptose-Signalweiterleitung beitragen könnten.

6.3 Potentielle Mechanismen der Bidaktivierung bei gentoxischem Stress

Die Bidaktivierung nach gentoxischem Stress kann sowohl über posttranskriptionelle als auch über transkriptionelle Mechanismen erfolgen. DNA-Schädigung aktiviert den Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor p53, der abhängig vom Ausmaß des Schadens DNA-Reparatur, Seneszenz, Zellzyklusarrest oder Apoptose vermittelt (Ryan et al., 2001). Neben Puma und Noxa gehört auch Bid zu den BH3-only Proteinen, die von p53 transaktiviert werden können (Nakano and Vousden, 2001; Oda et al., 2000; Sax et al., 2002). In γ-bestrahlten Mäusen wird die Bidexpression im Kolonepithel und in der roten Pulpa der Milz, nicht aber im Thymus, p53-abhängig gesteigert (Sax et al., 2002).

HeLa-Zellen besitzen im Gegensatz zu vielen anderen Karzinomzellen wt-p53, da sie mit humanem Papillomvirus-18 infiziert sind, dessen E6-Onkogen für eine Ubiquitin-vermittelte p53-Degradierung sorgt, so dass in dieser Zelllinie kein Selektionsdruck für Mutationen im p53-Gen besteht (Munger and Howley, 2002; Walboomers et al., 1999). Ob Etoposid die Transkription des Bidgens erhöht, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, ist aber nicht auszuschließen, da trotz der konstitutiven Expression des E6-Onkogens gentoxische Agenzien wie Etoposid eine Stabilisierung und Aktivierung des p53-Proteins in HeLa-Zellen bewirken können (Koivusalo et al., 2005). Eine gesteigerte Bidexpression kann die Apoptoserate beeinflussen, da Sarig et al. auch bei sonst subtoxischen Erhöhungen der zellulären FL-Bid-Konzentration eine Sensitivierung für Etoposid-induzierte Apoptose nachweisen können (Sarig et al., 2003).

Ein zusätzlicher Effekt der p53-Stabilisierung besteht in einer gesteigerten Expression des *death domain*-enthaltenden Proteins PIDD, das zusammen mit dem Adapterprotein RAIDD und Procaspase-2 das PIDDosom, die Aktivierungsplattform für Caspase-2, bilden kann (Lin et al., 2000; Tinel and Tschopp, 2004). Die Bedeutung von Caspase-2 als Initiatorcaspase wird zwar kontrovers diskutiert, doch Arbeiten von Lin et al. und Robertson et al. zeigen, dass diese Caspase in einigen Zelltypen an der Etoposid-induzierten Apoptose beteiligt ist und oberhalb der Mitochondrien aktiviert werden kann (Lin et al., 2004; Robertson et al., 2002). Bid wird von Caspase-2 an seiner wichtigsten Proteaseschnittstelle Asp^{60} prozessiert (Guo et

al., 2002). Experimente in Bid-defizienten MEFs und Bid-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen zeigen außerdem, dass rekombinante Caspase-2 in Abwesenheit von Bid kein Cytc freisetzen kann (Bonzon et al., 2006; Gao et al., 2005), so dass das proapoptotische Signal der DNA-Schädigung über Caspase-2 zu Bid und den Mitochondrien weitergeleitet werden könnte.
Eine p53-unabhängige Möglichkeit stellt eine Bidaktivierung nach gentoxischem Stress durch Calpaine dar. MEFs, die kein funktionelles Calpain exprimieren, da die gemeinsame kleine Untereinheit des µ- und m-Calpains deletiert ist, sind nach Etoposidexposition Apoptose-resistenter als die wt-Zellen (Tan et al., 2006). Auch in Etoposid-behandelten humanen Melanomzellen ist eine Calpainaktivierung nachweisbar und der Einsatz des Calpaininhibitors Calpeptin verringert die Apoptoserate signifikant (Mandic et al., 2002). Ebenso verringert Calpeptin die Etoposid-induzierte DEVDase-Aktivität in HeLa-Zellen. Da die Protektion aber sowohl in den Bid kd- als auch den Kontrollzellen detektierbar ist, scheint der Effekt Bid-unabhängig zu sein (Daten nicht gezeigt).
Eine mechanistisch neue Bidaktivierung deutet die Studie von Oberkovitz et al. an, die ein rekombinantes Bidprotein (NLS-Bid) verwenden, das mit dem starken nukleären Lokalisierungssignal (NLS) des SV40 *large T-Antigen* fusioniert ist und deshalb den Nukleus nicht verlassen kann. Sie zeigen, dass Bid-defiziente MEFs gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose resistenter als wt-Zellen sind, dass aber nur die Reexpression von wt-Bid, nicht aber von NLS-Bid die $Bid^{-/-}$-Zellen resensitiveren kann (Oberkovitz et al., 2007). Dies könnte bedeuten, dass die nukleär lokalisierte Fraktion von Bid nach DNA-Schädigung über bisher unbekannte Signalwege aktiviert wird, um anschließend ins Zytosol zu translozieren und dort mit den Multidomänenproteinen der Bcl-2-Familie zu interagieren.

6.4 Die Bedeutung weiterer BH3-only Proteine für die Apoptose nach DNA-Schädigung

Im Folgenden soll darauf eingegangen werden, welche anderen BH3-only Proteine an der Weiterleitung des apoptotischen Signals beteiligt sein könnten, da der Bid kd die HeLa-Zellen nach DNA-Schädigung nur unvollständig schützt. Für die Etoposid-induzierte Apoptose in HeLa-Zellen liegen kaum Daten über andere BH3-only Proteine vor, aber in Zellen mit funktionellem p53 könnte gentoxischer Stress drei weitere BH3-only Proteine, Puma, Noxa und Bad, transkriptionell induzieren (Jiang et al., 2006b; Nakano and Vousden, 2001; Oda et al., 2000). Von diesen ist Puma das wichtigste proapoptotische p53-Zielgen, da es im Gegensatz zu Bad, das Bcl-2 und Bcl-X_L, und Noxa, das nur Mcl-1 und A1 neutralisiert, alle antiapoptotischen Multidomänenproteine mit hoher Affinität binden kann (Chen et al., 2005).

Ein essentieller Beitrag von Puma zur Apoptose nach DNA-Schädigung durch Topoisomerase-Inhibition und γ-Strahlen wurde in diversen primären Zellen (unreife und reife Lymphozyten, Makrophagen, Mastzellen), in transformierten MEFs und Kolonkarzinomzellen in *knock out*-Studien nachgewiesen (Ekoff et al., 2007; Michalak et al., 2008; Ming et al., 2006; Villunger et al., 2003; Wang et al., 2007). Während Puma in Lypmphozyten der wichtigste Vermittler für Apoptose nach gentoxischen Stress zu sein scheint (Erlacher et al., 2005), verleiht Puma-/Noxa-Doppeldefizienz murinen Fibroblasten zusätzliche Protektion (Michalak et al., 2008). Ein Beitrag von Noxa zum Etoposid- und Doxorubicin-induzierten Zelltod in p53-profizienten Neuroblastomzellen wurde ebenfalls nachgewiesen (Kurata et al., 2008; Yakovlev et al., 2004). Auch Bad wurde kürzlich als p53-Zielgen identifiziert und Bad-Depletion durch Gendeletion oder RNAi konnte eine partielle Etoposidresistenz vermitteln (Jiang et al., 2006b; Ranger et al., 2003), doch ist nach bisherigem Kenntnisstand die Bedeutung von Noxa und Bad für die DNA-schadensinduzierte Apoptose im Vergleich zu Puma deutlich geringer.

Eine p53-unabhängige Aktivierung nach DNA-Schädigung und eine Reduzierung der Apoptoserate durch spezifische siRNAs wurde für Bim und Bik in Karzinomzelllinien gezeigt (Erlacher et al., 2005; Real et al., 2006; Zantl et al., 2007). Eine Etoposid-vermittelte transkriptionelle Induktion von Bim EL in parentalen HeLa-Zellen wurde auch in dieser Arbeit nachgewiesen, die funktionelle Bedeutung aber nicht weitergehend untersucht (Daten nicht gezeigt). Um weitere BH3-only Proteine zu identifizieren, die nach Topoisomerase-Hemmung die Bax-/Bak-Aktivierung in HeLa-Zellen vermitteln, wäre es deshalb interessant, neben Bid die Rolle von Puma und Bim näher zu untersuchen.

7 Oxaliplatin

7.1 Der Bid kd verringert die Oxaliplatin-induzierte Apoptose in HeLa-Zellen

Oxaliplatin ist ein zytostatisches Platinderivat der dritten Generation, das nach Cis- bzw. Carboplatin entwickelt wurde und sich durch bessere Verträglichkeit und eine geringe Kreuzresistenz zu den anderen Platinverbindungen auszeichnet. Wie für die beiden anderen Platinderivate auch werden die von Oxaliplatin induzierten DNA-Schäden als Ursache der Zytotoxizität angesehen, doch die molekularen Mechanismen, die zur Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs führen und im besonderen die Rolle der BH3-only Proteine sind weitgehend ungeklärt (Boulikas and Vougiouka, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb mittels stabiler Bid- und transienter Puma-spezifischer RNA-Interferenz die Bedeutung der beiden BH3-only Proteine für die Oxaliplatin-induzierte Apoptose in HeLa-Zellen sowie potentielle Mechanismen der Bidaktivierung untersucht.

Die Daten zeigen, dass die Depletion von Bid eine verzögerte Caspase-2-, -3-, -8- und -9-Aktivierung bewirkt (Abb. 29B, 30, 35, 39), die mit einer signifikant geringeren Apoptose- und einer erhöhten Proliferationsrate (Abb. 29) der Bid kd-Zellen im Vergleich zu Bid-profizienten Kontrollzellen einhergeht. Wird zusätzlich die Expression von Puma vermindert, kann in den Bid-depletierten Zellen die Effektorcaspase-Aktivierung nochmals signifikant reduziert werden (Abb. 43).

Während ein Puma-spezifischer Beitrag zur Zelltodinduktion in Kolonkarzinomzellen bereits nachgewiesen wurde (Wang et al., 2006), ist dies das erste Modellsystem, in dem die Apoptoseresistenz gegenüber Oxaliplatin spezifisch der Biddepletion zugeordnet werden kann. Eine frühere Arbeit untersuchte zwar anoxische humane Kolonkarzinomzellen, die im Vergleich zu normoxischen Kontrollzellen auch eine signifikant geringere Sensitivität gegenüber Oxaliplatin aufwiesen (Erler et al., 2004). Da der Sauerstoffentzug neben der Bid- auch die Bax- und die Badexpression reduzierte, war der Beitrag der einzelnen Bcl-2-Proteine nicht von einander zu trennen und im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnte der Bid-spezifische Anteil an der zellulären Resistenz nicht herausgearbeitet werden.

7.2 Oxaliplatin induziert Caspasen postmitochondrial

Die initialen Experimente mit Oxaliplatin haben gezeigt, dass dieses Zytostatikum in HeLa-Zellen eine signifikante Caspaseaktivität induziert und dass die Verwendung eines Pancaspase-Inhibitors das Auftreten des apoptotischen Phänotyps verhindern kann (Abb. 29). Wie in der Einleitung dargestellt (siehe S. 5ff.), erfolgt die Caspaseaktivierung hierarchisch und kaskadenartig und wird von einer der vier sog. Initiatorcaspasen (Caspasen-2, -8, -9 oder -10) ausgelöst. Obwohl von allen daraufhin untersuchten Initiatorcaspasen nach 16-stündiger Inkubation mit Oxaliplatin aktive Fragmente nachweisbar sind (Abb. 30), belegen zwei zentrale Experimente dieser Arbeit, dass Caspasen in Oxaliplatin-behandelten HeLa-Zellen erst postmitochondrial aktiviert werden, so dass Caspase-9 die Initiatorcaspase darstellt. Die Untersuchung DEVD-FRET-transfizierter HeLa-Zellen zeigt, dass der allgemeine Caspaseinhibitor zVAD-fmk zwar die Oxaliplatin-induzierte FRET-Löschung verhindert, da er die dafür verantwortlichen DEVDasen hemmt (Garcia-Calvo et al., 1998). Da aber trotz der umfassenden Caspaseinhibierung die mitochondriale Depolarisierung nicht beeinflusst wird,

sind Caspasen für die Initiierung von MOMP nicht notwendig (Abb. 39) (Dussmann et al., 2003; Rehm et al., 2003; Varnes et al., 1999).

Der andere Nachweis nutzt HeLa-Zellen, die das antiapoptotische Bcl-2 überexprimieren, so dass es nach der Zugabe intrinsischer Apoptosestimuli weder zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran noch zur Freisetzung der proapoptotischen Proteine des Intermembranraums kommt (Ballestrero et al., 2004; Madesh et al., 2002; Yang et al., 1997). Da in HeLa-Bcl-2-Zellen eine Caspaseaktivierung nicht nachweisbar ist (Abb. 31B), muss die Cytc-Freisetzung und die nachfolgende Apoptosom-abhängige Caspase-9-Aktivierung Voraussetzung für die Initiation der Caspasekaskade sein. Dies bedeutet auch, dass die in Abb. 30 beobachtete Caspase-2- und -8-Aktivierung nicht auf die Rekrutierung an die Aktivierungsplattformen des PIDDosoms oder DISCs, sondern auf postmitochondriale, Caspase-3- und -6-vermittelte Proteolyse zurückzuführen ist (Murphy et al., 2004; Sohn et al., 2005), so dass die Caspasen-2 und -8 in diesem Modell nicht als Initiator-, sondern als Effektorcaspasen fungieren.

7.3 Der Caspase-vermittelte *feedback loop* ist für die mitochondriale Depolarisierung nicht notwendig

Da zVAD-fmk den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials weder verzögert noch reduziert, sind Caspasen für die Oxaliplatin-induzierte mitochondriale Depolarisierung nicht notwendig. Das bedeutet auch, dass der amplifizierende *feedback loop*, der eine Caspase-3- und -6-abhängige Caspase-8-Prozessierung und eine Caspase-vermittelte Bidspaltung umfasst (Slee et al., 1999; Slee et al., 2000; Sohn et al., 2005), für eine vollständige Aktivierung der Mitochondrien in HeLa-Zellen nicht essentiell ist.

Ausgehend von Vorarbeiten in anderen Krebszelllinien war dieser Befund nicht abzuleiten, da in Kolonkarzinomzellen eine Liganden-unabhängige DR5-vermittelte Caspase-8-Aktivierung zur Oxaliplatin-induzierten Apoptose signifikant beiträgt (Longley et al., 2006). In Jurkat-Zellen beeinflusst eine Caspase-8-Defizienz den Apoptoseverlauf nach Oxaliplatin-Behandlung dagegen nicht. Dennoch wird in diesem Zellsystem entweder Caspase-2 als Initiatorcaspase oder eine Amplifizierung des Apoptosesignals durch Caspase-3-abhängige Bidaktivierung benötigt, da Vorbehandlung mit zVAD-fmk das mitochondriale Membranpotential signifikant vermindert (Ballestrero et al., 2004). Dies bedeutet, dass eine erhöhte Expression des DISC-Modulators cFLIP, der die Caspase-8-Aktivierung erschwert, in Kolonkarzinomzellen eine effiziente Apoptoseinitiation durch Oxaliplatin verhindert, während dies die Zelltodinduktion in Zervixkarzinom- oder Jurkat-Zellen nicht beeinflusst.

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, sind Caspasen in HeLa-Zellen, im Gegensatz zu anderen Karzinomzelllinien, nicht für die initiale Phase der Oxaliplatin-induzierten Apoptose *upstream* der Mitochondrien notwendig, sondern werden erst in der Exekutionsphase aktiv. Da die von Oxaliplatin-initiierten Apoptosemechanismen Zelltyp-spezifisch sind, sollten auch Resistenzmechanismen, die einen erfolgreichen Einsatz dieses Zytostatikums limitieren, Zelltyp-abhängig variieren.

