

**Die Bedeutung der JNK-Isoformen  
JNK1 und JNK2 für die  
Apoptose nach proteasomaler Inhibition**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Sabine Pietkiewicz**  
aus Hildesheim

Düsseldorf, Mai 2012

aus dem Labor für Molekulare Radioonkologie der  
Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Reiner U. Jänicke  
Koreferent: Prof. Dr. Matthias Kassack

Tag der mündlichen Prüfung: 25.6.2012

*Meinen Eltern  
in Liebe und Dankbarkeit  
gewidmet*

*Per aspera ad astra!*

- nach Seneca

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Apoptose .....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Apoptose – eine Definition .....	2
1.1.2 Morphologie der Zelltodmechanismen .....	2
1.1.3 Der Schlüssel - die Caspasenfamilie .....	4
1.1.4 Der extrinsische Apoptose-Signalweg.....	7
1.1.5 Der intrinsische Signalweg der Apoptose.....	9
1.1.6 Die Bcl-2 Familie .....	10
<b>1.2 Die c-Jun N-terminalen Kinasen .....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Die Struktur der c-Jun N-terminalen Kinasen.....	14
1.2.2 Die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinasen.....	16
1.2.3 Physiologische Funktionen der c-Jun N-terminalen Kinasen .....	18
1.2.4 Regulation von Apoptose durch die c-Jun N-terminalen Kinasen .....	19
1.2.5 Die Rolle der c-Jun N-terminalen Kinasen in der Onkogenese.....	20
<b>1.3 Das Ubiquitin-Proteasom-System .....</b>	<b>22</b>
1.3.1 Die Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems.....	22
1.3.2 Funktion des Proteasoms in der Regulation von Signalwegen .....	25
1.3.3 Die Rolle des Proteasoms in der Apoptoseregulation.....	26
1.3.4 Proteasomale Inhibitoren in der Krebstherapie.....	30
<b>1.4 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>32</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>34</b>
2.1.1 Chemikalien.....	34
2.1.2 Häufig verwendete Reagenzien.....	34
2.1.3 Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper .....	34
2.1.4 Primäre Antikörper .....	35
2.1.5 Oligonukleotide .....	36
2.1.6 Eukaryotische Zellen.....	36
2.1.7 Größenstandards .....	37
2.1.8 Enzyme.....	37
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>37</b>
2.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	37
2.2.1.1 Isolation von RNA .....	37
2.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	37
2.2.1.3 cDNA-Synthese.....	38
2.2.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	38
2.2.1.5 Analytische Agarosegele .....	39
2.2.2 Zellbiologische Methoden.....	40
2.2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	40
2.2.2.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen.....	40
2.2.2.3 Herstellung und Lagerung von Zellpellets.....	40
2.2.2.4 Transiente Transfektion von <i>small-interfering RNAs</i> (siRNAs).....	40
2.2.3 Durchflusszytometrie .....	41
2.2.3.1 Bestimmung apoptotischer Zellen nach Nicoletti .....	42
2.2.3.2 Messung der zellulären Membranintegrität mittels Propidiumiodidausschluss .....	42
2.2.3.3 Messung des mitochondrialen Membranpotenzials .....	43
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden.....	43
2.2.4.1 Herstellung von zytosolischen Zellextrakten .....	43
2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bradford .....	44
2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
2.2.4.4 Western Blot.....	45
2.2.4.5 Fluorometrischer Caspase-3-Substrattest.....	46

<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	47
3.1 MG-132 induziert in JNK2 <sup>-/-</sup> murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) verstärkt Apoptose .....	48
3.2 Proteasomale Inhibition löst eine frühe Caspasenaktivierung in JNK2 <sup>-/-</sup> MEFs aus .....	50
3.3 Die Apoptose-Sensitivität von JNK2 <sup>-/-</sup> MEF ist spezifisch gegenüber proteasomaler Inhibition.....	52
3.4 Proteasomale Inhibition führt zu einem beschleunigten Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials in JNK2 <sup>-/-</sup> MEFs.....	53
3.5 MG-132 löst in Abhängigkeit von JNK1 die Akkumulation von Noxa aus .....	54
3.6 Noxa wird für MG-132-induzierte Apoptose in JNK2 <sup>-/-</sup> MEF benötigt.....	57
3.7 Einfluss von MG-132 auf die Noxa-regulierenden Transkriptionfaktoren ATF3, ATF4, HIF1 $\alpha$ und den Glucocorticoidrezeptor (GR) .....	58
3.8 Die Transkriptionfaktoren ATF3 und ATF4 nehmen weder Einfluss auf die MG-132-induzierte Apoptose noch auf die damit einhergehende Induktion von Noxa und Bim.....	59
3.9 Die <i>Knockdowns</i> von HIF1 $\alpha$ oder des Glucocorticoidrezeptors (GR) nehmen in JNK2 <sup>-/-</sup> MEFs weder Einfluss auf MG-132-induzierte Apoptose noch auf die damit auftretende Induktion von Bim und Noxa .....	61
3.10 Einfluss von MG-132 auf die Noxa-regulierenden Transkriptionfaktoren c-Jun, c-Myc und p53...63	63
3.11 c-Myc, nicht p53 oder c-Jun, steuert die MG-132-induzierte Apoptose, nimmt aber keinen Einfluss auf die Expression von Bim oder Noxa.....	64
3.12 c-Myc übt keinen Einfluss auf die MG-132-induzierte JNK1-unabhängige Apoptose von JNK1 <sup>-/-</sup> Zellen aus .....	67
<b>4. DISKUSSION</b> .....	69
4.1 MG-132 induziert über JNK1-abhängige Noxa-Expression Apoptose.....	70
4.2 MG-132 löst auf einem zweiten Weg über die Bim-Aktivierung Apoptose aus.....	71
4.3 Ein unbekannter JNK1-regulierter Transkriptionsfaktor induziert Noxa-Expression nach proteasomaler Inhibition .....	72
4.4 Der Tanskriptionsfaktor c-Myc steuert MG-132-induzierte Apoptose .....	74
4.5 Der Einfluss von JNK1 und JNK2 auf MG-132-vermittelte Apoptose.....	76
4.6 MG-132 induziert Apoptose über drei verschiedene Signalwege .....	77
4.7 Implikationen für die Krebstherapie.....	79
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT</b> .....	81
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	86
<b>7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	101
<b>8. ANHANG</b> .....	107

# ***1. Einleitung***

---

## **1.1 Apoptose**

### **1.1.1 Apoptose – eine Definition**

Apoptose ist ein genetisch programmiertes Zelltodprogramm, das embryonale Morphogenese, T-Zellentwicklung und Gewebshomöostase reguliert (Degterev and Yuan 2008). Bereits 1972 definierten Kerr und Kollegen Apoptose als “einen Mechanismus zur kontrollierten Zellbeseitigung, welcher eine komplementäre, jedoch gegensätzliche Rolle zur Mitose bei Regulierung von tierischen Zellpopulationen innezuhaben scheint“ (Kerr, Wyllie et al. 1972). Diese Definition hat bis heute ihre Gültigkeit behalten. So ist eine Dysregulation der apoptotischen Prozesse mit Pathologien wie Krebs, Autoimmunerkrankungen, Myokardinfarkt, Diabetes mellitus und neurodegenerativen Krankheiten (Alzheimer, Parkinson, Chorea Huntington und Amyotropher Lateralsklerose) assoziiert (Vila and Przedborski 2003; Li and Yuan 2008). Folglich ist die Aufklärung der Signalwege, die auf molekularer Ebene Apoptose regulieren, entscheidend für die Entwicklung von Therapien zur Behandlung dieser Erkrankungen (Fischer and Schulze-Osthoff 2005).