7.4 Oxaliplatin aktiviert konventionelle Calpaine

Calpaine gehören wie Caspasen zu den zytosolischen Cysteinproteasen, die durch limitierte Proteolyse ausgewählter Substrate zur Apoptoseinitiation und -exekution beitragen können (siehe S. 24). Eine Beteiligung der konventionellen m- und μ-Calpaine am Zelltod in humanen und murinen Zellen wurde für die DNA-schädigenden Agenzien Cisplatin, die Topoisomerase-I- bzw. -II-Inhibitoren Camptothecin und Etoposid und für γ-Strahlung beschrieben (Liu et al., 2008; Mandic et al., 2002; Sedarous et al., 2003; Tan et al., 2006).
Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass auch nach Oxaliplatinexposition konventionelle Calpaine aktiviert werden. Dabei dient das autoproteolytische Spaltfragment (18 kD) der μ- und m-Calpainen gemeinsamen kleinen Untereinheit (Calpain-4, 28 kD) als Nachweis für die Calpainaktivierung (Abb. 34). Im Gegensatz zu Caspasen erreichen Calpaine die aktive Konformation zwar nicht durch proteolytische Spaltung, sondern durch Ca^{2+}-Bindung, so dass Aktivierung und Autolyse, welche die Inhibierung des aktiven Zentrums nicht aufheben kann, zwei von einander unabhängige Ereignisse darstellen. Da aber auch die Autoproteolyse Ca^{2+}-abhängig ist und nur geringfügig höhere Ca^{2+}-Konzentrationen als die für die Aktivierung benötigten erfordert, kann die Autoprozessierung der Untereinheiten als Indikator für eine Calpainaktivierung angesehen werden (Goll et al., 2003).

7.5 Calpaine fördern die Oxaliplatin-induzierte Apoptose in HeLa-Zellen

Abhängig von den verwendeten zytotoxischen Agenzien aktivieren die konventionellen Calpaine sowohl pro- als auch antiapoptotische Signalkaskaden. Studien in murinen Fibroblasten, in denen die Deletion der kleinen Untereinheit das Entstehen funktioneller Calpaine verhindert, zeigen, dass der Calpain-4 *knock out* eine signifikante Protektion vor Etoposid-, Campthotecin-, UV-Strahlung- oder H_2O_2-induzierter Apoptose bietet, die Zellen aber gleichzeitig für TNF-α und STS-vermittelten Zelltod sensitiviert (Tan et al., 2006). Die Inkubation humaner Lungenadenokarzinom- und Melanomzellen mit dem Zytostatikum

Cisplatin dagegen induziert eine proapoptotische Calpainaktivität (Liu et al., 2008; Mandic et al., 2002).

Wie die Experimente mit Calpeptin, einem synthetischen Inhibitor der konventionellen Calpaine (Tsujinaka et al., 1988), in dieser Arbeit belegen, wirken Calpaine auch in Oxaliplatin-behandelten HeLa-Zellen Apoptose fördernd. Die Hemmung der Calpaine reduziert den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und die Prozessierung der Caspasen-3, -2, -8 und -9 signifikant (Abb. 35, 39 und Daten nicht gezeigt). Kontrollexperimente in parentalen HeLa-, HeLa-Bcl-2- und HeLa-DEVD-FRET-Zellen konnten in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten unserer Gruppe bestätigten, dass die protektiven Effekte des Calpaininhibitors nicht auf eine direkte Hemmung der Caspasen durch Calpeptin zurückzuführen sind, da Calpeptin bei zwei anderen Agenzien, dem Todesrezeptor-Liganden TRAIL und dem intrinsischen Stimulus STS, die Caspaseaktivierung der Zervixkarzinomzelllinie nicht beeinträchtigt (Abb. 37, 38) (Rehm et al., 2002).

7.6 Calpaine werden *upstream* der Mitochondrien aktiviert

Calpaine können sowohl in einem frühen als auch in einem späten Apoptosestadium aktiviert werden. Im ersten Fall können sie zur Initiation oder Modulation der apoptotischen Signalkaskade beitragen, im zweiten Fall beschränkt sich ihre Rolle, im Zusammenwirken mit anderen Proteasen, auf die Degradierung der zellulären Strukturen (Goll et al., 2003).

Wie aus den Western Blot-Kinetiken Oxaliplatin-behandelter HeLa-Zellen ersichtlich wird, sind die aktiven Caspase-Untereinheiten und die Autolysefragmente der Calpaine jeweils nach 16 h nachweisbar (Abb. 30, 34, 35), so dass diese Ergebnisse keine Schlussfolgerungen über die Aktivierungsreihenfolge der Proteasen in diesem Modell zulassen.

Weitergehende Experimente dieser Arbeit konnten aber belegen, dass in der Oxaliplatin-induzierten Apoptose in HeLa-Zellen Calpaine vor den Caspasen aktiv sind und deren Aktivierung beeinflussen, da sie zur Permeabilisierung der mitochondrialen Membranen beitragen (Abb. 39).

Die verminderte Caspaseaktivität Calpeptin-vorbehandelter Zellen weist darauf hin, dass Calpaine innerhalb des apoptotischen Signalswegs oberhalb der Caspasen positioniert sind, weil eine direkte Inhibierung der Caspasen durch den Calpaininhibitor ausgeschlossen werden kann (siehe Abb. 37, 38 und S. 140).

Eine frühere Calpainaktivierung bestätigen die Untersuchungen in DEVD-FRET-Zellen, in denen auf Einzelzellebene simultan das mitochondriale Membranpotential und die DEVDase-Aktivität ermittelt wurden. Während die Oxaliplatin-induzierte DEVD-FRET-Löschung durch

Caspase- und Calpaininhibierung reduziert wurde, verhinderte nur Calpeptin den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials signifikant (Abb. 39). Da in den Kontrollexperimenten mit TRAIL- bzw. STS-behandelten DEVD-FRET-Zellen die mitochondriale Depolarisierung nicht beeinträchtigt war (Abb. 37, 38), konnte zudem gezeigt werden, dass der Effekt nicht auf eine unspezifische protektive Eigenschaft des Inhibitors zurückzuführen, sondern für Oxaliplatin spezifisch war.

7.7 Die Oxaliplatin-induzierte Bidspaltung wird von Calpainen und Caspasen vermittelt

7.7.1 Caspase-abhängige Bidspaltung

Trotz differierender Spaltspezifität besitzen Calpaine und Caspasen viele gemeinsame Substrate. Zu den Apoptoseregulatoren, die von beiden Proteasen geschnitten werden, zählen die Caspasen-3, -7, -8, -9 und -12 selbst, sowie die Bcl-2-Familienmitglieder Bax, Bcl-X_L, Bcl-2 und Bid (Fischer et al., 2003; Gil-Parrado et al., 2002; Liu et al., 2004; Wood et al., 1998). Während die proteolytische Spaltung im Falle der Caspasen aktivierend (nach Caspase- und Calpainprozessierung) oder inaktivierend (nach Calpainprozessierung) sein kann und beide Cysteinproteasefamilien die antiapoptotischen Bcl-2- und Bcl-X_L-Proteine in Apoptose fördernde Fragmente umwandeln (Fischer et al., 2003; Goll et al., 2003), weist das prozessierte Bidfragment eine höhere proapoptotische Aktivität als das FL-Molekül auf (Madesh et al., 2002). Durch die Protease-vermittelte Abtrennung der inhibitorischen N-terminalen Domäne aktiviert (Tait et al., 2007; Tan et al., 1999), tranloziert tBid zu den Mitochondrien, um mit den Multidomänen-Bcl-2-Proteinen zu interagieren und MOMP zu induzieren.

Wie die in Abb. 32, 33 und 35 dargestellten Daten zeigen, induziert Oxaliplatin eine Spaltung von Bid in HeLa- und MCF-7-Zellen, da 16 h nach Apoptoseinduktion in beiden Bid-profizienten Zelllinien das trunkierte Bidfragment zu detektieren ist. Zu diesem Zeitpunkt sind in den Zervixkarzinomzellen sowohl Calpaine als auch Caspasen aktiv und die Experimente mit Proteaseinhibitoren und einem Bidkonstrukt mit mutierter Caspaseschnittstelle weisen die Beteiligung beider Cysteinproteasefamilien an der Bidspaltung nach.

Wie Studien mit rekombinanten Proteasen gezeigt haben, wird Bid *in vitro* von Caspase-2, -3, -8 und -10 gespalten (Bossy-Wetzel and Green, 1999; Fischer et al., 2006; Li et al., 1998) und mit Ausnahme von Caspase-10 wurde für alle eine Aktivierung in Oxaliplatin-behandelten HeLa-Zellen nachgewiesen (Abb. 30, 35). Für eine Caspase-abhängige Bidprozessierung in

den HeLa-Zellen spricht, dass der Caspaseinhibitor IETD-fmk, der in anderen Studien die Calpainaktivität nicht beeinflusst (Liu et al., 2008; Mandic et al., 2002), die Generierung des tBid-Fragments deutlich reduziert (Abb. 33). Obwohl IETD-fmk häufig als spezifischer Caspase-8- und -10-Inhibitor eingesetzt wird, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit (Abb. 33A) in Übereinstimmung mit Studien anderer Gruppen, dass diese Substanz zumindest auch andere DEVDasen, also die Caspasen-3, -6, -7 und -9, hemmt und durch den Einsatz dieses Tetrapeptid-Inhibitors nicht auf die Aktivierung einzelner Caspasen geschlossen werden kann (Garcia-Calvo et al., 1998; McStay et al., 2008; Thornberry et al., 1997).

Ob Caspase-8 und -10 an der Spaltung von Bid beteiligt sind, können die Experimente mit IETD-fmk deshalb nicht klären, aber es ist bekannt, dass Bid ein besseres Substrat für Caspase-8 und -10 als für Caspase-2 und -3 (Fischer et al., 2006; Li et al., 1998) darstellt. Wie die Experimente in den Caspase-3-defizienten MCF-7-Zellen belegen (Abb. 32), findet auch nach Calpaininhibierung eine, allerdings verminderte, Bidprozessierung statt, so dass Caspase-3 zumindest in diesem Modell für eine Bidspaltung nicht essentiell ist. In den Caspase-3-profizienten HeLa-Zellen dagegen könnte die im Vergleich mit Caspase-8 und -10 höhere Caspase-3-Aktivität die geringere Substratspezifität ausgleichen (Faleiro et al., 1997; McStay et al., 2008). Die Aktivierung von Caspase-10 in der Oxaliplatin-induzierten Apoptose wurde hier nicht untersucht, aber andere Studien konnten nachweisen (Seol et al., 2001; Sprick et al., 2002), dass Caspase-10 in unterschiedlichen Modellen eine Caspase-8-Defizienz nicht kompensieren kann. Deshalb ist eine hauptsächlich von Caspase-3- und -8-vermittelte Bidspaltung in den HeLa-Zellen nach Oxaliplatin-Exposition anzunehmen.

7.7.2 Calpain-vermittelte Bidspaltung

Oxaliplatin induziert in HeLa-Zellen neben der Caspase- auch eine Calpain-abhängige Bidspaltung. Darauf weisen die Experimente in den Bid-profizienten HeLa- und MCF-7-Zellen hin, in denen nach Vorinkubation mit dem Calpaininhibitor Calpeptin weniger tBid nachweisbar ist (Abb. 35, 41 und Daten nicht gezeigt). Da Calpaine an der Caspaseaktivierung beteiligt sind, könnte dieses Resultat auch auf eine reduzierte Caspaseaktivität, bedingt durch die Calpaininhibierung, zurückzuführen sein. Gegen einen indirekten Effekt sprechen allerdings die Ergebnisse mit dem adenoviral überexprimierten wt- bzw. mutanten Bid (Abb. 41). Oxaliplatin induziert eine Spaltung beider Bidproteine, obwohl im mutanten Protein durch den Austausch einer AS (D59A) die Schnittstelle der Caspasen-2, -3, -8 und -10 verändert ist (Sarig et al., 2003). Das Bidprotein enthält zwei weitere Schnittstellen, die von Caspase-10 (D^{75}) bzw. von Caspase-3 (D^{98}) erkannt werden und die in

dem hier verwendeten Konstrukt nicht mutiert sind (Fischer et al., 2006; Gross et al., 1999). Durch den Einsatz des Inhibitors zVAD-fmk, der alle apoptotischen Caspasen effektiv hemmt (Garcia-Calvo et al., 1998), die Spaltung von Bid dadurch aber nicht verhindert, kann die Nutzung der beiden weiter C-terminal gelegenen Schnittstellen ausgeschlossen werden. Die Daten mit zVAD-fmk bestätigen außerdem (Abb. 41), dass es sich bei der verminderten Bidspaltung nach Calpeptin-Behandlung nicht um einen indirekten, Caspase-abhängigen Effekt handelt, so dass Calpaine in diesem Modell an der Bidprozessierung beteiligt sind.

7.7.3 Bid trägt zur mitochondrialen Depolarisierung bei

Die initiale $\Delta\Psi_M$-Abnahme ist eine Folge des mitochondrialen Cytc-Verlusts und kann als Indikator für MOMP und die Freisetzung der Caspase-aktivierenden Proteine aus den Mitochondrien genutzt werden (Dussmann et al., 2003; Rehm et al., 2003; Varnes et al., 1999). Wie der Vergleich Bid-profizienter und -depletierter Hela-DEVD-Zellen zeigt, ist Bid an der Oxaliplatin-induzierten Permeabilisierung der Mitochondrien beteiligt (Abb. 39). Der Beitrag des Caspase-prozessierten Bidmoleküls zu MOMP ist allerdings marginal. Zum einen sind Caspasen erst postmitochondrial aktiv (Abb. 31, 39), so dass auch die Spaltung von Bid erst im *feedback loop downstream* der Mitochondrien erfolgen kann. Zum anderen beeinflusst eine Inhibierung aller Caspasen durch zVAD-fmk die mitochondriale Depolarisierung nicht (Abb. 39). Calpaine dagegen sind bereits vor MOMP aktiv (Abb. 39). Neben der Calpain-abhängigen Bidaktivierung könnte auch FL-Bid die $\Delta\Psi_M$-Reduktion verursachen (Luo et al., 1998; Ward et al., 2006). Zur Klärung dieser Frage wurde untersucht, ob in Bcl-2-überexprimierenden Zellen eine Bidspaltung nachweisbar ist, die durch Vorbehandlung mit Calpeptin verhindert wird. In Oxaliplatin-behandelten HeLa-Bcl-2-Zellen war tBid nicht zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnte auch in Kontrollexperimenten mit dem Todesrezeptor-Stimulus TRAIL, der eine effektive, Caspase-8-abhängige Bidspaltung oberhalb der Mitochondrien induziert, das Bidfragment in HeLa-Bcl-2-Zellen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Da sehr geringe tBid-Konzentrationen ausreichen, um MOMP zu induzieren (Madesh et al., 2002) und die Halbwertszeit des Bidfragments durch den Abbau im Proteasom begrenzt wird (Breitschopf et al., 2000), wird in vielen Zellen erst im postmitochondrialen *feedback loop* genügend tBid gebildet, das im Western Blot detektiert werden kann (Werner et al., 2004). Während die Experimente in den HeLa-Bcl-2-Zellen zwischen Calpain-prozessiertem oder FL-Bid nicht differenzieren können, weisen die Daten in den DEVD-FRET-Zellen auf eine Calpain-abhängige Bidaktivierung *upstream* der Mitochondrien hin.

Oxaliplatin vermindert häufiger in Bid-profizienten als in Bid-depletierten HeLa-DEVD-Zellen das $\Delta\Psi_M$, doch die signifikanten Unterschiede zwischen beiden Zelllinien werden durch Vorbehandlung mit Calpeptin aufgehoben (Abb. 39). Außerdem kann der Calpaininhibitor in den Bid kd-Zellen die Protektion nicht mehr signifikant steigern (Abb. 39). Beides zeigt, dass die protektiven Effekte des Bid kds und der Calpaininhibition nicht additiv sind und weist darauf hin, dass Calpaine und Bid nicht in zwei unabhängigen, sondern in derselben Signalkaskade mitwirken.

7.7.4 Unterschiede zwischen der Calpain- und der Caspase-vermittelten Bidspaltung

Calpaine und Caspasen prozessieren das Bidprotein in einem unstrukturierten *loop* zwischen Helix-2 und -3, allerdings unterscheiden sich ihre Spaltspezifitäten (siehe S. 21) (Yin, 2006). Während die Caspasen nach drei konservierten Aspartatresten schneiden, wurden für die konventionellen Calpaine bisher zwei Schnittstellen (nach Tyr^{54} und Gly^{70}) identifiziert (Chen et al., 2001; Gil-Parrado et al., 2002). Dabei entstehen trunkierte Bidmoleküle, die mit Ausnahme des nach D^{98} gespaltenen Fragments eine funktionelle BH3-Domäne aufweisen und eine Cytc-Freisetzung induzieren können (Gross et al., 1999; Yin, 2006). Die Unterschiede in der Spaltstelle und der N-terminalen AS beeinflussen aber die Aktivierbarkeit und die biologische Aktivität von Bid.

Bid wird von Proteinkinase CK1 und CK2 an Serin- und Threoninresten phosphoryliert, die sich im unstrukturierten Bereich des Moleküls befinden. Diese Phosphorylierungen in der Nähe der Hauptcaspaseschnittstelle behindern die Caspase-8-abhängige Spaltung von Bid *in vitro* und reduzieren die Todesrezeptor-induzierte Apoptose *in vivo* (Degli Esposti et al., 2003; Desagher et al., 2001). Eine sterische Blockade der Calpainschnittstellen durch die Phosphatgruppen wurde noch nicht untersucht. Da Calpaine weiter N- bzw. C-terminal schneiden, ist anzunehmen, dass sich die posttranslationale Kontrolle der Calpain- und der Caspase-abhängigen Bidspaltung unterscheidet. Zytostatika wie Oxaliplatin, die Proteasen mit unterschiedlicher Spaltspezifität aktivieren, sollten deshalb die Effizienz der Bidaktivierung erhöhen.

Eine Prozessierung an der wichtigsten Caspaseschnittstelle D^{60} generiert ein Bidmolekül, das am Glycin seines neuen N-Terminus myristoyliert wird. Diese Modifikation beschleunigt die Translokation zu und die Insertion in die Mitochondrienmembran und erhöht die proapoptotische Aktivität um den Faktor 350 (Zha et al., 2000). Es ist davon auszugehen, dass in der Oxaliplatin-induzierten Apoptose zunächst Calpain-gespaltenes Bid entsteht (siehe S.

144). Da ihnen das N-terminale Glycin fehlt, findet eine Myristoylierung dieser Fragmente nicht statt, doch auch sie induzieren die Freisetzung Caspase-aktivierender Proteine aus den Mitochondrien (Chen et al., 2001; Gil-Parrado et al., 2002). Ob anstelle der Myristoylierung andere posttranslationale Modifikationen vorgenommen werden, die die Translokation beschleunigen, oder ob Calpain-gespaltenes Bid eine geringere Effizienz aufweist, ist noch nicht geklärt.

Bid ist eines der wenigen BH3-only Proteine, das mit Bax und Bak direkt interagieren kann (Cartron et al., 2004; Kuwana et al., 2005). Die Caspase-10-Schnittstelle des Bidmoleküls, D^{75}, wird auch von der Serinprotease Granzym B erkannt (Fischer et al., 2006; Li et al., 1998). Studien in Krebszellen konnten zeigen, dass Granzym B-geschnittenes Bid bevorzugt Bax aktiviert, während D^{60}-Bid eine Präferenz für Bak aufweist (Cartron et al., 2003; Wang et al., 2001). Da die hier untersuchten HeLa-Zellen Bax- und Bak-profizient sind (Abb. 14), ist es bedeutungslos, ob die Calpain-prozessierten Bidfragmente bestimmte Proteine der Bcl-2-Familie bevorzugen. Für einen gezielten Einsatz von Oxaliplatin in Bax- oder Bak-defizienten Tumoren dagegen wäre es interessant zu untersuchen, ob sich die Präferenzen des Calpain- und des Caspase-generierten tBids unterscheiden.

7.8 Puma und Bid vermitteln die Oxaliplatin-induzierte Caspaseaktivierung

In murinen Hepatozyten, deren Bidgen ausgeschaltet ist, erfolgt nach Fas-Stimulation weder eine Cytc-Freisetzung noch eine Effektorcaspase-Aktivierung (Yin et al., 1999). Diese Zellen sind durch die Deletion eines einzigen BH3-only Proteins vor der Fas-induzierten Apoptose geschützt. Eine vergleichbare Apoptoseprotektion ergaben die Experimente mit anti-Fas-behandelten, Bid-depletierten HeLa-Zellen in dieser Arbeit (Abb. 15-17). Abhängig von dem verwendeten Apoptosestimulus und dem untersuchten Zelltyp trägt dagegen mehr als ein BH3-only Protein zur Permeabilisierung der Mitochondrienmembran bei. Werden Mausfibroblasten mit dem Topoisomerase-Inhibitor Etoposid behandelt oder die Thymozytenzahl γ-IR-bestrahlter Mäuse bestimmt, weisen Puma- oder Noxa-deletierte Zellen eine geringere Resistenz als die Puma-/Noxa-Doppel-*knock out* Zellen auf (Michalak et al., 2008).

Wie die Experimente in dieser Arbeit zeigen, wird auch die Oxaliplatin-induzierte Effektorcaspase-Aktivierung in HeLa-Zellen von mindestens zwei BH3-only Proteinen vermittelt. Zum Zeitpunkt der Bid- und der Caspaseaktivierung ist zum einen die Puma-mRNA signifikant erhöht und zum anderen kann eine Puma-spezifische siRNA die Resistenz Bid-profizienter und Bid-depletierter Zellen weiter steigern (Abb. 43). Diese Ergebnisse

bestätigen und erweitern eine Studie von Wang el al., in der die Apoptose Puma-depletierter Kolonkarzinomzellen nach Oxaliplatin-Behandlung im Vergleich zu Puma-profizienten Zellen signifikant geringer ausfällt, in der aber die Beteiligung weiterer BH3-only Proteine nicht untersucht wurde (Wang et al., 2006).

Im Gegensatz zu Bid wird Puma nicht durch posttranskriptionelle Modifikationen wie proteolytische Spaltung oder Phosphorylierung, sondern transkriptionell reguliert (Han et al., 2001; Nakano and Vousden, 2001; Yu et al., 2001). Auch in den HeLa-Zellen ist eine Oxaliplatin-induzierte Steigerung der Transkriptionsrate wahrscheinlich, wobei Mechanismen, die zur Stabilisierung der Puma-spezifischen mRNA führen, ebenfalls beitragen könnten.

In der bereits zitierten Arbeit von Wang et al. führt die Inhibierung der *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) durch Oxaliplatin zur Erhöhung der Puma-mRNA (Wang et al., 2006), während Daten Cisplatin-behandelter Karzinomzelllinien eine p53-vermittelte Puma-Induktion zeigen (Fraser et al., 2008; Jiang et al., 2006a). HeLa-Zellen sind zwar mit dem humanen Papillomvirus (HPV) 18 infiziert und exprimieren die Onkogene E6 und E7, welche die Tumorsuppressorproteine p53 bzw. Retinoblastom (pRb) binden und deren Ubiquitin-vermittelte Degradierung im Proteasom veranlassen (siehe S. 135) (Munger and Howley, 2002), aber Oxaliplatin-Behandlung reduziert die E6-mRNA, stabilisiert p53 und induziert p53-Reportergen-Aktivität in HeLa-Zellen (Koivusalo et al., 2002). Auch in den hier untersuchten Bid kd- und Kontrollzellen steigert Oxaliplatin die mRNA des p53 Zielgens p21 (Daten nicht gezeigt), so dass eine p53-abhängige Puma-Aktivierung möglich ist.

Ein weiterer, p53-unabhängiger, Aktivierungsweg ist über den Transkriptionsfaktor E2F1 vorstellbar, der durch Komplexierung mit hypophosphoryliertem pRB inaktiviert wird (Chellappan et al., 1991; Stevaux and Dyson, 2002). Die HPV 18-vermittelte E7-Expression in HeLa-Zellen inaktiviert pRB durch proteasomalen Abbau und setzt dadurch E2F1 frei, das den Puma-Promotor binden und transaktivieren kann (Hershko and Ginsberg, 2004; zur Hausen, 2000). Eine Studie in p53-defizienten Mausfibroblasten konnte außerdem nachweisen, dass Cisplatin eine E2F1-abhängige Puma-Aktivierung induziert (Hershko and Ginsberg, 2004). Diese Arbeiten weisen darauf hin, dass p53 und E2F1 auch in Oxaliplatin-behandelten HeLa-Zellen zur Regulation des Puma-Promotors beitragen könnten.

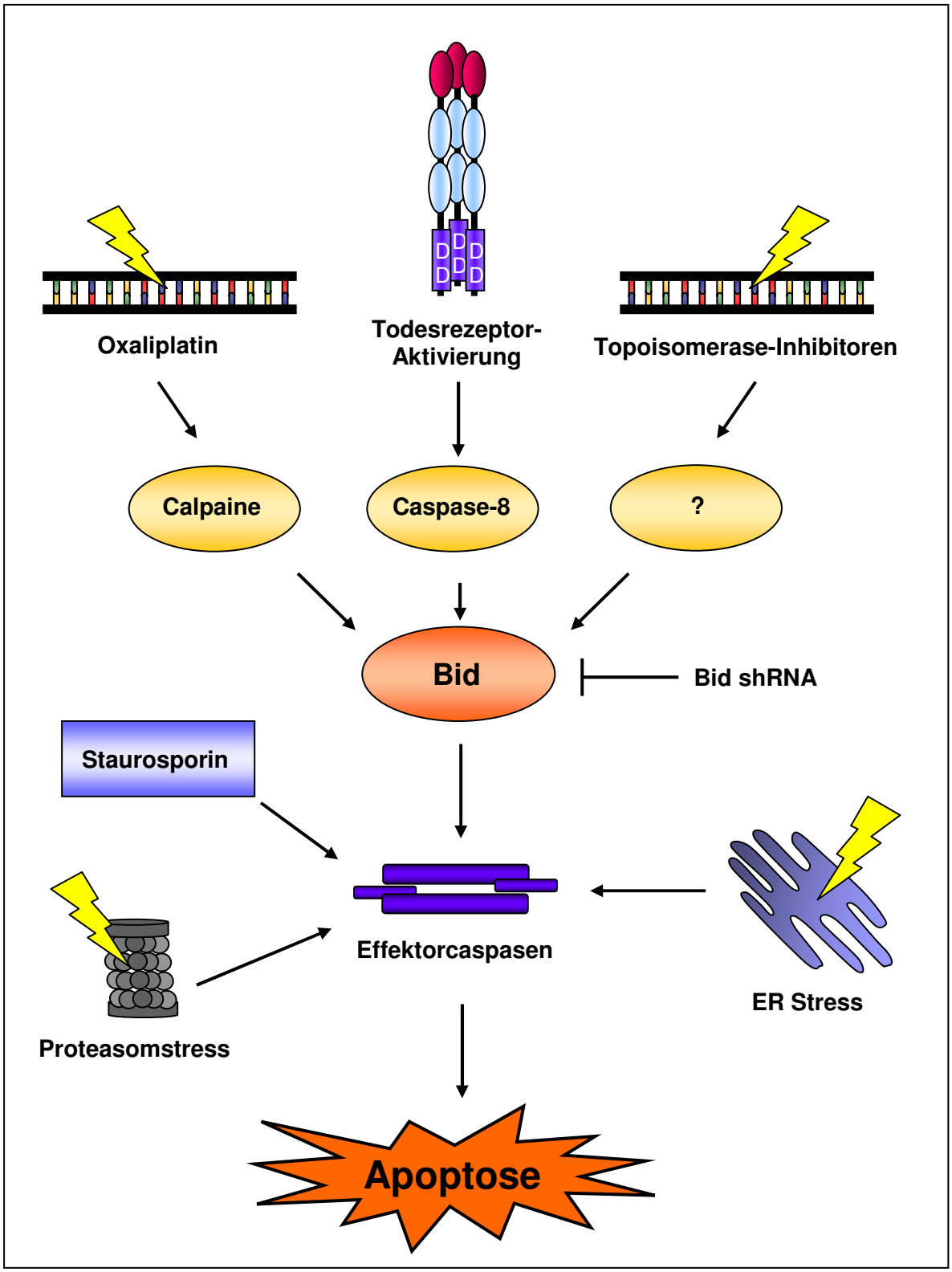

Abbildung 44: Zusammenfassung der Bid-vermittelten und Bid-unabhängigen Apoptosemodelle dieser Arbeit.
Neben der klassischen, Caspase-8-vermittelten Bidaktivierung nach Stimulation der Todesrezeptoren Fas, TRAIL-R1/-R2 und TNF-R1 ist Bid in humanen HeLa-Zervixkarzinomzellen auch Teil der apoptotischen Signalkaskade nach DNA-Schädigung, die durch Oxaliplatin und die Topoisomerase-Inhibitoren Doxorubicin und Etoposid ausgelöst wird. Die ER Stress induzierenden Stimuli Brefeldin A, Thapsigargin und Tunicamycin sowie

der Proteasominhibitor Epoxomicin und der Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin dagegen induzieren Bid-unabhängige Signalkaskaden, so dass die shRNA-vermittelte Depletion von Bid bei diesen Substanzen keinen Einfluss auf die Effektorcaspase-Aktivierung und die Zelltodrate der HeLa-Zellen nimmt.

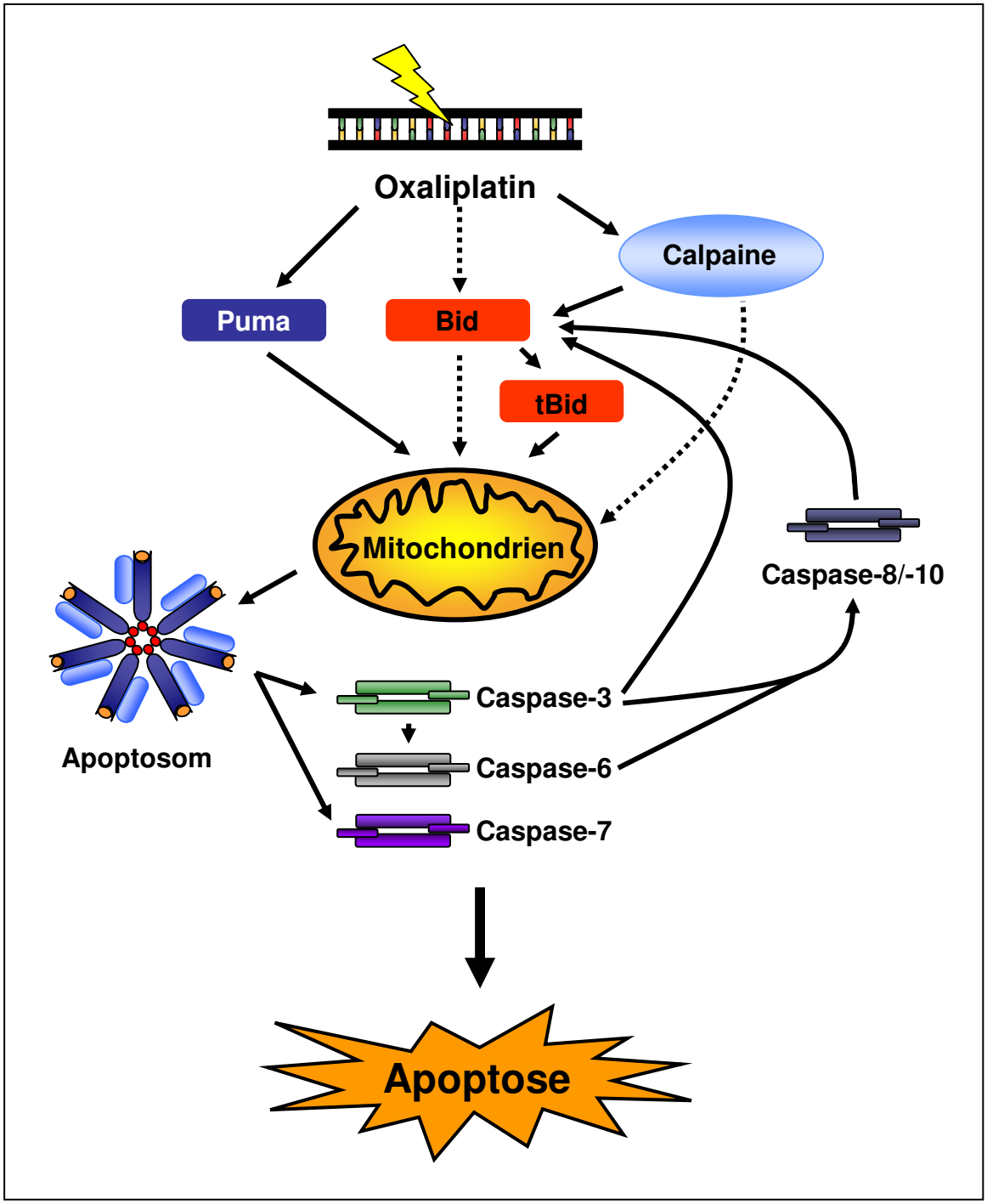

Abbildung 45: Modell der Oxaliplatin-induzierten Apoptose in HeLa-Zervixkarzinomzellen.
In HeLa-Zellen erhöht Oxaliplatin-Behandlung die Expression des BH3-only Proteins Puma transkriptionell und induziert eine Calpain-abhängige Bidspaltung. Die Aktivierung der BH3-only Proteine führt zu einer Bak-/Bax-vermittelten Permeabilisierung der Mitochondrien und zur Aktivierung der Initiatorcaspase-9 am Apoptosom, der die Prozessierung der Effektorcaspasen-3, -7 und -6 folgt, die eine Vielzahl von Substraten spalten und damit die Auflösung der Zelle einleiten. Zu den Substraten von Caspase-3 zählen außerdem Bid und die Caspase-8 und -10, deren Spaltung die mitochondriale Permeabilisierung und die Effektorcaspase-Aktivierung beschleunigt.