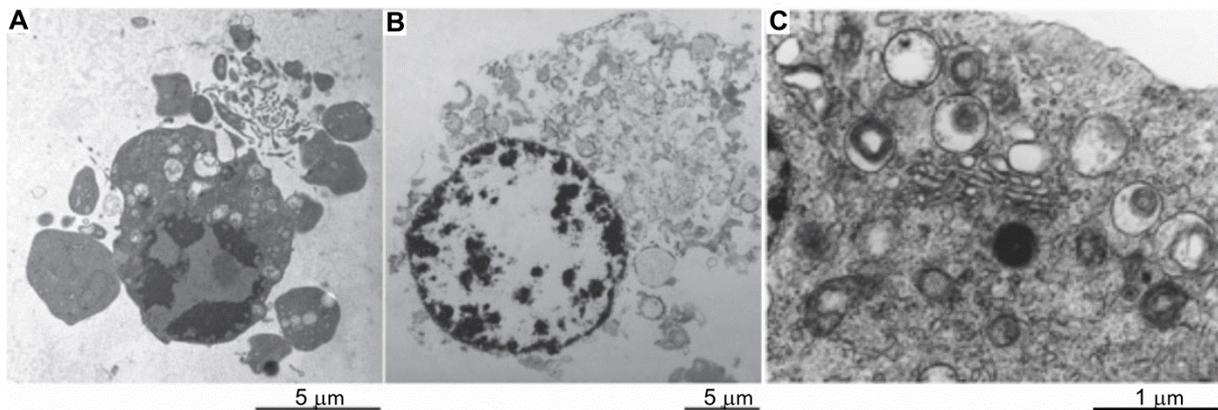
### **1.1.2 Morphologie der Zelltodmechanismen**

Im Jahr 1973 beschrieben Schweichel und Merker anhand von verschiedenen morphologischen Merkmalen drei Arten von Zelltod, die heute als Apoptose (Typ I), Autophagie (Typ II) und Nekrose (Typ III) bekannt sind (Schweichel and Merker 1973) (Abb. 1).

Apoptotischer Zelltod zeichnet sich durch eine Sequenz hoch konservierter morphologischer und biochemischer Veränderungen aus. Zu den frühen morphologischen Merkmalen gehören das Ablösen und Schrumpfen der Zelle, gefolgt von der Blasenbildung der Zellmembran (*Membrane Blebbing*). Daraufhin ist die Aggregation des Chromatins (Pyknose), die gezielte internukleosomale DNA-Spaltung in 180 bp lange Fragmente oder Vielfache davon (Karyorrhexis) sowie die Phosphatidylserin-Exposition an der Zelloberfläche zu beobachten (Wyllie, Kerr et al. 1980). Abschließend zerfällt die Zelle in apoptotische Körperchen. Diese Membran-umschlossenen Vesikel werden von benachbarten Zellen oder Phagozyten aufgenommen und degradiert. Auf diese Weise wird die Freisetzung des Zellinhalts und somit das Auslösen einer inflammatorischen Reaktion verhindert (Ravichandran and Lorenz 2007). Um ihre Phagozytose zu fördern, sendet die apoptotisch sterbende Zelle sogenannte „Finde mich“- und „Iss mich“- sowie

„Anti-Gefahr“-Signale (Lauber, Blumenthal et al. 2004). Mit Hilfe dieses Eliminierungsprozesses werden im menschlichen Körper pro Sekunde eine Million sterbender Zellen so effizient beseitigt, dass nur einige wenige apoptotische Zellen im Gewebe nachweisbar sind (Ravichandran 2010).

Neben Apoptose wurde auch Autophagie als eine mögliche Form des Zelltods beschrieben. Autophagie bezeichnet die lysosomale Degradation von Proteinen, ganzen Organellen und anderen Komponenten des Zytosols und dient dazu, den Zellstoffwechsel im Falle von metabolischem Stress oder Nährstoffmangel aufrechtzuerhalten. Folglich bewahrt der Prozess die Energiehomöostase und somit das Leben der Zelle (Mizushima and Komatsu 2011). In sterbenden Zellen wirkt die Autophagie daher oft der Apoptose entgegen und verlangsamt den Zelltod. Darüber hinaus kann jedoch auch autophagischer Zelltod in Abwesenheit von Apoptose stattfinden (Kroemer and Levine 2008). Hierbei führt der konstante Abbau von zellulären Bestandteilen schließlich dazu, dass der Metabolismus nicht mehr aufrechterhalten werden kann, da zu viele regulatorische Proteine degradiert wurden und die Zelle zu Grunde geht. Um diesen Einfluss zu bestätigen, muss der Zelltod laut Definition durch Hemmung von Autophagie mittels pharmakologischer Inhibitoren oder genetischer Deletion verhindert werden können (Shen and Codogno 2011).



**Abb. 1** Transmissions-Elektronenmikroskopie-Aufnahmen von apoptotisch, nekrotisch und autophagisch sterbenden Zellen (A und B übernommen aus Vandenabeele, Galluzzi et al. 2010, C aus Galluzzi, Maiuri et al. 2007)

(A) Apoptotische Zellen sind gekennzeichnet durch ein schrumpfendes Zellvolumen (Pyknosis), die Kondensation des Chromatins, eine nukleäre Fragmentierung (Karyorrhexis) und den abschließenden Zerfall in apoptotische Körperchen. (B) Eine nekrotische Zelle zeigt ein vergrößertes Zellvolumen (Onkosis), ein durchscheinendes Zytoplasma, anschwellende Organellen, eine Ausdehnung der Zellkernmembran und die fleckenartige Kondensation des Chromatins. Der beschleunigte Verlust der Zellmembranintegrität gipfelt schließlich in der Freisetzung des Zellinhalts. (C) Autophagisch sterbende Zellen weisen eine hohe Anzahl von Doppelmembran-umhüllten Vesikeln mit Organellen und Teilen des Zytosols in ihrem Inneren auf, zudem sind der Golgi-Apparat und das Endoplasmatische Retikulum stark vergrößert. Eine Kondensation des Chromatins findet jedoch nicht statt.

Zu den morphologischen Kennzeichen autophagischen Zelltodes gehört das massive Auftreten von Doppelmembran-umhüllten Vakuolen im Zytosol, den sogenannten Autophagosomen (Codogno, Mehrpour et al. 2011). Ebenso wurde die starke Vergrößerung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi-Apparates beschrieben (Marino and Lopez-Otin 2004). In den letzten Jahren wurden viele molekulare Details der regulierenden Signalwege von Autophagie aufgeklärt und als zentrale Regulatoren die *Autophagy-related Genes* (ATGs) identifiziert (Tsukada and Ohsumi 1993; Levine and Klionsky 2004). Die Gruppe der ATGs steuert die Bildung von Autophagosomen und ihre Fusion mit Lysosomen. Diese Prozesse stehen unter starker Kontrolle einer Vielzahl von Signalwegen. Insbesondere ist die Kinase *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) zu erwähnen, deren Aktivität die Induktion von Autophagie verhindern kann (Kamada, Funakoshi et al. 2000; Jung, Ro et al. 2010; Ravikumar, Sarkar et al. 2010).

Im Gegensatz zum apoptotischen und autophagischen Zelltod geht Nekrose mit einer starken Inflammation durch Freisetzung des Zellinhalts einher. Zu den morphologischen Merkmalen der Nekrose zählen die Zunahme des Zellvolumens (Onkosis), das Anschwellen der Organellen, die Freisetzung von mitochondrialen Proteinen, die Ausdehnung der Zellkernmembran bei gleichzeitiger Kondensation des Chromatins in begrenzten Bereichen und unsystematischer DNA-Degradation sowie ein Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies (*Reaktive Oxygen Species, ROS*) und der beschleunigte Verlust der Zellmembranintegrität (Degterev and Yuan 2008). Während diese Art des Zelltodes lange als unkontrollierte Reaktion der Zelle auf ein Übermaß an Stress galt, konnten in den letzten Jahren zahlreiche Effektormoleküle identifiziert werden, die Nekrose auch als regulierten Prozess mit distinkten Signalwegen definieren (Vandenabeele, Galluzzi et al. 2010). So sterben Zellen nach Stimulation von Todesrezeptoren bei gleichzeitiger beeinträchtigter Apoptose nekrotisch und in Abhängigkeit der Kinaseaktivität der *Receptor (TNFRSF)-Interacting Serine-/Threonine Kinases* (RIPK) 1 und 3 (Degterev, Hitomi et al. 2008; Vandenabeele, Declercq et al. 2010).