VI. Zusammenfassung

Chemotherapie entfaltet ihre Wirkung auf Tumorzellen vielfach über die Induktion von Apoptose. Wichtige Regulatoren der intrinsischen Apoptose sind die Proteine der Bcl-2-Familie. Als BH3-only Protein zählt Bid zu den proapoptotischen Mitgliedern der Familie. Dabei ist die Beteiligung von Bid an der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose gut charakterisiert, während seine Bedeutung für die Aktivierung der intrinsischen Apoptose bisher als ungesichert gilt, da Studien in humanen und murinen Primärzellen und Zelllinien widersprüchlich ausfielen. Ziel dieser Arbeit war es daher, die gut charakterisierte Zervixkarzinomzelllinie HeLa als humanes Referenzsystem zu nutzen, um die Bedeutung Bid-abhängiger Signalkaskaden für die Apoptoseinduktion durch diverse intrinsische Stressoren, darunter konventionelle sowie neuartige Chemotherapeutika, zu klären.

Dazu wurden HeLa-Zelllinien generiert, in denen die Bidexpression durch RNA-Interferenz stabil herunterreguliert wird. HeLa-Zellen gehören zu den sog. Typ II-Zellen, in denen die Bid-vermittelte Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs für eine effiziente Effektorcaspase-Aktivierung nach Todesrezeptorstimulation notwendig ist. Dementsprechend wiesen die Bid-depletierten Zellen nach Fas/CD95-, TRAIL- oder TNF-α-Exposition nur eine geringe Effektorcaspase-Aktivität und Apoptoserate auf, die mit einer signifikanten Proliferationsfähigkeit in Koloniebildungsassays korrelierte. Da die Protektion der Bid *knock down* (kd) Zellen vor Todesrezeptor-vermitteltem Zelltod durch ektopische Bidexpression aufgehoben wurde, konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um Bid-spezifische Effekte handelte.

Untersuchungen mit dem Proteasominhibitor Epoxomicin, dem Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin oder den ER Stress induzierenden Agenzien Tunicamycin, Thapsigargin und Brefeldin A ergaben, dass diese Stress-Stimuli in HeLa-Zellen einen Bid-unabhängigen Zelltod auslösen.

ER Stress konnte HeLa-Zellen aber für die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose sensitivieren. Die Synergie zwischen subletalen Tunicamycin- oder Thapsigargindosen und subtoxischen TRAIL-Konzentrationen war nur in Bid-profizienten Zellen nachweisbar und von der durch ER Stress induzierten Proteinsynthese abhängig. Tunicamycin steigerte spezifisch die Expression des agonistischen TRAIL-Rezeptors-2 (DR5) und ein transienter *knock down* dieses Rezeptors reduzierte die Caspaseaktivität nach kombinierter Tunicamycin- und TRAIL-Behandlung signifikant. Damit konnte gezeigt werden, dass die Sensitivierung auf einer ER Stress-vermittelten Amplifizierung des Todesrezeptorwegs beruht, zu der die

Tunicamycin-induzierte Steigerung der DR5-Expression signifikant beiträgt, so dass eine Blockade der nachgeschalteten Signalkaskade durch den Bid kd die Synergie aufhebt.

Zudem konnte gezeigt werden, dass Bid-depletierte Zellen signifikant vor gentoxischem Stress geschützt waren, der durch die Behandlung mit dem Platinderivat Oxaliplatin oder den Topoisomerase-Inhibitoren Etoposid und Doxorubicin induziert wurde. Weitergehende Untersuchungen der Oxaliplatin-induzierten Signalkaskade ergaben, dass die Bid kd-Zellen im Vergleich zu den Bid-profizienten Zellen eine verzögerte Caspase-2-, -3-, -8- und -9-Aktivierung aufwiesen, die mit einer signifikant geringeren Apoptose- und einer erhöhten Proliferationsrate der Bid-depletierten Zellen einherging. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass neben Bid ein weiteres BH3-only Protein, Puma, zur Oxaliplatin-induzierten Apoptose beiträgt, da eine PUMA-spezifische siRNA unabhängig vom Bidstatus der Zellen protektiv wirkte.
Durch Experimente mit Bcl-2-überexprimierenden Zellen, in denen nach Oxaliplatin-Behandlung keine Caspaseaktivierung nachweisbar war, wurde gezeigt, dass Caspasen in diesem Apoptosemodell erst postmitochondrial aktiviert werden. Dies bestätigten Untersuchungen, in denen der Caspaseinhibitor zVAD-fmk in DEVD-FRET-Zellen zwar die FRET-Spaltung, nicht aber die mitochondriale Depolarisierung verhindern konnte.
Da Bid-depletierte Zellen nach Oxaliplatin-Exposition im Vergleich zu Kontrollzellen ein signifikant höheres mitochondriales Membranpotential aufwiesen, deutete dies auf eine Caspase-unabhängige Bidaktivierung *upstream* der Mitochondrien hin. Dieser Befund wurde durch Experimente in Bid kd-Zellen unterstützt, in denen eine induzierbare Bidmutante (D59A) exprimiert wurde, die von den Caspasen-2, -3 und -8 nicht geschnitten werden kann. Während das Caspase-unspaltbare Bid den Wildtyp in der Todesrezeptor-induzierten Apoptose nicht ersetzen konnte, vermittelte es in Bid kd Zellen die Caspaseaktivierung nach Oxaliplatin-Exposition.
Früher als Caspasen aktivierte Oxaliplatin Mitglieder einer anderen Proteasefamilie, die konventionellen Calpaine. Dies zeigten Experimente mit dem Calpaininhibitor Calpeptin, der nicht nur die Bid- und Caspasespaltung, sondern auch die mitochondriale Depolarisierung signifikant reduzierte. Die Protektion durch Calpeptin fiel in Bid-depletierten Zellen signifikant geringer aus als in Bid-profizienten Kontrollen. Auch war in Oxaliplatin-behandelten Bid kd-Zellen, welche die Bidmutante D59A exprimierten, tBid nachweisbar, dessen Generierung durch Calpain-, aber nicht durch Caspaseinhibierung verhindert werden konnte. Diese Ergebnisse deuten auf eine Calpain-abhängige Bidaktivierung *upstream* der

Mitochondrien hin und zeigen, dass die BH3-only Proteine Bid und Puma wichtige Vermittler der Oxaliplatin-induzierten Apoptose in HeLa-Zellen darstellen.

Insgesamt handelt es sich bei dieser Promotionsarbeit um die erste umfassende Studie in einer humanen Karzinomzelllinie, in der verschiedene Klassen Apoptose-induzierender Substanzen auf ihre Abhängigkeit von Bid-vermittelten Signalkaskaden untersucht wurden. Die Ergebnisse legen nahe, dass Bid maßgeblich zum Erfolg von Kombinationstherapien mit dem Todesrezeptor-Liganden TRAIL beiträgt und dass die DNA-schädigenden Agenzien Etoposid, Doxorubicin und Oxaliplatin, die eine wichtige Säule vieler Chemotherapie-Protokolle darstellen, Bid-abhängig Apoptose auslösen. Eine wichtige Aufgabe nachfolgender Studien wäre es, diese Untersuchungen auf andere Karzinomzelllinien und primäres Tumorgewebe auszuweiten.

VII. Literatur

Abdelrahim, M., K. Newman, K. Vanderlaag, I. Samudio, and S. Safe. 2006. 3,3'-diindolylmethane (DIM) and its derivatives induce apoptosis in pancreatic cancer cells through endoplasmic reticulum stress-dependent upregulation of DR5. *Carcinogenesis*. 27:717-28.

Acehan, D., X. Jiang, D.G. Morgan, J.E. Heuser, X. Wang, and C.W. Akey. 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*. 9:423-32.

Adams, J. 2004. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*. 4:349-60.

Adams, J., V.J. Palombella, E.A. Sausville, J. Johnson, A. Destree, D.D. Lazarus, J. Maas, C.S. Pien, S. Prakash, and P.J. Elliott. 1999. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res*. 59:2615-22.

Alnemri, E.S., D.J. Livingston, D.W. Nicholson, G. Salvesen, N.A. Thornberry, W.W. Wong, and J. Yuan. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. 87:171.

Ashkenazi, A., and R.S. Herbst. 2008. To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *J Clin Invest*. 118:1979-90.

Ashkenazi, A., R.C. Pai, S. Fong, S. Leung, D.A. Lawrence, S.A. Marsters, C. Blackie, L. Chang, A.E. McMurtrey, A. Hebert, L. DeForge, I.L. Koumenis, D. Lewis, L. Harris, J. Bussiere, H. Koeppen, Z. Shahrokh, and R.H. Schwall. 1999. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest*. 104:155-62.

Ballestrero, A., A. Nencioni, D. Boy, I. Rocco, A. Garuti, G.S. Mela, L. Van Parijs, P. Brossart, S. Wesselborg, and F. Patrone. 2004. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand cooperates with anticancer drugs to overcome chemoresistance in antiapoptotic Bcl-2 family members expressing jurkat cells. *Clin Cancer Res*. 10:1463-70.

Bao, Q., and Y. Shi. 2007. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ*. 14:56-65.

Barnhart, B.C., P. Legembre, E. Pietras, C. Bubici, G. Franzoso, and M.E. Peter. 2004. CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *Embo J*. 23:3175-85.

Barry, M., J.A. Heibein, M.J. Pinkoski, S.F. Lee, R.W. Moyer, D.R. Green, and R.C. Bleackley. 2000. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol*. 20:3781-94.

Berger, J.M., S.J. Gamblin, S.C. Harrison, and J.C. Wang. 1996. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature*. 379:225-32.

Biedler, J.L., L. Helson, and B.A. Spengler. 1973. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*. 33:2643-52.

Birnboim, H.C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 7:1513-23.

Blomgren, K., C. Zhu, X. Wang, J.O. Karlsson, A.L. Leverin, B.A. Bahr, C. Mallard, and H. Hagberg. 2001. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem*. 276:10191-8.

Boatright, K.M., C. Deis, J.B. Denault, D.P. Sutherlin, and G.S. Salvesen. 2004. Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L). *Biochem J*. 382:651-7.

Boatright, K.M., and G.S. Salvesen. 2003. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*. 15:725-31.

Boccadoro, M., G. Morgan, and J. Cavenagh. 2005. Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy. *Cancer Cell Int*. 5:18.

Boese, Q., D. Leake, A. Reynolds, S. Read, S.A. Scaringe, W.S. Marshall, and A. Khvorova. 2005. Mechanistic insights aid computational short interfering RNA design. *Methods Enzymol*. 392:73-96.

Bonzon, C., L. Bouchier-Hayes, L.J. Pagliari, D.R. Green, and D.D. Newmeyer. 2006. Caspase-2-induced apoptosis requires bid cleavage: a physiological role for bid in heat shock-induced death. *Mol Biol Cell*. 17:2150-7.

Bossy-Wetzel, E., and D.R. Green. 1999. Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *J Biol Chem*. 274:17484-90.

Boudny, V., O. Vrana, F. Gaucheron, V. Kleinwachter, M. Leng, and V. Brabec. 1992. Biophysical analysis of DNA modified by 1,2-diaminocyclohexane platinum(II) complexes. *Nucleic Acids Res*. 20:267-72.

Boulikas, T., and M. Vougiouka. 2003. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). *Oncol Rep*. 10:1663-82.

Bouralexis, S., D.M. Findlay, and A. Evdokiou. 2005. Death to the bad guys: targeting cancer via Apo2L/TRAIL. *Apoptosis*. 10:35-51.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-54.

Breitschopf, K., A.M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2000. Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bid. A functional consequence on apoptosis induction. *J Biol Chem*. 275:21648-52.

Brummelkamp, T.R., R. Bernards, and R. Agami. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*. 296:550-3.

Burden, D.A., P.S. Kingma, S.J. Froelich-Ammon, M.A. Bjornsti, M.W. Patchan, R.B. Thompson, and N. Osheroff. 1996. Topoisomerase II.etoposide interactions direct the formation of drug-induced enzyme-DNA cleavage complexes. *J Biol Chem*. 271:29238-44.

Cartron, P.F., T. Gallenne, G. Bougras, F. Gautier, F. Manero, P. Vusio, K. Meflah, F.M. Vallette, and P. Juin. 2004. The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol Cell*. 16:807-18.

Cartron, P.F., P. Juin, L. Oliver, S. Martin, K. Meflah, and F.M. Vallette. 2003. Nonredundant role of Bax and Bak in Bid-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol*. 23:4701-12.

Cerretti, D.P., C.J. Kozlosky, B. Mosley, N. Nelson, K. Van Ness, T.A. Greenstreet, C.J. March, S.R. Kronheim, T. Druck, L.A. Cannizzaro, and et al. 1992. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*. 256:97-100.

Chai, J., C. Du, J.W. Wu, S. Kyin, X. Wang, and Y. Shi. 2000. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*. 406:855-62.

Chai, J., E. Shiozaki, S.M. Srinivasula, Q. Wu, P. Datta, E.S. Alnemri, and Y. Shi. 2001a. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell*. 104:769-80.

Chai, J., Q. Wu, E. Shiozaki, S.M. Srinivasula, E.S. Alnemri, and Y. Shi. 2001b. Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding. *Cell*. 107:399-407.

Chang, D.W., Z. Xing, V.L. Capacio, M.E. Peter, and X. Yang. 2003. Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *Embo J*. 22:4132-42.

Chang, D.W., Z. Xing, Y. Pan, A. Algeciras-Schimnich, B.C. Barnhart, S. Yaish-Ohad, M.E. Peter, and X. Yang. 2002. c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *Embo J*. 21:3704-14.

Chao, Y., E.N. Shiozaki, S.M. Srinivasula, D.J. Rigotti, R. Fairman, and Y. Shi. 2005. Engineering a dimeric caspase-9: a re-evaluation of the induced proximity model for caspase activation. *PLoS Biol*. 3:e183.

Chellappan, S.P., S. Hiebert, M. Mudryj, J.M. Horowitz, and J.R. Nevins. 1991. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*. 65:1053-61.

Chen, L., S.N. Willis, A. Wei, B.J. Smith, J.I. Fletcher, M.G. Hinds, P.M. Colman, C.L. Day, J.M. Adams, and D.C. Huang. 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*. 17:393-403.

Chen, L.H., C.C. Jiang, K.A. Kiejda, Y.F. Wang, R.F. Thorne, X.D. Zhang, and P. Hersey. 2007. Thapsigargin sensitizes human melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulation of TRAIL-R2 through the unfolded protein response. *Carcinogenesis*. 28:2328-36.

Chen, M., H. He, S. Zhan, S. Krajewski, J.C. Reed, and R.A. Gottlieb. 2001. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem*. 276:30724-8.

Cheng, E.H., T.V. Sheiko, J.K. Fisher, W.J. Craigen, and S.J. Korsmeyer. 2003. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*. 301:513-7.

Chou, J.J., H. Li, G.S. Salvesen, J. Yuan, and G. Wagner. 1999. Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell*. 96:615-24.

Chua, B.T., K. Guo, and P. Li. 2000. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J Biol Chem*. 275:5131-5.

Cirman, T., K. Oresic, G.D. Mazovec, V. Turk, J.C. Reed, R.M. Myers, G.S. Salvesen, and B. Turk. 2004. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *J Biol Chem*. 279:3578-87.

Clancy, L., K. Mruk, K. Archer, M. Woelfel, J. Mongkolsapaya, G. Screaton, M.J. Lenardo, and F.K. Chan. 2005. Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:18099-104.

Concannon, C.G., B.F. Koehler, C. Reimertz, B.M. Murphy, C. Bonner, N. Thurow, M.W. Ward, A. Villunger, A. Strasser, D. Kogel, and J.H. Prehn. 2007. Apoptosis induced by proteasome inhibition in cancer cells: predominant role of the p53/PUMA pathway. *Oncogene*. 26:1681-92.

Danial, N.N. 2007. BCL-2 Family Proteins: Critical Checkpoints of Apoptotic Cell Death. *Clin Cancer Res*. 13:7254-63.

Das, G., D. Henning, D. Wright, and R. Reddy. 1988. Upstream regulatory elements are necessary and sufficient for transcription of a U6 RNA gene by RNA polymerase III. *Embo J*. 7:503-12.

Degli-Esposti, M.A., W.C. Dougall, P.J. Smolak, J.Y. Waugh, C.A. Smith, and R.G. Goodwin. 1997a. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity*. 7:813-20.

Degli-Esposti, M.A., P.J. Smolak, H. Walczak, J. Waugh, C.P. Huang, R.F. DuBose, R.G. Goodwin, and C.A. Smith. 1997b. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med*. 186:1165-70.

Degli Esposti, M., G. Ferry, P. Masdehors, J.A. Boutin, J.A. Hickman, and C. Dive. 2003. Post-translational modification of Bid has differential effects on its susceptibility to cleavage by caspase 8 or caspase 3. *J Biol Chem*. 278:15749-57.

Degterev, A., M. Boyce, and J. Yuan. 2003. A decade of caspases. *Oncogene*. 22:8543-67.

Dempsey, P.W., S.E. Doyle, J.Q. He, and G. Cheng. 2003. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*. 14:193-209.

Denault, J.B., B.P. Eckelman, H. Shin, C. Pop, and G.S. Salvesen. 2007. Caspase 3 attenuates XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)-mediated inhibition of caspase 9. *Biochem J*. 405:11-9.

Desagher, S., A. Osen-Sand, S. Montessuit, E. Magnenat, F. Vilbois, A. Hochmann, L. Journot, B. Antonsson, and J.C. Martinou. 2001. Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell*. 8:601-11.

Desagher, S., A. Osen-Sand, A. Nichols, R. Eskes, S. Montessuit, S. Lauper, K. Maundrell, B. Antonsson, and J.C. Martinou. 1999. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*. 144:891-901.

Deveraux, Q.L., N. Roy, H.R. Stennicke, T. Van Arsdale, Q. Zhou, S.M. Srinivasula, E.S. Alnemri, G.S. Salvesen, and J.C. Reed. 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J*. 17:2215-23.

Ding, L., S.L. McFadden, and R.J. Salvi. 2002. Calpain immunoreactivity and morphological damage in chinchilla inner ears after carboplatin. *J Assoc Res Otolaryngol*. 3:68-79.

Distelhorst, C.W., and T.S. McCormick. 1996. Bcl-2 acts subsequent to and independent of Ca2+ fluxes to inhibit apoptosis in thapsigargin- and glucocorticoid-treated mouse lymphoma cells. *Cell Calcium*. 19:473-83.

Donaldson, J.G., D. Cassel, R.A. Kahn, and R.D. Klausner. 1992a. ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatomer protein beta-COP to Golgi membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:6408-12.

Donaldson, J.G., D. Finazzi, and R.D. Klausner. 1992b. Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature*. 360:350-2.

Donepudi, M., A. Mac Sweeney, C. Briand, and M.G. Grutter. 2003. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell*. 11:543-9.

Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 102:33-42.

Dussmann, H., M. Rehm, D. Kogel, and J.H. Prehn. 2003. Outer mitochondrial membrane permeabilization during apoptosis triggers caspase-independent mitochondrial and caspase-dependent plasma membrane potential depolarization: a single-cell analysis. *J Cell Sci*. 116:525-36.

Eckelman, B.P., G.S. Salvesen, and F.L. Scott. 2006. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep*. 7:988-94.

Ehrenberg, B., V. Montana, M.D. Wei, J.P. Wuskell, and L.M. Loew. 1988. Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. *Biophys J*. 53:785-94.

Ekoff, M., T. Kaufmann, M. Engstrom, N. Motoyama, A. Villunger, J.I. Jonsson, A. Strasser, and G. Nilsson. 2007. The BH3-only protein Puma plays an essential role in cytokine deprivation induced apoptosis of mast cells. *Blood*. 110:3209-17.

Emery, J.G., P. McDonnell, M.B. Burke, K.C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E.R. Appelbaum, C. Eichman, R. DiPrinzio, R.A. Dodds, I.E. James, M. Rosenberg, J.C. Lee, and P.R. Young. 1998. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem*. 273:14363-7.

Engels, I.H., A. Stepczynska, C. Stroh, K. Lauber, C. Berg, R. Schwenzer, H. Wajant, R.U. Janicke, A.G. Porter, C. Belka, M. Gregor, K. Schulze-Osthoff, and S. Wesselborg. 2000. Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene*. 19:4563-73.

Erlacher, M., E.M. Michalak, P.N. Kelly, V. Labi, H. Niederegger, L. Coultas, J.M. Adams, A. Strasser, and A. Villunger. 2005. BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood*. 106:4131-8.

Erler, J.T., C.J. Cawthorne, K.J. Williams, M. Koritzinsky, B.G. Wouters, C. Wilson, C. Miller, C. Demonacos, I.J. Stratford, and C. Dive. 2004. Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol*. 24:2875-89.

Faleiro, L., R. Kobayashi, H. Fearnhead, and Y. Lazebnik. 1997. Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells. *Embo J*. 16:2271-81.

Falschlehner, C., C.H. Emmerich, B. Gerlach, and H. Walczak. 2007. TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol*. 39:1462-75.

Felgner, J.H., R. Kumar, C.N. Sridhar, C.J. Wheeler, Y.J. Tsai, R. Border, P. Ramsey, M. Martin, and P.L. Felgner. 1994. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem*. 269:2550-61.

Felgner, P.L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, and M. Danielsen. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:7413-7.

Fennell, D.A., A. Chacko, and L. Mutti. 2008. BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib. *Oncogene*. 27:1189-97.

Fernandes-Alnemri, T., R.C. Armstrong, J. Krebs, S.M. Srinivasula, L. Wang, F. Bullrich, L.C. Fritz, J.A. Trapani, K.J. Tomaselli, G. Litwack, and E.S. Alnemri. 1996. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:7464-9.

Fernandez, Y., M. Verhaegen, T.P. Miller, J.L. Rush, P. Steiner, A.W. Opipari, Jr., S.W. Lowe, and M.S. Soengas. 2005. Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res*. 65:6294-304.

Fink, D., S. Nebel, S. Aebi, H. Zheng, B. Cenni, A. Nehme, R.D. Christen, and S.B. Howell. 1996. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res*. 56:4881-6.

Fischer, U., R.U. Janicke, and K. Schulze-Osthoff. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*. 10:76-100.

Fischer, U., C. Stroh, and K. Schulze-Osthoff. 2006. Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10. *Oncogene*. 25:152-9.

Förster, T. 1948. Zwischenmolekulare Energieumwandlung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* 6:55-75.

Fraser, M., T. Bai, and B.K. Tsang. 2008. Akt promotes cisplatin resistance in human ovarian cancer cells through inhibition of p53 phosphorylation and nuclear function. *Int J Cancer*. 122:534-46.

Fuentes-Prior, P., and G.S. Salvesen. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*. 384:201-32.

Fujiwara, T., K. Oda, S. Yokota, A. Takatsuki, and Y. Ikehara. 1988. Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 263:18545-52.

Futami, T., M. Miyagishi, and K. Taira. 2005. Identification of a network involved in thapsigargin-induced apoptosis using a library of small interfering RNA expression vectors. *J Biol Chem*. 280:826-31.

Galluzzi, L., M.C. Maiuri, I. Vitale, H. Zischka, M. Castedo, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*. 14:1237-43.

Galonek, H.L., and J.M. Hardwick. 2006. Upgrading the BCL-2 network. *Nat Cell Biol*. 8:1317-9.

Ganten, T.M., T.L. Haas, J. Sykora, H. Stahl, M.R. Sprick, S.C. Fas, A. Krueger, M.A. Weigand, A. Grosse-Wilde, W. Stremmel, P.H. Krammer, and H. Walczak. 2004. Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs. *Cell Death Differ*. 11 Suppl 1:S86-96.

Ganten, T.M., R. Koschny, T.L. Haas, J. Sykora, M. Li-Weber, K. Herzer, and H. Walczak. 2005. Proteasome inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells, but not human hepatocytes, to TRAIL. *Hepatology*. 42:588-97.

Ganten, T.M., R. Koschny, J. Sykora, H. Schulze-Bergkamen, P. Buchler, T.L. Haas, M.B. Schader, A. Untergasser, W. Stremmel, and H. Walczak. 2006. Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs. *Clin Cancer Res*. 12:2640-6.

Gao, Z., Y. Shao, and X. Jiang. 2005. Essential roles of the Bcl-2 family of proteins in caspase-2-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 280:38271-5.

Garcia-Calvo, M., E.P. Peterson, B. Leiting, R. Ruel, D.W. Nicholson, and N.A. Thornberry. 1998. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem*. 273:32608-13.

Garcia-Calvo, M., E.P. Peterson, D.M. Rasper, J.P. Vaillancourt, R. Zamboni, D.W. Nicholson, and N.A. Thornberry. 1999. Purification and catalytic properties of human caspase family members. *Cell Death Differ*. 6:362-9.

Garrido, C., L. Galluzzi, M. Brunet, P.E. Puig, C. Didelot, and G. Kroemer. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*. 13:1423-33.

Gey G., W.C., and M. Kubicek. 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and neuronal epithelium. *Cancer Res*. 12:264-265.

Gil-Parrado, S., A. Fernandez-Montalvan, I. Assfalg-Machleidt, O. Popp, F. Bestvater, A. Holloschi, T.A. Knoch, E.A. Auerswald, K. Welsh, J.C. Reed, H. Fritz, P. Fuentes-Prior, E. Spiess, G.S. Salvesen, and W. Machleidt. 2002. Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. *J Biol Chem*. 277:27217-26.

Golks, A., D. Brenner, C. Fritsch, P.H. Krammer, and I.N. Lavrik. 2005. c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 280:14507-13.

Goll, D.E., V.F. Thompson, H. Li, W. Wei, and J. Cong. 2003. The calpain system. *Physiol Rev*. 83:731-801.

Gritz, L., and J. Davies. 1983. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae. *Gene*. 25:179-88.

Gross, A., X.M. Yin, K. Wang, M.C. Wei, J. Jockel, C. Milliman, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and S.J. Korsmeyer. 1999. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem*. 274:1156-63.

Guerrero, A.D., M. Chen, and J. Wang. 2008. Delineation of the caspase-9 signaling cascade. *Apoptosis*. 13:177-86.

Guo, Y., S.M. Srinivasula, A. Druilhe, T. Fernandes-Alnemri, and E.S. Alnemri. 2002. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem*. 277:13430-7.

Hacker, G., and A. Weber. 2007. BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? *Arch Biochem Biophys*. 462:150-5.

Han, J., C. Flemington, A.B. Houghton, Z. Gu, G.P. Zambetti, R.J. Lutz, L. Zhu, and T. Chittenden. 2001. Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:11318-23.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*. 166:557-80.

Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100:57-70.

Harriman, J.F., X.L. Liu, M.D. Aleo, K. Machaca, and R.G. Schnellmann. 2002. Endoplasmic reticulum Ca(2+) signaling and calpains mediate renal cell death. *Cell Death Differ*. 9:734-41.

He, Q., D.I. Lee, R. Rong, M. Yu, X. Luo, M. Klein, W.S. El-Deiry, Y. Huang, A. Hussain, and M.S. Sheikh. 2002. Endoplasmic reticulum calcium pool depletion-induced apoptosis is coupled with activation of the death receptor 5 pathway. *Oncogene*. 21:2623-33.

Heifetz, A., R.W. Keenan, and A.D. Elbein. 1979. Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc:dolichyl-phosphate Glc-NAc-1-phosphate transferase. *Biochemistry*. 18:2186-92.

Herbert, J.M., E. Seban, and J.P. Maffrand. 1990. Characterization of specific binding sites for [3H]-staurosporine on various protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun*. 171:189-95.

Hershko, T., and D. Ginsberg. 2004. Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem*. 279:8627-34.

Hetschko, H., V. Voss, S. Horn, V. Seifert, J.H. Prehn, and D. Kogel. 2008. Pharmacological inhibition of Bcl-2 family members reactivates TRAIL-induced apoptosis in malignant glioma. *J Neurooncol*. 86:265-72.

Hideshima, T., P. Richardson, D. Chauhan, V.J. Palombella, P.J. Elliott, J. Adams, and K.C. Anderson. 2001. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res*. 61:3071-6.

Hockenbery, D., G. Nunez, C. Milliman, R.D. Schreiber, and S.J. Korsmeyer. 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*. 348:334-6.

Hou, Q., T. Zhao, H. Zhang, H. Lu, Q. Zhang, L. Sun, and Z. Fan. 2008. Granzyme H induces apoptosis of target tumor cells characterized by DNA fragmentation and Bid-dependent mitochondrial damage. *Mol Immunol*. 45:1044-55.

Hougardy, B.M., J.H. Maduro, A.G. van der Zee, D.J. de Groot, F.A. van den Heuvel, E.G. de Vries, and S. de Jong. 2006. Proteasome inhibitor MG132 sensitizes HPV-positive human cervical cancer cells to rhTRAIL-induced apoptosis. *Int J Cancer*. 118:1892-900.

Hsu, Y.T., and R.J. Youle. 1997. Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem*. 272:13829-34.

Hyer, M.L., T. Samuel, and J.C. Reed. 2006. The FLIP-side of Fas signaling. *Clin Cancer Res*. 12:5929-31.

Ibrahim, A., S. Hirschfeld, M.H. Cohen, D.J. Griebel, G.A. Williams, and R. Pazdur. 2004. FDA drug approval summaries: oxaliplatin. *Oncologist*. 9:8-12.

Irmler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J.L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L.E. French, and J. Tschopp. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. 388:190-5.

Jacobson, M.D., J.F. Burne, and M.C. Raff. 1994. Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *Embo J*. 13:1899-910.

Janicke, R.U., M.L. Sprengart, M.R. Wati, and A.G. Porter. 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem*. 273:9357-60.

Jiang, C.C., L.H. Chen, S. Gillespie, K.A. Kiejda, N. Mhaidat, Y.F. Wang, R. Thorne, X.D. Zhang, and P. Hersey. 2007. Tunicamycin sensitizes human melanoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by up-regulation of TRAIL-R2 via the unfolded protein response. *Cancer Res*. 67:5880-8.