### **1.1.3 Der Schlüssel - die Caspasenfamilie**

Die Geschichte der Caspasen begann mit der Identifizierung von Caspase-1 als derjenigen Protease, die den Entzündungsmediator Interleukin-1 $\beta$  durch Spaltung in

seine aktive Form konvertiert (Cerretti, Kozlosky et al. 1992; Thornberry, Bull et al. 1992). Caspasen sind eine konservierte Familie von Cystein-abhängigen Aspartat-Proteasen. Anhand ihrer Sequenzhomologie und Funktion können sie in die Gruppen der apoptotischen und der inflammatorischen Caspasen eingeteilt werden (Degterev, Boyce et al. 2003). Bis jetzt wurden in Mammalia fünfzehn Caspasen identifiziert, von denen elf im Menschen und zehn in der Maus exprimiert werden (Li and Yuan 2008).

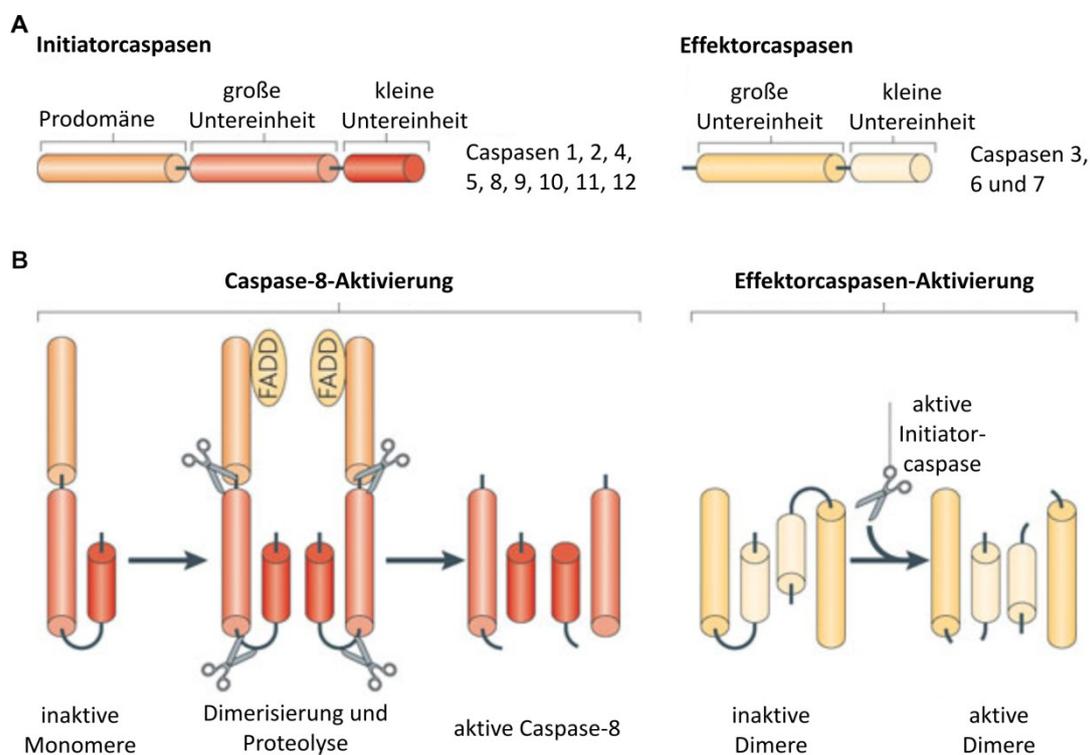
Von diesen sind die pro-inflammatorischen Caspasen 1, 4, 5, 11 und 12 für die Prozessierung von Zytokinen (z. B. IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-18) während der Aktivierung der angeborenen Immunantwort essenziell und können den als Pyroptosis bekannten proinflammatorischen, lytischen Zelltod nach bestimmten Bakterieninfektionen ohne Aktivität von apoptotischen Caspasen induzieren (Martinon and Tschopp 2007; Bergsbaken, Fink et al. 2009). Während die murine Caspase-12 neben der pro-inflammatorischen Rolle auch mit Zelltod nach ER-Stress assoziiert ist, wird die humane Caspase-12 in den meisten Populationen als inaktive Form exprimiert (Fischer, Koenig et al. 2002; Momoi 2004). Eine Sonderrolle besitzt dahingegen Caspase-14, welche ausschließlich die Differenzierung von Keratinozyten reguliert und in ihrer Expression auf verhornte Epithelien beschränkt ist (Denecker, Ovaere et al. 2008).

Des Weiteren sind insgesamt sieben der Caspasen in apoptotische Prozesse involviert und können in Initiator- und Effektorcaspasen eingeteilt werden (Abb. 2A). Sie sind für den biochemischen Phänotyp apoptotisch sterbender Zellen verantwortlich, indem sie gezielt die Spaltung hunderter verschiedener Substrate vermitteln (Cryns and Yuan 1998; Fischer, Janicke et al. 2003).

Alle Caspasen gleichen sich in ihrem Aufbau aus einer kleinen (p10) und einer großen (p20) Domäne. Caspasen werden als katalytisch inaktive Proenzyme (Zymogene) exprimiert und erst durch proteolytische Spaltung zwischen den Domänen aktiviert (Abb. 2B). Im Fall der Effektorcaspasen wird hierdurch eine Konformationsänderung ausgelöst, welche die Ausbildung aktiver Heterodimere ermöglicht. Die große Untereinheit besitzt das katalytisch aktive Cystein, während die kleine Untereinheit Substrat-bindende Taschen (P4-P3-P2-P1) formt (Salvesen and Ashkenazi 2011). Diese Taschen bestimmen die Sequenzspezifität der Caspasen für Tetrapeptide, die an Position P1 stets ein Aspartat besitzen (Thornberry 1997). Die katalytische Aktivität erhöht sich nach der Aktivierung der Effektorcaspasen um mehrere Potenzen (>10.000-fach) und das apoptotische Signal breitet sich durch Spaltung anderer Caspasen kaskadenartig aus

(Salvesen and Dixit 1999). Somit führt die Initiierung der Caspasen nach Erreichen eines Schwellenwertes (*point-of-no-return*) unweigerlich zum apoptotischen Zelltod (Deshmukh, Kuida et al. 2000).

Daraus folgt die Notwendigkeit einer starken apikalen Kontrolle, welche durch die streng regulierte Aktivierung der Initiatorcaspasen erreicht wird. Während die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 nur einen 20-30 Aminosäuren kurzen N-terminalen Bereich besitzen, zeichnen sich die Initiatorcaspasen 2, 8, 9 und 10 sowie die inflammatorischen Caspasen durch eine große Prodomäne aus (Riedl and Shi 2004). Diese besteht entweder aus dem homotypischen Proteininteraktionsmotiv der *Death Effector Domain* (DED) oder der *Caspase Recruiting Domain* (CARD) (Degterev, Boyce et al. 2003).