Jiang, M., Q. Wei, J. Wang, Q. Du, J. Yu, L. Zhang, and Z. Dong. 2006a. Regulation of PUMA-alpha by p53 in cisplatin-induced renal cell apoptosis. *Oncogene*. 25:4056-66.

Jiang, P., W. Du, K. Heese, and M. Wu. 2006b. The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis. *Mol Cell Biol*. 26:9071-82.

Jimbo, A., E. Fujita, Y. Kouroku, J. Ohnishi, N. Inohara, K. Kuida, K. Sakamaki, S. Yonehara, and T. Momoi. 2003. ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation. *Exp Cell Res*. 283:156-66.

Jin, Z., and W.S. El-Deiry. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*. 4:139-63.

Jin, Z., E.R. McDonald, 3rd, D.T. Dicker, and W.S. El-Deiry. 2004. Deficient tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor transport to the cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 279:35829-39.

Jurgensmeier, J.M., Z. Xie, Q. Deveraux, L. Ellerby, D. Bredesen, and J.C. Reed. 1998. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:4997-5002.

Kabore, A.F., J. Sun, X. Hu, K. McCrea, J.B. Johnston, and S.B. Gibson. 2006. The TRAIL apoptotic pathway mediates proteasome inhibitor induced apoptosis in primary chronic lymphocytic leukemia cells. *Apoptosis*. 11:1175-93.

Kamer, I., R. Sarig, Y. Zaltsman, H. Niv, G. Oberkovitz, L. Regev, G. Haimovich, Y. Lerenthal, R.C. Marcellus, and A. Gross. 2005. Proapoptotic BID is an ATM effector in the DNA-damage response. *Cell*. 122:593-603.

Kane, R.C., P.F. Bross, A.T. Farrell, and R. Pazdur. 2003. Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *Oncologist*. 8:508-13.

Karpinich, N.O., M. Tafani, T. Schneider, M.A. Russo, and J.L. Farber. 2006. The course of etoposide-induced apoptosis in Jurkat cells lacking p53 and Bax. *J Cell Physiol*. 208:55-63.

Kaufmann, T., L. Tai, P.G. Ekert, D.C. Huang, F. Norris, R.K. Lindemann, R.W. Johnstone, V.M. Dixit, and A. Strasser. 2007. The BH3-only protein bid is dispensable for DNA damage- and replicative stress-induced apoptosis or cell-cycle arrest. *Cell*. 129:423-33.

Khosravi-Far, R.a.M.D.E. 2004. Death Receptor Signals to Mitochondria. *Cancer Biology & Therapy*. 3:1051-1057.

Kim, H., M. Rafiuddin-Shah, H.C. Tu, J.R. Jeffers, G.P. Zambetti, J.J. Hsieh, and E.H. Cheng. 2006. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol*. 8:1348-58.

Kim, H.E., F. Du, M. Fang, and X. Wang. 2005. Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:17545-50.

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

Kohlhaas, S.L., A. Craxton, X.M. Sun, M.J. Pinkoski, and G.M. Cohen. 2007. Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 282:12831-41.

Koivusalo, R., E. Krausz, H. Helenius, and S. Hietanen. 2005. Chemotherapy compounds in cervical cancer cells primed by reconstitution of p53 function after short interfering RNA-mediated degradation of human papillomavirus 18 E6 mRNA: opposite effect of siRNA in combination with different drugs. *Mol Pharmacol*. 68:372-82.

Koivusalo, R., E. Krausz, P. Ruotsalainen, H. Helenius, and S. Hietanen. 2002. Chemoradiation of cervical cancer cells: targeting human papillomavirus E6 and p53 leads to either augmented or attenuated apoptosis depending on the platinum carrier ligand. *Cancer Res*. 62:7364-71.

Konig, H.G., M. Rehm, D. Gudorf, S. Krajewski, A. Gross, M.W. Ward, and J.H. Prehn. 2007. Full length Bid is sufficient to induce apoptosis of cultured rat hippocampal neurons. *BMC Cell Biol*. 8:7.

Koschny, R., H. Walczak, and T.M. Ganten. 2007. The promise of TRAIL--potential and risks of a novel anticancer therapy. *J Mol Med*. 85:923-35.

Kroemer, G., L. Galluzzi, and C. Brenner. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*. 87:99-163.

Krueger, A., I. Schmitz, S. Baumann, P.H. Krammer, and S. Kirchhoff. 2001. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*. 276:20633-40.

Kunkel, G.R., and T. Pederson. 1989. Transcription of a human U6 small nuclear RNA gene in vivo withstands deletion of intragenic sequences but not of an upstream TATATA box. *Nucleic Acids Res*. 17:7371-9.

Kurata, K., R. Yanagisawa, M. Ohira, M. Kitagawa, A. Nakagawara, and T. Kamijo. 2008. Stress via p53 pathway causes apoptosis by mitochondrial Noxa upregulation in doxorubicin-treated neuroblastoma cells. *Oncogene*. 27:741-54.

Kuwana, T., L. Bouchier-Hayes, J.E. Chipuk, C. Bonzon, B.A. Sullivan, D.R. Green, and D.D. Newmeyer. 2005. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell*. 17:525-35.

Kuwana, T., M.R. Mackey, G. Perkins, M.H. Ellisman, M. Latterich, R. Schneiter, D.R. Green, and D.D. Newmeyer. 2002. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*. 111:331-42.

Kweekel, D.M., H. Gelderblom, and H.J. Guchelaar. 2005. Pharmacology of oxaliplatin and the use of pharmacogenomics to individualize therapy. *Cancer Treat Rev*. 31:90-105.

Labi, V., M. Erlacher, S. Kiessling, and A. Villunger. 2006. BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy. *Cell Death Differ*. 13:1325-38.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-5.

Lassus, P., X. Opitz-Araya, and Y. Lazebnik. 2002. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science*. 297:1352-4.

Lassus, P., X. Opitz-Araya, and Y. Lazebnik. 2004. Corrections and clarifications. *Science*. 306:1683.

Lavrik, I., A. Golks, and P.H. Krammer. 2005a. Death receptor signaling. *J Cell Sci*. 118:265-7.

Lavrik, I., A. Krueger, I. Schmitz, S. Baumann, H. Weyd, P.H. Krammer, and S. Kirchhoff. 2003. The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death Differ*. 10:144-5.

Lavrik, I.N., A. Golks, and P.H. Krammer. 2005b. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*. 115:2665-72.

Lawrence, D., Z. Shahrokh, S. Marsters, K. Achilles, D. Shih, B. Mounho, K. Hillan, K. Totpal, L. DeForge, P. Schow, J. Hooley, S. Sherwood, R. Pai, S. Leung, L. Khan, B. Gliniak, J. Bussiere, C.A. Smith, S.S. Strom, S. Kelley, J.A. Fox, D. Thomas, and A. Ashkenazi. 2001. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med*. 7:383-5.

Lee, K.H., C. Feig, V. Tchikov, R. Schickel, C. Hallas, S. Schutze, M.E. Peter, and A.C. Chan. 2006. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *Embo J*. 25:1009-23.

Lee, S.W., S.M. Choi, Y.S. Chang, K.T. Kim, T.H. Kim, H.T. Park, B.S. Park, Y.J. Sohn, S.K. Park, S.H. Cho, W.T. Chung, and Y.H. Yoo. 2007. A purified extract from Clematis mandshurica prevents staurosporin-induced downregulation of 14-3-3 and subsequent apoptosis on rat chondrocytes. *J Ethnopharmacol*. 111:213-8.

Lejeune, F.J., and C. Ruegg. 2006. Recombinant human tumor necrosis factor: an efficient agent for cancer treatment. *Bull Cancer*. 93:E90-100.

Letai, A., M.C. Bassik, L.D. Walensky, M.D. Sorcinelli, S. Weiler, and S.J. Korsmeyer. 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2:183-92.

Li, H., H. Zhu, C.J. Xu, and J. Yuan. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 94:491-501.

Li, J., B. Lee, and A.S. Lee. 2006. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem*. 281:7260-70.

Li, L.Y., X. Luo, and X. Wang. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 412:95-9.

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

Li, S., Y. Zhao, X. He, T.H. Kim, D.K. Kuharsky, H. Rabinowich, J. Chen, C. Du, and X.M. Yin. 2002. Relief of extrinsic pathway inhibition by the Bid-dependent mitochondrial release of Smac in Fas-mediated hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem*. 277:26912-20.

Li, W., X. Zhang, and A.F. Olumi. 2007. MG-132 sensitizes TRAIL-resistant prostate cancer cells by activating c-Fos/c-Jun heterodimers and repressing c-FLIP(L). *Cancer Res*. 67:2247-55.

Lin, C.F., C.L. Chen, W.T. Chang, M.S. Jan, L.J. Hsu, R.H. Wu, M.J. Tang, W.C. Chang, and Y.S. Lin. 2004. Sequential caspase-2 and caspase-8 activation upstream of mitochondria during ceramideand etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 279:40755-61.

Lin, Y., W. Ma, and S. Benchimol. 2000. Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nat Genet*. 26:122-7.

Lippens, S., M. Kockx, M. Knaapen, L. Mortier, R. Polakowska, A. Verheyen, M. Garmyn, A. Zwijsen, P. Formstecher, D. Huylebroeck, P. Vandenabeele, and W. Declercq. 2000. Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death Differ*. 7:1218-24.

Liu, L., D. Xing, W.R. Chen, T. Chen, Y. Pei, and X. Gao. 2008. Calpain-mediated pathway dominates cisplatin-induced apoptosis in human lung adenocarcinoma cells as determined by real-time single cell analysis. *Int J Cancer*. 122:2210-22.

Liu, X., T. Van Vleet, and R.G. Schnellmann. 2004. The role of calpain in oncotic cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 44:349-70.

Liu, X., P. Yue, S. Chen, L. Hu, S. Lonial, F.R. Khuri, and S.Y. Sun. 2007. The proteasome inhibitor PS-341 (bortezomib) up-regulates DR5 expression leading to induction of apoptosis and enhancement of TRAIL-induced apoptosis despite up-regulation of c-FLIP and survivin expression in human NSCLC cells. *Cancer Res*. 67:4981-8.

Lobo, S.M., and N. Hernandez. 1989. A 7 bp mutation converts a human RNA polymerase II snRNA promoter into an RNA polymerase III promoter. *Cell*. 58:55-67.

Longley, D.B., T.R. Wilson, M. McEwan, W.L. Allen, U. McDermott, L. Galligan, and P.G. Johnston. 2006. c-FLIP inhibits chemotherapy-induced colorectal cancer cell death. *Oncogene*. 25:838-48.

Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 94:481-90.

Lutter, M., M. Fang, X. Luo, M. Nishijima, X. Xie, and X. Wang. 2000. Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol*. 2:754-61.

Lytton, J., M. Westlin, and M.R. Hanley. 1991. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem*. 266:17067-71.

Madesh, M., B. Antonsson, S.M. Srinivasula, E.S. Alnemri, and G. Hajnoczky. 2002. Rapid kinetics of tBid-induced cytochrome c and Smac/DIABLO release and mitochondrial depolarization. *J Biol Chem*. 277:5651-9.

Magura, W.C. 2003. Taming the beast: p53-independent regulation of the PUMA promoter in human cancer cell lines. *Cancer Rev*. 74: 103-10.

Mandic, A., K. Viktorsson, L. Strandberg, T. Heiden, J. Hansson, S. Linder, and M.C. Shoshan. 2002. Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 22:3003-13.

Margolin, N., S.A. Raybuck, K.P. Wilson, W. Chen, T. Fox, Y. Gu, and D.J. Livingston. 1997. Substrate and inhibitor specificity of interleukin-1 beta-converting enzyme and related caspases. *J Biol Chem*. 272:7223-8.

McDonnell, J.M., D. Fushman, C.L. Milliman, S.J. Korsmeyer, and D. Cowburn. 1999. Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell*. 96:625-34.

McKenzie, M.D., E.M. Carrington, T. Kaufmann, A. Strasser, D.C. Huang, T.W. Kay, J. Allison, and H.E. Thomas. 2008. Pro-apoptotic BH3-only protein Bid is essential for death receptor-induced apoptosis of pancreatic {beta} cells. *Diabetes*.

McStay, G.P., G.S. Salvesen, and D.R. Green. 2008. Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways. *Cell Death Differ*. 15:322-31.

Meister, G., and T. Tuschl. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 431:343-9.

Meng, L., R. Mohan, B.H. Kwok, M. Elofsson, N. Sin, and C.M. Crews. 1999. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:10403-8.

Merino, D., N. Lalaoui, A. Morizot, P. Schneider, E. Solary, and O. Micheau. 2006. Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol Cell Biol*. 26:7046-55.

Michalak, E.M., A. Villunger, J.M. Adams, and A. Strasser. 2008. In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute. *Cell Death Differ*.

Micheau, O., M. Thome, P. Schneider, N. Holler, J. Tschopp, D.W. Nicholson, C. Briand, and M.G. Grutter. 2002. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*. 277:45162-71.

Milhas, D., O. Cuvillier, N. Therville, P. Clave, M. Thomsen, T. Levade, H. Benoist, and B. Segui. 2005. Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 280:19836-42.

Ming, L., P. Wang, A. Bank, J. Yu, and L. Zhang. 2006. PUMA Dissociates Bax and Bcl-X(L) to induce apoptosis in colon cancer cells. *J Biol Chem*. 281:16034-42.

Misumi, Y., Y. Misumi, K. Miki, A. Takatsuki, G. Tamura, and Y. Ikehara. 1986. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 261:11398-403.

Mitsiades, C.S., D. McMillin, V. Kotoula, V. Poulaki, C. McMullan, J. Negri, G. Fanourakis, S. Tseleni-Balafouta, K.B. Ain, and N. Mitsiades. 2006. Antitumor effects of the proteasome inhibitor bortezomib in medullary and anaplastic thyroid carcinoma cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 91:4013-21.

Moldoveanu, T., Q. Liu, A. Tocilj, M. Watson, G. Shore, and K. Gehring. 2006. The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site. *Mol Cell*. 24:677-88.

Montecucco, A., and G. Biamonti. 2007. Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Lett*. 252:9-18.

Muller, W., and F. Gautier. 1975. Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids. A - T-specific non-intercalating DNA ligands. *Eur J Biochem*. 54:385-94.

Munger, K., and P.M. Howley. 2002. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*. 89:213-28.

Murphy, B.M., E.M. Creagh, and S.J. Martin. 2004. Interchain proteolysis, in the absence of a dimerization stimulus, can initiate apoptosis-associated caspase-8 activation. *J Biol Chem*. 279:36916-22.

Muruganandan, S., and A.E. Cribb. 2006. Calpain-induced endoplasmic reticulum stress and cell death following cytotoxic damage to renal cells. *Toxicol Sci*. 94:118-28.

Muzio, M., A.M. Chinnaiyan, F.C. Kischkel, K. O'Rourke, A. Shevchenko, J. Ni, C. Scaffidi, J.D. Bretz, M. Zhang, R. Gentz, M. Mann, P.H. Krammer, M.E. Peter, and V.M. Dixit. 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell*. 85:817-27.

Nakagawa, T., and J. Yuan. 2000. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*. 150:887-94.

Nakano, K., and K.H. Vousden. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*. 7:683-94.

Naujokat, C., and S. Hoffmann. 2002. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest*. 82:965-80.

Neise, D., V. Graupner, B.F. Gillissen, P.T. Daniel, K. Schulze-Osthoff, R.U. Janicke, and F. Essmann. 2008. Activation of the mitochondrial death pathway is commonly mediated by a preferential engagement of Bak. *Oncogene*. 27:1387-96.

Nickson, P., A. Toth, and P. Erhardt. 2007. PUMA is critical for neonatal cardiomyocyte apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Cardiovasc Res*. 73:48-56.

Nitiss, J.L., Y.X. Liu, and Y. Hsiung. 1993. A temperature sensitive topoisomerase II allele confers temperature dependent drug resistance on amsacrine and etoposide: a genetic system for determining the targets of topoisomerase II inhibitors. *Cancer Res*. 53:89-93.