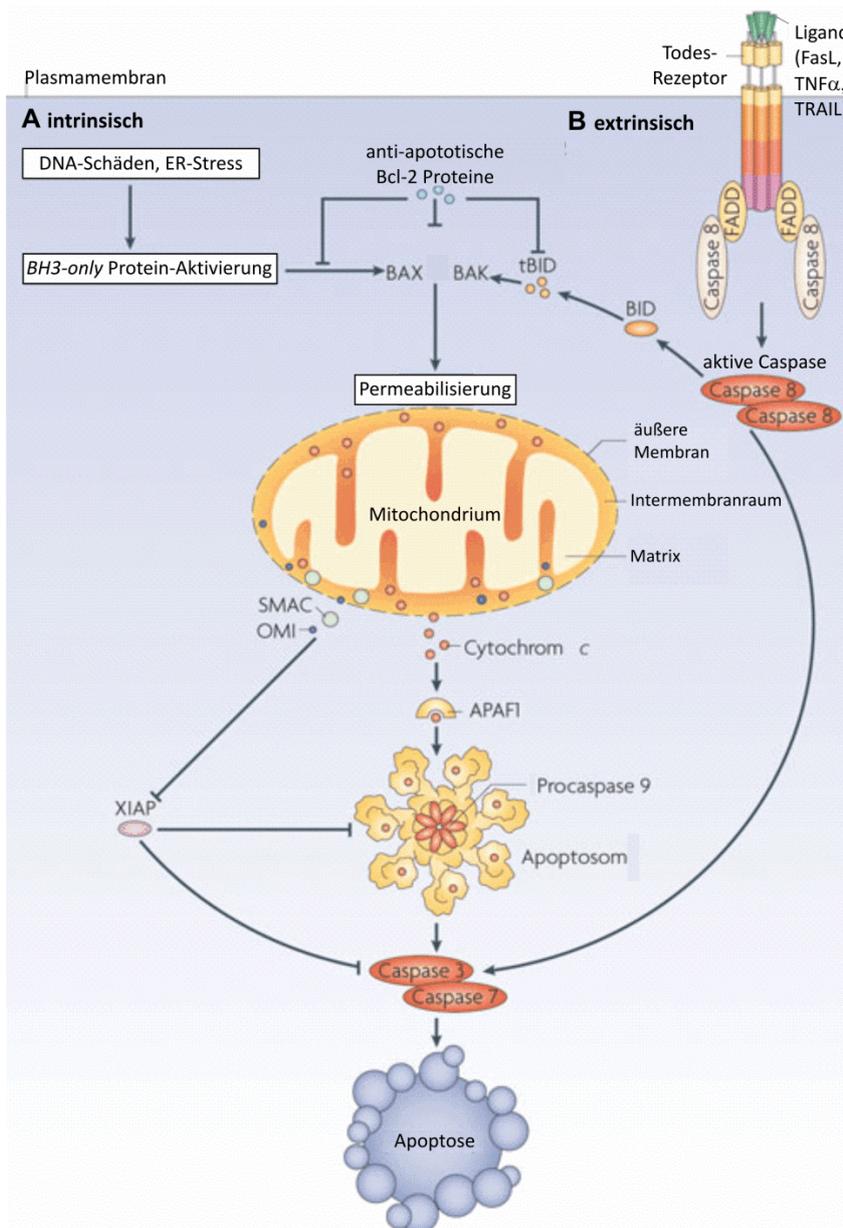
**Abb. 2 Struktur und Aktivierung von Caspasen** (verändert übernommen aus Tait and Green 2010)

(A) Alle Caspasen besitzen eine kleine und eine große Untereinheit, jedoch weisen die Effektorcaspasen nur eine kleine N-terminale Domäne (<30 AS) auf, während sich die Initiatorcaspasen durch eine große N-terminale Prodomäne auszeichnen. Caspase-8 und -10 besitzen jeweils zwei *Death Effector Domains* (DEDs), während Caspasen 1, 2, 4, 5, 9, 11 und 12 eine *Caspase Recruiting Domain* (CARD) zur Proteininteraktion nutzen. Die apoptotischen Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9, -10) wirken apikal in apoptotischen Signalkaskaden und ihre Aktivität wird für die Aktivierung der Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7) benötigt, welche für die charakteristischen phänotypischen Veränderungen apoptotischer Zellen verantwortlich sind. (B) Die (beispielhafte) Aktivierung der inaktiven Initiatorcaspase-8 beginnt mit der Dimerisierung der Caspasenmonomere nach ihrer Rekrutierung in den Todesrezeptorkomplex. Hierbei findet die Bindung an das Adapterprotein FADD über die homophile Interaktion der DEDs beider Proteine statt. Die Dimerisierung sowie die auto- und transproteolytische Spaltung werden für die Aktivierung und Stabilisierung der aktiven Caspase-8 nach dem *Induced-Proximity*-Modell benötigt. Die Effektorcaspasen werden dagegen durch einen anderen Mechanismus aktiviert. Sie sind als inaktive Homodimere in der Zelle vorhanden und werden von aktiven Initiator- oder anderen Effektorcaspasen proteolytisch gespalten. Dies löst intramolekulare Umorganisationen und die Bildung eines enzymatisch aktiven Dimers aus.

Die Aktivierung der Initiatorcaspasen unterliegt einer proteolytischen sowie allosterischen Regulation und erfolgt nach Assemblierung in hochmolekularen Komplexen. Dort werden die schwach aktiven Initiatorcaspasen nach dem *Induced-Proximity*-Modell in räumliche Nähe zueinander gebracht, um schließlich durch auto- und transproteolytische Spaltung ihre volle Aktivierung auszulösen (Muzio, Stockwell et al. 1998). So werden die Initiatorcaspasen 8 und 10 im sogenannten *Death Inducing Signaling Complex* (DISC), Caspase-9 im Apoptosom und Caspase-2 im PIDDosom aktiviert (Tinel and Tschopp 2004). Auch die Aktivierung der inflammatorischen Caspasen 1 und 5 wird durch einen großen Proteinkomplex, das Inflammosom, vermittelt (Miao, Rajan et al. 2011).

#### **1.1.4 Der extrinsische Apoptose-Signalweg**

Die Auslösung von Apoptose erfolgt über eine von zwei Signalkaskaden, entweder über den intrinsischen oder über den extrinsischen Signalweg. Beide resultieren schließlich in der Aktivierung der Effektorcaspasen und führen dadurch letztendlich zum Zelltod (Abb. 3). Die extrinsische Apoptose wird durch die Bindung von extrazellulären Liganden (FasL/CD95L, TNF $\alpha$ , TRAIL) an einige Todesrezeptoren der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor Superfamilie an der Zelloberfläche initiiert. Die Mitglieder dieser Familie (Fas/CD95, TNFR1, TNFR2, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2) zeichnen sich in ihrer extrazellulären Domäne durch eine Vielzahl cysteinreicher Motive zur Interaktion mit ihren homotrimeren Liganden und im zytoplasmatischen Bereich durch eine *Death Domain* (DD) aus (Schutze, Tchikov et al. 2008). Nach Ligandenbindung und Trimerisierung des Rezeptors werden über diese intrazelluläre Domäne *Fas-associated Protein with Death Domain* (FADD) und weitere Adapterproteine aus dem Zytosol rekrutiert. Anschließend binden Procaspase-8 (und Procaspase-10 im Menschen) über homophile Interaktion der DEDs an FADD und werden im hierdurch entstehenden *Death Inducing Signaling Complex* (DISC) mittels auto- und transproteolytischer Spaltung nach dem oben erwähnten *Induced-Proximity*-Modell aktiviert (Kischkel, Hellbardt et al. 1995). Die nun aktive Initiatorcaspase prozessiert und aktiviert direkt die Effektorcaspasen 3 und 7.



**Abb. 3 Der intrinsische und extrinsische Signalweg der Apoptose** (entnommen aus Tait and Green 2010)

(A) Stimuli des intrinsischen Signalweges wie z.B. ER-Stress oder DNA-Schäden führen zur Aktivierung der *BH3-only* Proteine, die wiederum Bax und Bak aktivieren und dadurch zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran führen. Dies wird durch anti-apoptische Bcl-2 Proteine über die Bindung an Bax, Bak und *BH3-only* Proteine verhindert. Nach Aktivierung von Bax und Bak führt die Freisetzung von Apoptose-fördernden Proteinen aus dem mitochondrialen Intermembranraum zur Caspasenaktivierung: Cytochrom c induziert die Oligomerisierung von Apaf-1 zur Formierung des Apoptosoms und hierüber die Aktivierung der Initiatorcaspase-9. Caspase-9 spaltet die Effektorcaspasen 3 und 7 und die hierdurch ausgelöste Caspasenkaskade führt schließlich zum apoptotischen Zelltod. Die aus den Mitochondrien freigesetzten Proteine Smac/DIABLO und OMI/HTRA2 wirken der Caspasen-inhibierenden Funktion von XIAP entgegen und ermöglichen so die Aktivierung der Caspasenkaskade. (B) Der extrinsische Apoptose-Signalweg wird nach Bindung von spezifischen Liganden an die Todesrezeptoren induziert, die zur Rekrutierung von Adapterproteinen wie FADD und schließlich Procaspase-8 führen. Dies resultiert in der Bildung des hochmolekularen Komplexes DISC, in welchem die Dimerisierung und Aktivierung von Caspase-8 nach dem *Induced-Proximity*-Modell stattfinden. Schließlich induziert aktive Caspase-8 durch Spaltung von Caspase-3 und -7 Apoptose. Der extrinsische Signalweg wird mit dem intrinsischen verknüpft, wenn Caspase-8 das *BH3-only* Protein Bid durch Spaltung aktiviert. Das Produkt tBid wird in einigen Zelltypen für die vollständige Aktivierung der Caspasenkaskade benötigt.

Eine Kontrolle der Caspase-8-Aktivierung ist über das Protein *cellular FLICE Inhibitory Protein* (cFLIP) möglich, welches eine Caspase-8-ähnliche Struktur besitzt und damit anstelle dieser in den DISC rekrutiert wird. cFLIP ist jedoch katalytisch inaktiv und hemmt somit die Bildung eines aktiven Caspase-8-Dimers (Irmeler, Thome et al. 1997).

Daneben regulieren die *cellular Inhibitors of Apoptosis* (cIAP) 1 und 2 die Caspasenaktivierung am Todesrezeptor indirekt, indem sie die Proteine des Komplexes durch Ubiquitylierung modulieren und für proteasomale Degradation markieren (Gyrd-Hansen and Meier 2010).

In den sogenannten Typ I-Zellen reicht der Todesrezeptor-Stimulus aus, um die Caspasenkaskade und schließlich Apoptose vollständig zu initiieren. Dahingegen benötigen Typ II-Zellen die verstärkende Wirkung des intrinsischen Signalweges, um das pro-apoptotische Signal zur vollständigen Caspasenaktivierung zu amplifizieren, da durch den Rezeptorstimulus nicht ausreichend Effektorcaspasen aktiviert werden können (Scaffidi, Fulda et al. 1998). Die Verknüpfung der beiden Apoptose-Signalwege wird durch die Spaltung des *BH3-only* Proteins Bid in seine aktive Form *truncated Bid* (tBid) durch aktive Caspase-8 ermöglicht. Das aktive tBid transloziert zu den Mitochondrien und induziert den intrinsischen Signalweg der Apoptose (Li, Zhu et al. 1998; Luo, Budihardjo et al. 1998).

### **1.1.5 Der intrinsische Signalweg der Apoptose**

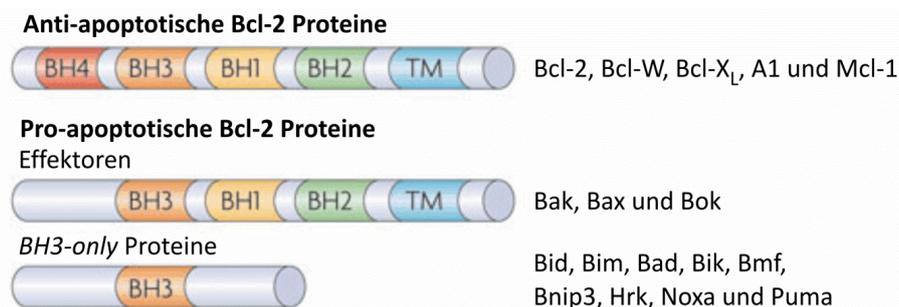
Der intrinsische Signalweg kann durch Wachstumsfaktor-Entzug, Inhibition des Proteasoms, DNA-Schädigung beispielsweise durch  $\gamma$ - oder UV-Bestrahlung oder, wie oben erwähnt, durch die Verknüpfung mit dem extrinsischen Weg über tBid ausgelöst werden (Abb. 3). Das zentrale Ereignis ist hierbei die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, durch die mehrere pro-apoptotische Proteine aus dem mitochondrialen Intermembranraum freigesetzt werden, wie beispielsweise Cytochrom c, Smac/DIABLO und OMI/HTR2A (Ow, Green et al. 2008). Cytochrom c nimmt zwar aufgrund seiner zentralen Funktion bei der ATP-Synthese eine lebensnotwendige Stellung in der mitochondrialen Atmungskette ein, besitzt daneben jedoch auch Zelltod-förderndes Potenzial, wenn es ins Zytosol entlassen wird (Liu, Kim et al. 1996). Hier induziert es nach Assoziation mit Apaf-1 dessen Konformationsänderung, welche nach Bindung von ATP/dATP zur Oligomerisierung von jeweils sieben Apaf-1-Proteinen zu einem hochmolekularen Komplex führt. Über

eine Wechselwirkung der CARD-Domänen von Caspase-9 und Apaf-1 wird die Initiatorcaspase in diesen Proteinkomplex rekrutiert und so das radförmige, heptamere Apoptosom ausgebildet. Die Aktivierung von Caspase-9 wird durch eine Apoptosom-vermittelte Konformationsänderung ausgelöst (Riedl and Salvesen 2007). Schließlich werden hier auch die Effektorcaspasen 3 und 7 direkt durch die Initiatorcaspase-9 und Caspase-6, indirekt durch andere Effektorcaspasen aktiviert, was schließlich zu einer kaskadenartigen Verstärkung des Todessignals führt. Diese Signalkaskade wird durch ein Protein der IAP-Familie, *X-Chromosome-linked IAP* (XIAP), unterbrochen, indem XIAP direkt an die aktiven Caspasen 3, 7 und 9 bindet und so ihre proteolytische Aktivität hemmt (Deveraux, Takahashi et al. 1997). Als Gegenspieler von XIAP wirken Smac/DIABLO und OMI/HTR2A, welche, wie oben erwähnt, zusammen mit Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt werden und die Caspasen-inhibierende Aktivität von XIAP aufheben (Gyrd-Hansen and Meier 2010).

### 1.1.6 Die Bcl-2 Familie

Die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, welche durch Freisetzung von Cytochrom c zur Aktivierung der Caspasenkaskade führt, unterliegt der strengen Kontrolle von miteinander interagierenden pro- und anti-apoptotischen *B-cell CLL/lymphoma-2* (Bcl-2) Familienproteinen (Abb. 4).

Das erste namensgebende Mitglied der Bcl-2 Familie wurde durch die häufig auftretende Chromosomen-Translokation t(14;18) in B-Zelllymphoma entdeckt, die zu einer massiven Überexpression dieses Proteins führt (Tsujimoto, Cossman et al. 1985).