O'Dwyer, P.J., J.P. Stevenson, and S.W. Johnson. 2000. Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs. *Drugs*. 59 Suppl 4:19-27.

Oberkovitz, G., L. Regev, and A. Gross. 2007. Nucleocytoplasmic shuttling of BID is involved in regulating its activities in the DNA-damage response. *Cell Death Differ*. 14:1628-34.

Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi, and N. Tanaka. 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*. 288:1053-8.

Ogasawara, J., R. Watanabe-Fukunaga, M. Adachi, A. Matsuzawa, T. Kasugai, Y. Kitamura, N. Itoh, T. Suda, and S. Nagata. 1993. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*. 364:806-9.

Omura, S., Y. Sasaki, Y. Iwai, and H. Takeshima. 1995. Staurosporine, a potentially important gift from a microorganism. *J Antibiot (Tokyo)*. 48:535-48.

Onuki, R., A. Nagasaki, H. Kawasaki, T. Baba, T.Q. Uyeda, and K. Taira. 2002. Confirmation by FRET in individual living cells of the absence of significant amyloid beta -mediated caspase 8 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:14716-21.

Orlowski, R.Z. 2005. The ubiquitin proteasome pathway from bench to bedside. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:220-5.

Paddison, P.J., A.A. Caudy, E. Bernstein, G.J. Hannon, and D.S. Conklin. 2002. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*. 16:948-58.

Page, J.D., I. Husain, A. Sancar, and S.G. Chaney. 1990. Effect of the diaminocyclohexane carrier ligand on platinum adduct formation, repair, and lethality. *Biochemistry*. 29:1016-24.

Paroni, G., C. Henderson, C. Schneider, and C. Brancolini. 2001. Caspase-2-induced apoptosis is dependent on caspase-9, but its processing during UV- or tumor necrosis factor-dependent cell death requires caspase-3. *J Biol Chem*. 276:21907-15.

Perez-Galan, P., G. Roue, N. Villamor, E. Montserrat, E. Campo, and D. Colomer. 2006. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood*. 107:257-64.

Peter, M.E., and P.H. Krammer. 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*. 10:26-35.

Pistritto, G., M. Jost, S.M. Srinivasula, R. Baffa, J.L. Poyet, C. Kari, Y. Lazebnik, U. Rodeck, and E.S. Alnemri. 2002. Expression and transcriptional regulation of caspase-14 in simple and complex epithelia. *Cell Death Differ*. 9:995-1006.

Pitti, R.M., S.A. Marsters, D.A. Lawrence, M. Roy, F.C. Kischkel, P. Dowd, A. Huang, C.J. Donahue, S.W. Sherwood, D.T. Baldwin, P.J. Godowski, W.I. Wood, A.L. Gurney, K.J. Hillan, R.L.

Cohen, A.D. Goddard, D. Botstein, and A. Ashkenazi. 1998. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*. 396:699-703.

Plesnila, N., S. Zinkel, D.A. Le, S. Amin-Hanjani, Y. Wu, J. Qiu, A. Chiarugi, S.S. Thomas, D.S. Kohane, S.J. Korsmeyer, and M.A. Moskowitz. 2001. BID mediates neuronal cell death after oxygen/ glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:15318-23.

Pop, C., J. Timmer, S. Sperandio, and G.S. Salvesen. 2006. The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol Cell*. 22:269-75.

Porn-Ares, M.I., A. Samali, and S. Orrenius. 1998. Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis. *Cell Death Differ*. 5:1028-33.

Propper, D.J., A.C. McDonald, A. Man, P. Thavasu, F. Balkwill, J.P. Braybrooke, F. Caponigro, P. Graf, C. Dutreix, R. Blackie, S.B. Kaye, T.S. Ganesan, D.C. Talbot, A.L. Harris, and C. Twelves. 2001. Phase I and pharmacokinetic study of PKC412, an inhibitor of protein kinase C. *J Clin Oncol*. 19:1485-92.

Puthalakath, H., L.A. O'Reilly, P. Gunn, L. Lee, P.N. Kelly, N.D. Huntington, P.D. Hughes, E.M. Michalak, J. McKimm-Breschkin, N. Motoyama, T. Gotoh, S. Akira, P. Bouillet, and A. Strasser. 2007. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*. 129:1337-49.

Ranger, A.M., J. Zha, H. Harada, S.R. Datta, N.N. Danial, A.P. Gilmore, J.L. Kutok, M.M. Le Beau, M.E. Greenberg, and S.J. Korsmeyer. 2003. Bad-deficient mice develop diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:9324-9.

Raymond, E., S. Faivre, S. Chaney, J. Woynarowski, and E. Cvitkovic. 2002. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther*. 1:227-35.

Real, P.J., C. Sanz, O. Gutierrez, C. Pipaon, A.M. Zubiaga, and J.L. Fernandez-Luna. 2006. Transcriptional activation of the proapoptotic bik gene by E2F proteins in cancer cells. *FEBS Lett*. 580:5905-9.

Rehm, M., H. Dussmann, R.U. Janicke, J.M. Tavare, D. Kogel, and J.H. Prehn. 2002. Single-cell fluorescence resonance energy transfer analysis demonstrates that caspase activation during apoptosis is a rapid process. Role of caspase-3. *J Biol Chem*. 277:24506-14.

Rehm, M., H. Dussmann, and J.H. Prehn. 2003. Real-time single cell analysis of Smac/DIABLO release during apoptosis. *J Cell Biol*. 162:1031-43.

Reimertz, C., D. Kogel, S. Lankiewicz, M. Poppe, and J.H. Prehn. 2001. Ca(2+)-induced inhibition of apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: degradation of apoptotic protease activating factor-1 (APAF-1). *J Neurochem*. 78:1256-66.

Reimertz, C., D. Kogel, A. Rami, T. Chittenden, and J.H. Prehn. 2003. Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *J Cell Biol*. 162:587-97.

Ren, Y.G., K.W. Wagner, D.A. Knee, P. Aza-Blanc, M. Nasoff, and Q.L. Deveraux. 2004. Differential regulation of the TRAIL death receptors DR4 and DR5 by the signal recognition particle. *Mol Biol Cell*. 15:5064-74.

Renatus, M., H.R. Stennicke, F.L. Scott, R.C. Liddington, and G.S. Salvesen. 2001. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:14250-5.

Reynolds, A., D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W.S. Marshall, and A. Khvorova. 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*. 22:326-30.

Richardson, P.G., and K.C. Anderson. 2003. Bortezomib: a novel therapy approved for multiple myeloma. *Clin Adv Hematol Oncol*. 1:596-600.

Richardson, P.G., B. Barlogie, J. Berenson, S. Singhal, S. Jagannath, D. Irwin, S.V. Rajkumar, T. Hideshima, H. Xiao, D. Esseltine, D. Schenkein, and K.C. Anderson. 2005. Clinical factors predictive of outcome with bortezomib in patients with relapsed, refractory multiple myeloma. *Blood*. 106:2977-81.

Riedl, S.J., P. Fuentes-Prior, M. Renatus, N. Kairies, S. Krapp, R. Huber, G.S. Salvesen, and W. Bode. 2001. Structural basis for the activation of human procaspase-7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:14790-5.

Riedl, S.J., W. Li, Y. Chao, R. Schwarzenbacher, and Y. Shi. 2005. Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP. *Nature*. 434:926-33.

Ririe, K.M., R.P. Rasmussen, and C.T. Wittwer. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 245:154-60.

Rixe, O., W. Ortuzar, M. Alvarez, R. Parker, E. Reed, K. Paull, and T. Fojo. 1996. Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochem Pharmacol*. 52:1855-65.

Robertson, J.D., M. Enoksson, M. Suomela, B. Zhivotovsky, and S. Orrenius. 2002. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 277:29803-9.

Rodriguez, J., and Y. Lazebnik. 1999. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev*. 13:3179-84.

Ron, D., and P. Walter. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:519-29.

Rotonda, J., D.W. Nicholson, K.M. Fazil, M. Gallant, Y. Gareau, M. Labelle, E.P. Peterson, D.M. Rasper, R. Ruel, J.P. Vaillancourt, N.A. Thornberry, and J.W. Becker. 1996. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol*. 3:619-25.

Ryan, K.M., A.C. Phillips, and K.H. Vousden. 2001. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol*. 13:332-7.

Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230:1350-4.

Salvesen, G.S., and V.M. Dixit. 1999. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:10964-7.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, New York.

Samraj, A.K., D. Sohn, K. Schulze-Osthoff, and I. Schmitz. 2007. Loss of caspase-9 reveals its essential role for caspase-2 activation and mitochondrial membrane depolarization. *Mol Biol Cell*. 18:84-93.

Sarig, R., Y. Zaltsman, R.C. Marcellus, R. Flavell, T.W. Mak, and A. Gross. 2003. BID-D59A is a potent inducer of apoptosis in primary embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*. 278:10707-15.

Saris, C.P., P.J. van de Vaart, R.C. Rietbroek, and F.A. Blommaert. 1996. In vitro formation of DNA adducts by cisplatin, lobaplatin and oxaliplatin in calf thymus DNA in solution and in cultured human cells. *Carcinogenesis*. 17:2763-9.

Sax, J.K., P. Fei, M.E. Murphy, E. Bernhard, S.J. Korsmeyer, and W.S. El-Deiry. 2002. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol*. 4:842-9.

Scaduto, R.C., Jr., and L.W. Grotyohann. 1999. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J*. 76:469-77.

Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K.J. Tomaselli, K.M. Debatin, P.H. Krammer, and M.E. Peter. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J*. 17:1675-87.

Schlegel, J., I. Peters, S. Orrenius, D.K. Miller, N.A. Thornberry, T.T. Yamin, and D.W. Nicholson. 1996. CPP32/apopain is a key interleukin 1 beta converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 271:1841-4.

Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 150:76-85.

Schmoll, H.J., and J. Cassidy. 2001. Integrating oxaliplatin into the management of colorectal cancer. *Oncologist*. 6 Suppl 4:24-8.

Schneider-Brachert, W., V. Tchikov, J. Neumeyer, M. Jakob, S. Winoto-Morbach, J. Held-Feindt, M. Heinrich, O. Merkel, M. Ehrenschwender, D. Adam, R. Mentlein, D. Kabelitz, and S. Schutze. 2004. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles. *Immunity*. 21:415-28.

Schwartz, P.S., and D.M. Hockenbery. 2006. Bcl-2-related survival proteins. *Cell Death Differ*. 13:1250-5.

Scorrano, L., M. Ashiya, K. Buttle, S. Weiler, S.A. Oakes, C.A. Mannella, and S.J. Korsmeyer. 2002. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell*. 2:55-67.

Secchiero, P., M. Vaccarezza, A. Gonelli, and G. Zauli. 2004. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a potential candidate for combined treatment of hematological malignancies. *Curr Pharm Des*. 10:3673-81.

Sedarous, M., E. Keramaris, M. O'Hare, E. Melloni, R.S. Slack, J.S. Elce, P.A. Greer, and D.S. Park. 2003. Calpains mediate p53 activation and neuronal death evoked by DNA damage. *J Biol Chem*. 278:26031-8.

Seol, D.W., J. Li, M.H. Seol, S.Y. Park, R.V. Talanian, and T.R. Billiar. 2001. Signaling events triggered by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): caspase-8 is required for TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Res*. 61:1138-43.

Shi, Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*. 9:459-70.

Shiozaki, E.N., J. Chai, D.J. Rigotti, S.J. Riedl, P. Li, S.M. Srinivasula, E.S. Alnemri, R. Fairman, and Y. Shi. 2003. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell*. 11:519-27.

Shiraishi, T., T. Yoshida, S. Nakata, M. Horinaka, M. Wakada, Y. Mizutani, T. Miki, and T. Sakai. 2005. Tunicamycin enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Cancer Res*. 65:6364-70.

Slee, E.A., C. Adrain, and S.J. Martin. 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*. 276:7320-6.

Slee, E.A., M.T. Harte, R.M. Kluck, B.B. Wolf, C.A. Casiano, D.D. Newmeyer, H.G. Wang, J.C. Reed, D.W. Nicholson, E.S. Alnemri, D.R. Green, and S.J. Martin. 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*. 144:281-92.

Slee, E.A., S.A. Keogh, and S.J. Martin. 2000. Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release. *Cell Death Differ*. 7:556-65.

Sohn, D., K. Schulze-Osthoff, and R.U. Janicke. 2005. Caspase-8 can be activated by interchain proteolysis without receptor-triggered dimerization during drug-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 280:5267-73.

Soule, H.D., J. Vazguez, A. Long, S. Albert, and M. Brennan. 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 51:1409-16.

Spingler, B., D.A. Whittington, and S.J. Lippard. 2001. 2.4 A crystal structure of an oxaliplatin 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link in a DNA dodecamer duplex. *Inorg Chem*. 40:5596-602.

Sprick, M.R., E. Rieser, H. Stahl, A. Grosse-Wilde, M.A. Weigand, and H. Walczak. 2002. Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling

complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *Embo J*. 21:4520-30.

Srinivasula, S.M., M. Ahmad, M. MacFarlane, Z. Luo, Z. Huang, T. Fernandes-Alnemri, and E.S. Alnemri. 1998. Generation of constitutively active recombinant caspases-3 and -6 by rearrangement of their subunits. *J Biol Chem*. 273:10107-11.

Srinivasula, S.M., S. Gupta, P. Datta, Z. Zhang, R. Hegde, N. Cheong, T. Fernandes-Alnemri, and E.S. Alnemri. 2003. Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2. *J Biol Chem*. 278:31469-72.

Srinivasula, S.M., R. Hegde, A. Saleh, P. Datta, E. Shiozaki, J. Chai, R.A. Lee, P.D. Robbins, T. Fernandes-Alnemri, Y. Shi, and E.S. Alnemri. 2001. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*. 410:112-6.

Stennicke, H.R., J.M. Jurgensmeier, H. Shin, Q. Deveraux, B.B. Wolf, X. Yang, Q. Zhou, H.M. Ellerby, L.M. Ellerby, D. Bredesen, D.R. Green, J.C. Reed, C.J. Froelich, and G.S. Salvesen. 1998. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem*. 273:27084-90.

Stennicke, H.R., M. Renatus, M. Meldal, and G.S. Salvesen. 2000. Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8. *Biochem J*. 350 Pt 2:563-8.

Stevaux, O., and N.J. Dyson. 2002. A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol*. 14:684-91.

Stoka, V., B. Turk, S.L. Schendel, T.H. Kim, T. Cirman, S.J. Snipas, L.M. Ellerby, D. Bredesen, H. Freeze, M. Abrahamson, D. Bromme, S. Krajewski, J.C. Reed, X.M. Yin, V. Turk, and G.S. Salvesen. 2001. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem*. 276:3149-57.

Stryer, L., and R.P. Haugland. 1967. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 58:719-26.

Sun, C., M. Cai, A.H. Gunasekera, R.P. Meadows, H. Wang, J. Chen, H. Zhang, W. Wu, N. Xu, S.C. Ng, and S.W. Fesik. 1999. NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature*. 401:818-22.

Sun, C., M. Cai, R.P. Meadows, N. Xu, A.H. Gunasekera, J. Herrmann, J.C. Wu, and S.W. Fesik. 2000. NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J Biol Chem*. 275:33777-81.

Sun, X.M., S.B. Bratton, M. Butterworth, M. MacFarlane, and G.M. Cohen. 2002. Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein. *J Biol Chem*. 277:11345-51.

Susin, S.A., H.K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B.E. Snow, G.M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D.R. Goodlett, R. Aebersold, D.P. Siderovski, J.M.

Penninger, and G. Kroemer. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 397:441-6.

Suzuki, M., R.J. Youle, and N. Tjandra. 2000. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*. 103:645-54.

Szegezdi, E., S.E. Logue, A.M. Gorman, and A. Samali. 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep*. 7:880-5.

Tafani, M., J.A. Cohn, N.O. Karpinich, R.J. Rothman, M.A. Russo, and J.L. Farber. 2002. Regulation of intracellular pH mediates Bax activation in HeLa cells treated with staurosporine or tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*. 277:49569-76.