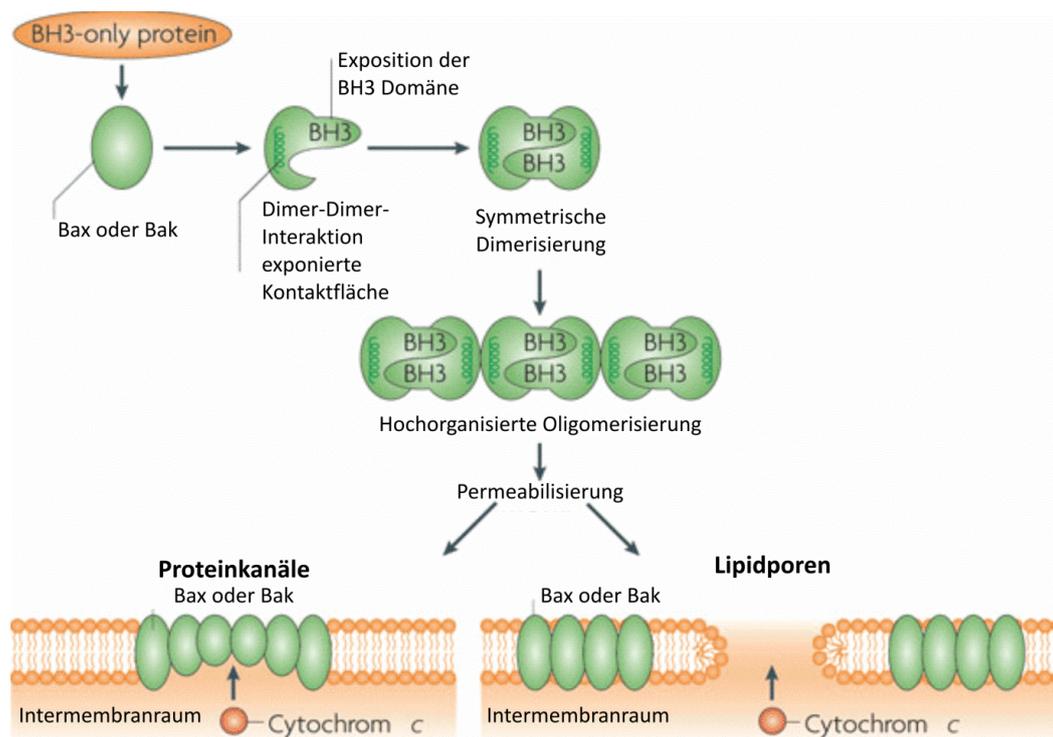


**Abb. 4 Die Bcl-2 Familie** (entnommen aus Tait and Green 2010)

Die Bcl-2 Familienproteine werden in Abhängigkeit von ihrer BH-Domänenorganisation in drei Gruppen eingeteilt. Die anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine besitzen vier BH-Domänen und verhindern durch Bindung an die pro-apoptotischen Bcl-2 Proteine die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran. Die pro-apoptotischen Bcl-2 Proteine können in zwei Subgruppen mit drei bzw. einer BH-Domäne eingeteilt werden: Die Effektoren, auch Mutidomänen-Proteine genannt, welche bei ihrer Aktivierung direkt zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran führen, und die *BH3-only* Proteine, welche das apoptotische Signal zu den Effektoren weiterleiten. Obwohl Bok große strukturelle Ähnlichkeit zu Bax und Bak aufweist, gibt es wenige Hinweise, dass es sich um einen funktionalen Effektor handelt.

Bcl-2 war zu diesem Zeitpunkt das erste identifizierte Onkogen, welches Karzinogenese nicht durch Induktion von Zellproliferation, sondern durch Inhibition von Zelltod fördert (Vaux, Cory et al. 1988).

Die Bcl-2 Familienproteine können anhand der Organisation ihrer Bcl-2 Homologie (BH)-Domänen in drei Gruppen eingeteilt werden (Lomonosova and Chinnadurai 2008). Die erste Gruppe der Bcl-2 Proteine inhibiert Apoptose und besitzt vier BH-Domänen, während die zweite und die dritte Gruppe pro-apoptotisch wirken und sich durch drei (Effektor-/Multidomänen-Proteine) bzw. eine BH-Domäne (*BH3-only* Proteine) auszeichnen. Zu den Effektoren der pro-apoptotischen Bcl-2 Proteine gehören Bax und Bak, deren Aktivierung essenziell für die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran ist. Die Regulation der beiden konstitutiv exprimierten Proteine erfolgt überwiegend posttranslational über die Interaktion mit den anderen Bcl-2 Familienproteinen, jedoch ist beispielsweise auch die Hochregulierung der Bax-Expression durch den Transkriptionsfaktor p53 beschrieben (Miyashita, Krajewski et al. 1994).



**Abb. 5 Die Aktivierung von Bax und Bak und Modelle zur Porenbildung** (entnommen aus Tait and Green 2010)

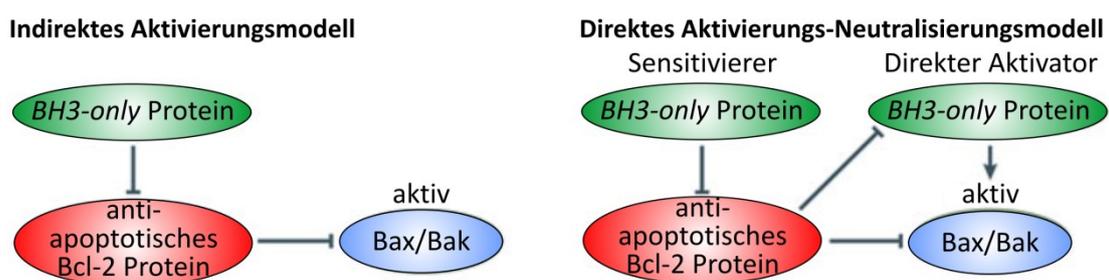
Die Bindung von *BH3-only* Proteinen aktiviert Bax und Bak durch eine starke Konformationsänderung. Daraufhin werden die BH3-Domäne und die hydrophobe Spalte exponiert und erlauben die symmetrische Formierung von Bax- oder Bak-Dimeren durch wechselseitige Interaktion der BH3-Domäne und der hydrophoben Spalte. Während der Aktivierung wird auch eine Dimer-Dimer-Interaktionsfläche zugänglich, welche die Oligomerisierung zu höheren Organisationsstrukturen ermöglicht. Diese Oligomere permeabilisieren die äußere Mitochondrienmembran über einen unbekanntem Mechanismus, vermutlich durch die Bildung von Proteinkanälen oder Lipidporen nach Destabilisierung der Lipidmembran.

Bax liegt überwiegend als inaktives Monomer im Zytosol vor, wohingegen Bak in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist (Nechushtan, Smith et al. 1999; Zhou and Chang 2008). Während der Aktivierung wird die Translokation von Bax zu den Mitochondrien sowie über eine Konformationsänderung die Homooligomerisierung der Multidomänen-Proteine ausgelöst. Die Struktur und Existenz der Poren in der äußeren Mitochondrienmembran, die zur Freisetzung pro-apoptotischer Proteine und dem damit einhergehenden Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials ( $\Delta\Psi_m$ ) führen, werden kontrovers diskutiert (Tait and Green 2010). Die Aktivierung von Bak und Bax ist hierbei essenziell, wie die Resistenz von Bax<sup>-/-</sup>Bak<sup>-/-</sup> Zellen gegenüber einer Vielzahl von Stimuli des intrinsischen Signalweges zeigen (Wei, Zong et al. 2001). Modelle beschreiben (Abb. 5), dass Bax und Bak entweder durch Oligomerisierung Proteinporen – *Mitochondrial Apoptosis-induced Channels* (MAC) – ausbilden oder alternativ die Formierung von Lipidporen durch Destabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran fördern (Kuwana, Mackey et al. 2002; Martinez-Caballero, Dejean et al. 2009). Bis jetzt ist kein definitiver Beweis für eines der Modelle gefunden worden, es scheint eher so, dass Aspekte beider Modelle zutreffen. Des Weiteren wurden Konzepte zur Modulation von existierenden Multiproteinkomplexen, wie den *Permeability Transition Pore Complexes* (PTPC) oder *Voltage-dependent Anion Channels* (VDAC), in den Mitochondrien entwickelt (Schinzel, Takeuchi et al. 2005; Shoshan-Barmatz, Keinan et al.; McCommis and Baines 2012). Dieses konnte jedoch in *Knockout*-Studien bisher nicht bestätigt werden (Nakagawa, Shimizu et al. 2005; Baines, Kaiser et al. 2007).

In ungestressten Zellen wirkt die Gruppe der anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine der Aktivierung der pro-apoptotischen Bcl-2 Proteine durch Proteininteraktion entgegen. Zu dieser Gruppe gehören Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, Mcl-1 und A1/BFL-1. Eine Überexpression jener anti-apoptotischer Proteine verhindert die Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalweges (Leibowitz and Yu 2010). Die Gruppe der *BH3-only* Proteine wirkt den anti-apoptotischen Mitgliedern entgegen und leitet das pro-apoptotische Signal zu den Effektoren Bax und Bak weiter. Diese heterogene Gruppe besteht aus den Proteinen Bim, Puma, Noxa, Bik, Bmf, Bid, HrK, Bnip3 und Bad. Die Überexpression von *BH3-only* Proteinen fördert bei Anwesenheit von Bax oder Bak Apoptose in vielen Zelltypen (Giam, Huang et al. 2009). Ihre Bindungsspezifität für die anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine ist sehr unterschiedlich. So binden beispielsweise Bim, Puma und tBID alle fünf anti-apoptotischen Proteine, während die Interaktion von Bad auf Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>

sowie Bcl-W begrenzt ist und Noxa nur mit Mcl-1 und A1 in Wechselwirkung tritt (Lomonosova and Chinnadurai 2008). Die *BH3-only* Proteine unterliegen einer vielseitigen Regulation durch Genexpressionskontrolle sowie posttranskriptionelle und posttranslationale Prozesse und können auf diese Weise in Abhängigkeit des Stimulus differenziert aktiviert werden. So ist die transkriptionelle Induktion der Mitglieder Puma, Noxa, Bim, Hrk und Bik nach bestimmten Stimuli durch die Transkriptionsfaktoren E2F1, p53, Foxo3a, Chop oder HIF beschrieben (Bruick 2000; Oda, Ohki et al. 2000; Hershko and Ginsberg 2004; Kim, Ahn et al. 2004). Daneben erfolgt eine Regulation der mRNA-Stabilität und die Einflussnahme von micro-RNAs (Matsui, Asou et al. 2007; Zhang, Zuo et al. 2012). Bid wird wie oben beschrieben (s. 1.1.4 Der extrinsische Apoptose-Signalweg) proteolytisch reguliert, indem es von Caspase-8 in seine aktive Form tBid gespalten wird (Li, Zhu et al. 1998).

Weitere wichtige posttranslationale Regulationsmechanismen sind der gezielte Proteinabbau über das Ubiquitin-Proteasom-System sowie verschiedene Phosphorylierungsprozesse. So beeinflussen Phosphorylierungen beispielsweise Bik positiv und Bad negativ in ihrer Aktivität (Zha, Harada et al. 1996; Verma, Zhao et al. 2001). Bim unterliegt in seiner Regulation einem komplexen Phosphorylierungsmuster und wird in Abhängigkeit von der jeweiligen Phosphorylierungsstelle entweder aktiviert oder gehemmt. Somit kann dessen Aktivität je nach Stimulus und involvierter Kinase spezifisch reguliert werden (Hubner, Barrett et al. 2008).



**Abb. 6 Modelle zur Aktivierung von Bax und Bak** (entnommen aus Tait and Green 2010)

Es existieren zwei Modelle zur Bax- und Bak-Aktivierung: Das indirekte Aktivierungs-Modell und das direkte Aktivierungs-Neutralisierungs-Modell. Das indirekte Aktivierungs-Modell postuliert, dass die Effektoren Bax und Bak in einem konstitutiv aktiven Zustand vorliegen. Durch die ständige Bindung an anti-apoptische Bcl-2 Familienproteine werden sie jedoch inhibiert. Erst nach Interaktion der *BH3-only* mit den anti-apoptischen Proteinen werden die aktiven Effektoren freigesetzt und bewirken die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran. In dem direkten Aktivierungs-Neutralisierungs-Modell liegen Bax und Bak in einem inaktiven Zustand vor und ihre Aktivierung erfolgt erst durch Interaktion mit einer Untergruppe der *BH3-only* Proteine, den sogenannten direkten Aktivatoren. Die anti-apoptischen Bcl-2 Proteine verhindern die Permeabilisierung der Mitochondrien, indem sie Bax und Bak oder die aktivierenden *BH3-only* Proteine binden. Eine zweite Untergruppe der *BH3-only* Proteine, die Sensitivierer, können Bax und Bak nicht direkt aktivieren, jedoch die anti-apoptischen Bcl-2 Proteine neutralisieren.

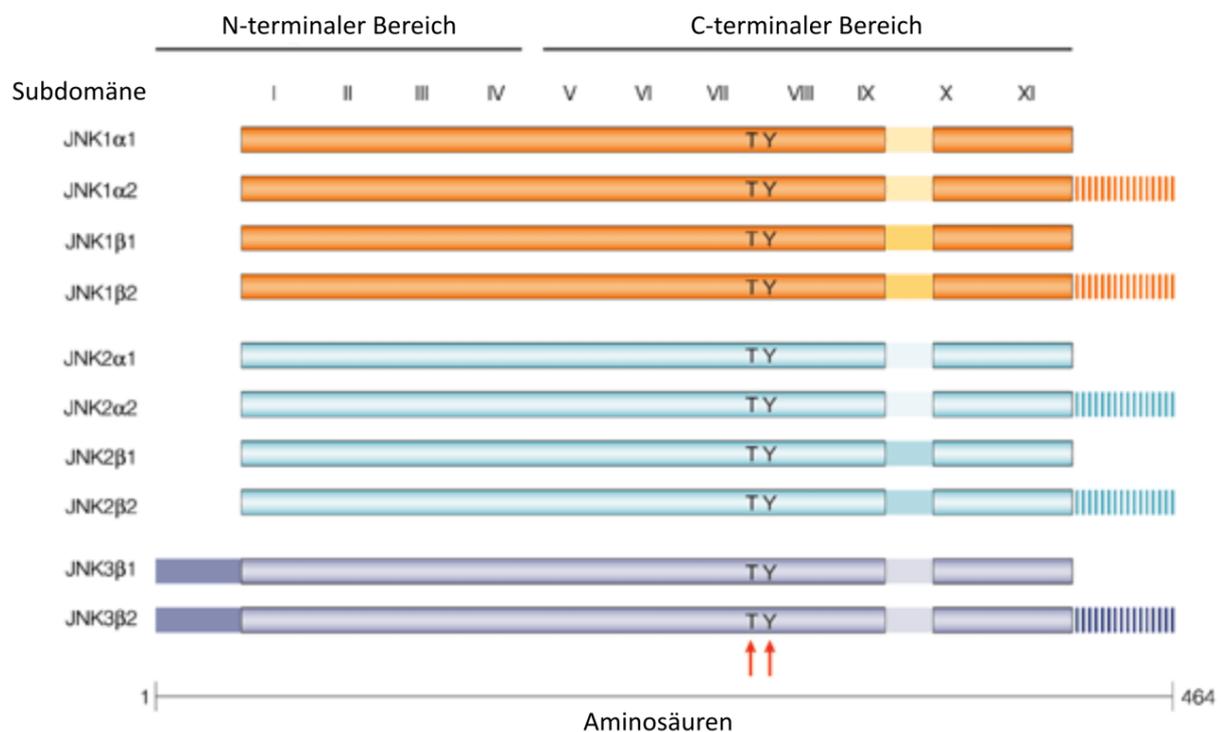
Für die Aktivierung von Bax und Bak durch *BH3-only* Proteine existieren zwei Modelle (Abb. 6). Das indirekte Aktivierungs-Modell erklärt, dass Bax und Bak in einem aktiven Zustand vorliegen und dauerhaft von anti-apoptotischen Bcl-2 Familienproteinen inhibierend gebunden werden (Chen, Willis et al. 2005; Willis, Fletcher et al. 2007). Erst nach Interaktion von *BH3-only* Proteinen mit den anti-apoptotischen Proteinen werden Bax und Bak freigesetzt und können die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran ermöglichen. In dem direkten Aktivierungs-Neutralisierungs-Modell werden Bax und Bak durch Interaktion mit einer Untergruppe der *BH3-only* Proteine, den sogenannten direkten Aktivatoren, initiiert. Die anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine verhindern dies durch Bindung an Bax und Bak sowie an die aktivierenden *BH3-only* Proteine (Kim, Rafiuddin-Shah et al. 2006). Diese anti-apoptotische Aktivität wird von der anderen, sensitivierenden Gruppe der *BH3-only* Proteine neutralisiert. Die Sensitivierer allein sind allerdings nicht dazu in der Lage, Bax und Bak zu aktivieren, da sie nicht an diese binden können. Bis jetzt wurden experimentelle Hinweise gefunden, die sowohl für das indirekte Aktivierungs-Modell als auch für das direkte Aktivierungs-Neutralisierungs-Modell sprechen (Tait and Green 2010).