Tafani, M., D.A. Minchenko, A. Serroni, and J.L. Farber. 2001. Induction of the mitochondrial permeability transition mediates the killing of HeLa cells by staurosporine. *Cancer Res.* 61:2459-66.

Tait, S.W., E. de Vries, C. Maas, A.M. Keller, C.S. D'Santos, and J. Borst. 2007. Apoptosis induction by Bid requires unconventional ubiquitination and degradation of its N-terminal fragment. *J Cell Biol*. 179:1453-66.

Takatsuki, A., K. Arima, and G. Tamura. 1971. Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin. *J Antibiot (Tokyo)*. 24:215–223.

Tamaoki, T., H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto, and F. Tomita. 1986. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca++dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 135:397-402.

Tan, K.O., K.M. Tan, and V.C. Yu. 1999. A novel BH3-like domain in BID is required for intramolecular interaction and autoinhibition of pro-apoptotic activity. *J Biol Chem.* 274:23687-90.

Tan, Y., C. Wu, T. De Veyra, and P.A. Greer. 2006. Ubiquitous calpains promote both apoptosis and survival signals in response to different cell death stimuli. *J Biol Chem*. 281:17689-98.

Tartaglia, L.A., T.M. Ayres, G.H. Wong, and D.V. Goeddel. 1993. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*. 74:845-53.

Tashiro, T., Y. Kawada, Y. Sakurai, and Y. Kidani. 1989. Antitumor activity of a new platinum complex, oxalato (trans-l-1,2-diaminocyclohexane)platinum (II): new experimental data. *Biomed Pharmacother*. 43:251-60.

Taylor, R.C., C. Adrain, and S.J. Martin. 2005. Proteases, proteasomes and apoptosis: breaking Ub is hard to do. *Cell Death Differ*. 12:1213-7.

Tewey, K.M., T.C. Rowe, L. Yang, B.D. Halligan, and L.F. Liu. 1984. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*. 226:466-8.

Thastrup, O., P.J. Cullen, B.K. Drobak, M.R. Hanley, and A.P. Dawson. 1990. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca2+ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca2(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:2466-70.

Thornberry, N.A., H.G. Bull, J.R. Calaycay, K.T. Chapman, A.D. Howard, M.J. Kostura, D.K. Miller, S.M. Molineaux, J.R. Weidner, J. Aunins, and et al. 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*. 356:768-74.

Thornberry, N.A., T.A. Rano, E.P. Peterson, D.M. Rasper, T. Timkey, M. Garcia-Calvo, V.M. Houtzager, P.A. Nordstrom, S. Roy, J.P. Vaillancourt, K.T. Chapman, and D.W. Nicholson. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*. 272:17907-11.

Tinel, A., and J. Tschopp. 2004. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science*. 304:843-6.

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

Tsujimoto, Y., E. Jaffe, J. Cossman, J. Gorham, P.C. Nowell, and C.M. Croce. 1985. Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature*. 315:340-3.

Tsujinaka, T., Y. Kajiwara, J. Kambayashi, M. Sakon, N. Higuchi, T. Tanaka, and T. Mori. 1988. Synthesis of a new cell penetrating calpain inhibitor (calpeptin). *Biochem Biophys Res Commun*. 153:1201-8.

Tu, S., G.P. McStay, L.M. Boucher, T. Mak, H.M. Beere, and D.R. Green. 2006. In situ trapping of activated initiator caspases reveals a role for caspase-2 in heat shock-induced apoptosis. *Nat Cell Biol*. 8:72-7.

Twiddy, D., and K. Cain. 2007. Caspase-9 cleavage, do you need it? *Biochem J*. 405:e1-2.

Tyas, L., V.A. Brophy, A. Pope, A.J. Rivett, and J.M.Tavare. 2000. Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer. *EMBO Rep.* 1:266-270.

Valentijn, A.J., and A.P. Gilmore. 2004. Translocation of full-length Bid to mitochondria during anoikis. *J Biol Chem*. 279:32848-57.

Varnes, M.E., S.M. Chiu, L.Y. Xue, and N.L. Oleinick. 1999. Photodynamic therapy-induced apoptosis in lymphoma cells: translocation of cytochrome c causes inhibition of respiration as well as caspase activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 255:673-9.

Vaux, D.L., S. Cory, and J.M. Adams. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. 335:440-2.

Verbrugge, I., E. de Vries, S.W. Tait, E.H. Wissink, H. Walczak, M. Verheij, and J. Borst. 2008. Ionizing radiation modulates the TRAIL death-inducing signaling complex, allowing bypass of the mitochondrial apoptosis pathway. *Oncogene*. 27:574-84.

Verhagen, A.M., J. Silke, P.G. Ekert, M. Pakusch, H. Kaufmann, L.M. Connolly, C.L. Day, A. Tikoo, R. Burke, C. Wrobel, R.L. Moritz, R.J. Simpson, and D.L. Vaux. 2002. HtrA2 promotes cell

death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem*. 277:445-54.

Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 184:39-51.

Villunger, A., E.M. Michalak, L. Coultas, F. Mullauer, G. Bock, M.J. Ausserlechner, J.M. Adams, and A. Strasser. 2003. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science*. 302:1036-8.

Wagner, K.W., I.H. Engels, and Q.L. Deveraux. 2004. Caspase-2 can function upstream of bid cleavage in the TRAIL apoptosis pathway. *J Biol Chem*. 279:35047-52.

Wajant, H., J. Gerspach, and K. Pfizenmaier. 2005. Tumor therapeutics by design: targeting and activation of death receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 16:55-76.

Walboomers, J.M., M.V. Jacobs, M.M. Manos, F.X. Bosch, J.A. Kummer, K.V. Shah, P.J. Snijders, J. Peto, C.J. Meijer, and N. Munoz. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 189:12-9.

Wang, G.Q., E. Wieckowski, L.A. Goldstein, B.R. Gastman, A. Rabinovitz, A. Gambotto, S. Li, B. Fang, X.M. Yin, and H. Rabinowich. 2001. Resistance to granzyme B-mediated cytochrome c release in Bak-deficient cells. *J Exp Med*. 194:1325-37.

Wang, P., J. Yu, and L. Zhang. 2007. The nuclear function of p53 is required for PUMA-mediated apoptosis induced by DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:4054-9.

Wang, X., M. Li, J. Wang, C.M. Yeung, H. Zhang, H.F. Kung, B. Jiang, and M.C. Lin. 2006. The BH3-only protein, PUMA, is involved in oxaliplatin-induced apoptosis in colon cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 71:1540-50.

Ward, M.W., M. Rehm, H. Duessmann, S. Kacmar, C.G. Concannon, and J.H. Prehn. 2006. Real time single cell analysis of Bid cleavage and Bid translocation during caspase-dependent and neuronal caspase-independent apoptosis. *J Biol Chem*. 281:5837-44.

Wei, M.C., W.X. Zong, E.H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A.J. Ross, K.A. Roth, G.R. MacGregor, C.B. Thompson, and S.J. Korsmeyer. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 292:727-30.

Welch, S., H.W. Hirte, M.S. Carey, S.J. Hotte, M.S. Tsao, S. Brown, G.R. Pond, J.E. Dancey, and A.M. Oza. 2007. UCN-01 in combination with topotecan in patients with advanced recurrent ovarian cancer: a study of the Princess Margaret Hospital Phase II consortium. *Gynecol Oncol*. 106:305-10.

Werner, A.B., S.W. Tait, E. de Vries, E. Eldering, and J. Borst. 2004. Requirement for aspartate-cleaved bid in apoptosis signaling by DNA-damaging anti-cancer regimens. *J Biol Chem*. 279:28771-80.

Willis, S.N., and J.M. Adams. 2005. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 17:617-25.

Willis, S.N., L. Chen, G. Dewson, A. Wei, E. Naik, J.I. Fletcher, J.M. Adams, and D.C. Huang. 2005. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev*. 19:1294-305.

Wilson, K.P., Black, J.A.F., Thomson, J.A., Kim, E.E., Griffith, J.P., Navia, M.A., Murcko, M.A., Chambers, S.P., Aldape, R.A., Raybuck, S.A. and D.J. Livingston. 1994. Structure and mechanism of interleukin-l converting enzyme. *Nature*. 370: 270-275.

Wittwer, C.T., M.G. Herrmann, A.A. Moss, and R.P. Rasmussen. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 22:130-1, 134-8.

Wlodkowic, D., J. Skommer, and J. Pelkonen. 2007. Brefeldin A triggers apoptosis associated with mitochondrial breach and enhances HA14-1- and anti-Fas-mediated cell killing in follicular lymphoma cells. *Leuk Res*. 31:1687-700.

Wood, D.E., A. Thomas, L.A. Devi, Y. Berman, R.C. Beavis, J.C. Reed, and E.W. Newcomb. 1998. Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene*. 17:1069-78.

Woynarowski, J.M., S. Faivre, M.C. Herzig, B. Arnett, W.G. Chapman, A.V. Trevino, E. Raymond, S.G. Chaney, A. Vaisman, M. Varchenko, and P.E. Juniewicz. 2000. Oxaliplatin-induced damage of cellular DNA. *Mol Pharmacol*. 58:920-7.

Wu, X.X., X.H. Jin, Y. Zeng, A.M. El Hamed, and Y. Kakehi. 2007. Low concentrations of doxorubicin sensitizes human solid cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-receptor (R) 2-mediated apoptosis by inducing TRAIL-R2 expression. *Cancer Sci*. 98:1969-76.

Xue, L.Y., S.M. Chiu, and N.L. Oleinick. 2003. Staurosporine-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: a distinction between caspase-3-dependent steps of apoptosis and the critical lethal lesions. *Exp Cell Res*. 283:135-45.

Yagita, H., K. Takeda, Y. Hayakawa, M.J. Smyth, and K. Okumura. 2004. TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy. *Cancer Sci*. 95:777-83.

Yakovlev, A.G., S. Di Giovanni, G. Wang, W. Liu, B. Stoica, and A.I. Faden. 2004. BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem*. 279:28367-74.

Yamaguchi, H., K. Bhalla, and H.G. Wang. 2003. Bax plays a pivotal role in thapsigargin-induced apoptosis of human colon cancer HCT116 cells by controlling Smac/Diablo and Omi/HtrA2 release from mitochondria. *Cancer Res*. 63:1483-9.

Yamaguchi, H., and H.G. Wang. 2004. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem*. 279:45495-502.

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

Yang, Q.H., R. Church-Hajduk, J. Ren, M.L. Newton, and C. Du. 2003. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev*. 17:1487-96.

Yeung, B.H., D.C. Huang, and F.A. Sinicrope. 2006. PS-341 (bortezomib) induces lysosomal cathepsin B release and a caspase-2-dependent mitochondrial permeabilization and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *J Biol Chem*. 281:11923-32.

Yin, Q., H.H. Park, J.Y. Chung, S.C. Lin, Y.C. Lo, L.S. da Graca, X. Jiang, and H. Wu. 2006. Caspase-9 holoenzyme is a specific and optimal procaspase-3 processing machine. *Mol Cell*. 22:259-68.

Yin, X.M. 2006. Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene*. 369:7-19.

Yin, X.M., K. Wang, A. Gross, Y. Zhao, S. Zinkel, B. Klocke, K.A. Roth, and S.J. Korsmeyer. 1999. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*. 400:886-91.

Yoshida, H. 2007. ER stress and diseases. *Febs J*. 274:630-58.

Yoshida, T., T. Shiraishi, M. Horinaka, M. Wakada, and T. Sakai. 2007. Glycosylation modulates TRAIL-R1/death receptor 4 protein: different regulations of two pro-apoptotic receptors for TRAIL by tunicamycin. *Oncol Rep*. 18:1239-42.

Youle, R.J., and A. Strasser. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:47-59.

Yu, J., L. Zhang, P.M. Hwang, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 2001. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell*. 7:673-82.

Yu, X., D. Acehan, J.F. Menetret, C.R. Booth, S.J. Ludtke, S.J. Riedl, Y. Shi, X. Wang, and C.W. Akey. 2005. A structure of the human apoptosome at 12.8 A resolution provides insights into this cell death platform. *Structure*. 13:1725-35.

Zantl, N., G. Weirich, H. Zall, B.M. Seiffert, S.F. Fischer, S. Kirschnek, C. Hartmann, R.M. Fritsch, B. Gillissen, P.T. Daniel, and G. Hacker. 2007. Frequent loss of expression of the pro-apoptotic protein Bim in renal cell carcinoma: evidence for contribution to apoptosis resistance. *Oncogene*. 26:7038-48.

Zha, J., H. Harada, E. Yang, J. Jockel, and S.J. Korsmeyer. 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*. 87:619-28.

Zha, J., S. Weiler, K.J. Oh, M.C. Wei, and S.J. Korsmeyer. 2000. Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science*. 290:1761-5.

Zhao, T., H. Zhang, Y. Guo, and Z. Fan. 2007. Granzyme K directly processes bid to release cytochrome c and endonuclease G leading to mitochondria-dependent cell death. *J Biol Chem*. 282:12104-11.

Zhu, H., L. Zhang, F. Dong, W. Guo, S. Wu, F. Teraishi, J.J. Davis, P.J. Chiao, and B. Fang. 2005. Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by bortezomib (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors. *Oncogene*. 24:4993-9.

Zinkel, S.S., K.E. Hurov, C. Ong, F.M. Abtahi, A. Gross, and S.J. Korsmeyer. 2005. A role for proapoptotic BID in the DNA-damage response. *Cell*. 122:579-91.

Zou, H., W.J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg, and X. Wang. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 90:405-13.

zur Hausen, H. 2000. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 92:690-8.

VIII. Anhang

Veröffentlichungen

Köhler, B., S. Anguissola, C.G. Concannon, M. Rehm, D. Kögel, and J.H. Prehn. 2008. Bid participates in genotoxic drug-induced apoptosis of HeLa cells and is essential for death receptor ligands' apoptotic and synergistic effects. *PLoS ONE*. 3:e2844.

Hellwig, C.T., B.F. Köhler, A.K. Lehtivarjo, H. Dussmann, M.J. Courtney, J.H.M. Prehn, and M. Rehm. 2008. Real Time Analysis of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand/Cycloheximide-induced Caspase Activities during Apoptosis Initiation. *J Biol Chem*. 283:21676-85.

Concannon, C.G., B.F. Koehler, C. Reimertz, B.M. Murphy, C. Bonner, N. Thurow, M.W. Ward, A.Villunger, A. Strasser, D. Kögel, and J.H.M. Prehn. 2007. Apoptosis induced by proteasome inhibition in cancer cells: predominant role of the p53/PUMA pathway. *Oncogene*. 26:1681-92.

Anguissola S., B. Köhler, R. O'Brian, H. Duessmann, M. Rehm, and J.H.M. Prehn. Calpains activate Oxaliplatin-induced Apoptosis in Cervical Carcinoma HeLa Cells by a dual mechanism dependent and independent of Bid. Manuskript in Vorbereitung.

Posterpräsentationen

Koehler, B**.**, D. Kögel, J.H.M. Prehn. ER stress induced apoptosis is independent of the death receptor pathway but sub-lethal ER stress sensitizes cells to death receptor stimuli by up-regulating DR5. Posterpräsentation. Meeting of the European Cell Death Organisation, 14th Euroconference on Apoptosis, Chia, Sardinia, Italy, September 2006.

Koehler, B., C. Concannon, B. Murphy, N. Spellacy, C. Reimertz, N. Thurow, D. Henshall, D. Kögel, J.H.M. Prehn. The BH3-only protein PUMA is crucial for proteasome stress-induced apoptosis. Posterpräsentation. Joint Biochemical Society/Neuroscience Ireland Focused Meeting, University College Dublin, Dublin, Ireland, March 2005.

Koehler, B., C. Reimertz, J.H.M. Prehn. Bid is dispensable for ER Stress- and Ca^{2+} store depletion-induced cellular injury. Posterpräsentation. 5th International Cell Death Symposium on the "Mechanisms of Cell Death" of the International Cell Death Society, Maynooth, Ireland, June 2004.