## 1.2 Die c-Jun N-terminalen Kinasen

### 1.2.1 Die Struktur der c-Jun N-terminalen Kinasen

Die Familie der c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) ist auch unter dem Namen Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) bekannt und gehört zusammen mit der ERK- und p38-Familie zur distinkten und evolutionär konservierten Gruppe der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) (Derijard, Hibi et al. 1994). So finden sich nicht nur in Mammalia, sondern auch in *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und in *Schizosaccharomyces pombe* Homologe zu den JNK-Proteinen (Davis 2000). In Säugetieren wird die JNK-Familie (JNK1, JNK2 und JNK3) von drei Genen codiert. Während JNK3 ein distinktes Expressionsmuster aufweist (Gehirn, Nerven, Herz, Hoden und Niere), ist die Expression von JNK1 und JNK2 ubiquitär (Martin, Mohit et al. 1996). Durch alternatives Spleißen erhöht sich die Diversität dieser Serin-/Threoninkinasen auf zehn Varianten (Abb. 7), da für JNK1 sowie JNK2 je vier Isoformen und für JNK3 zwei Isoformen existieren (Gupta, Barrett et al. 1996). So gehen zum einen aus dem Spleißprozess in der Nähe des 3'-Endes der mRNA die p46- und p54-Formen hervor, die jeweils 80% Identität zwischen den Isoformen aufweisen (Barr and Bogoyevitch 2001).

Des Weiteren entstehen durch alternativen Gebrauch des Exons sechs die  $\alpha/\beta$ -Formen. Es wurde beschrieben, dass die alternativen  $\alpha/\beta$ -Isoformen der Kinasen sich in ihrer Bindungsfähigkeit und Phosphorylierung von Substraten unterscheiden (Gupta, Barrett et al. 1996). Auch in unserem Labor konnte eine unterschiedliche Regulation der einzelnen JNK-Isoformen in *in vitro* Kinasereaktionen beobachtet werden (Neise, Sohn et al. 2010). Wie deren Name schon impliziert, gehören zu den aktivierenden Signalen der SAPK überwiegend exogene Stress-Stimuli: UV- und  $\gamma$ -Strahlung, Inhibition der Proteinsynthese oder des Proteasoms, Hyperosmolarität und zytotoxische Substanzen (Bogoyevitch 2006). JNK-Proteine können jedoch auch von endogenen Signalen aktiviert werden, beispielsweise durch T-Zellrezeptor-Stimulation, inflammatorische Zytokine (TNF $\alpha$ , Interleukine), Onkogene, Ceramide und Wachstumsfaktoren (Nishina, Wada et al. 2004). Basierend hierauf lässt sich ableiten, dass JNKs in diversen Signalübertragungswegen eine Rolle spielen.



**Abb. 7 Die Struktur der JNK-Isoformen** (entnommen aus Manning and Davis 2003)

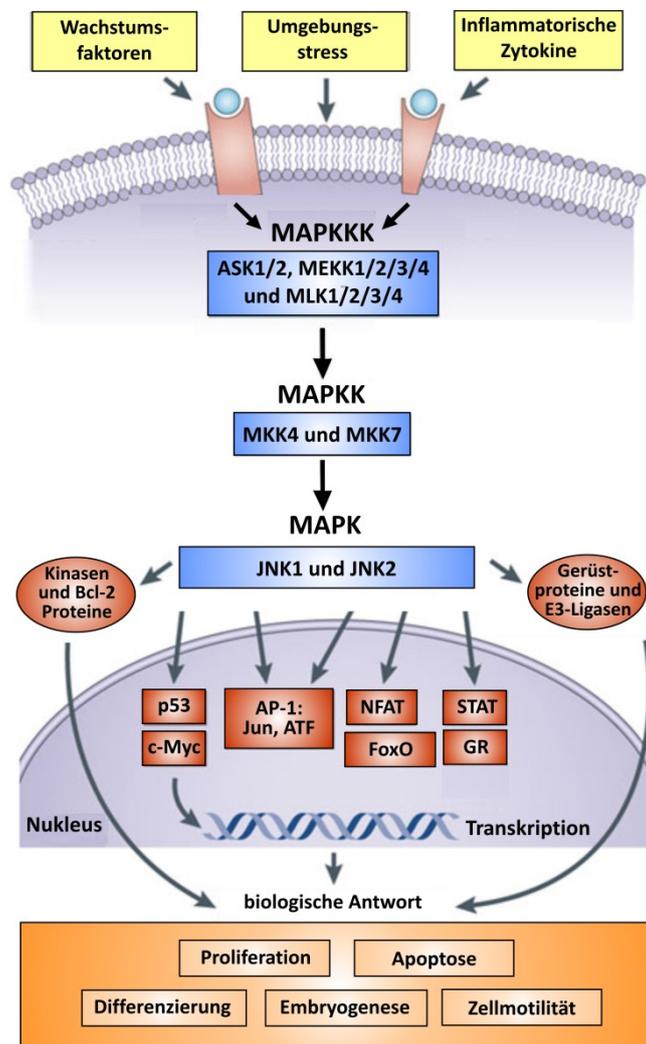
Die JNK-Proteine sind aus bis zu je 464 Aminosäuren aufgebaut, die in 11 Subdomänen I-XI aufgeteilt werden können. Durch alternatives Spleißen der drei JNK-Gene (JNK1, JNK2 und JNK3) entstehen zehn verschiedene Isoformen, deren Unterschiede durch Schraffierungen gekennzeichnet sind. Die  $\alpha/\beta$ -Formen von JNK unterscheiden sich im Bereich der Subdomänen IX und X, wodurch die unterschiedliche Substrataffinität der Isoformen erzeugt wird. Die p46/p54-Formen von JNK besitzen verschiedene C-Termini und variieren in ihrer Primärstruktur um 42 bzw. 43 Aminosäuren. JNK wird durch eine duale Phosphorylierung an Threonin 183 (T) und Tyrosin 185 (Y) (gekennzeichnet mit ↑) aktiviert.

### 1.2.2 Die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinasen

Die Aktivierung von JNK und der beiden anderen MAPK ist durch eine Kinasenkaskade streng koordiniert und dadurch sehr spezifisch (Abb. 8). Eine sequenzielle Phosphorylierungsreaktion leitet das aktivierende Signal über MAPK-Kinase-Kinasen (MAPKKK) zu den MAPK-Kinasen (MAPKK/MKK) und schließlich zur MAPK (Cargnello and Roux). Im Falle von JNK phosphorylieren die beiden MAPK-Kinase MKK4 und MKK7 synergistisch ein Thr-Tyr-Pro-Motiv innerhalb des Aktivierungsbogens im JNK-Protein (Lin, Minden et al. 1995; Lu, Nemoto et al. 1997). Diese duale Phosphorylierung an Threonin 183 und Tyrosin 185 wird für die vollständige Aktivierung von JNK benötigt, da diese durch Konformationsänderung des Aktivierungsbogens die Öffnung des aktiven Zentrums für ATP und Proteinsubstrate ermöglicht (Lawler, Fleming et al. 1998). Dies führt nach Integration der Signale über die beiden MKKs zu einer schalterähnlichen Aktivierung der Kinasen. Aus dieser Beobachtung schlussfolgerte die Forschergruppe Ferrell: „Die JNK-Kaskade könnte als ein Signalverstärker fungieren, der die fein abgestuften eingehenden Reize in Schalter-ähnliche Signale konvertiert und somit der Signalkaskade erlaubt die Hintergrundsignale herauszufiltern und dennoch gezielt auf Stimuli oberhalb der Reizschwelle zu reagieren“ (Bagowski, Besser et al. 2003).

Zu den apikalen MAPKKKs gehören eine Vielzahl von Kinasen, beispielsweise ASK1/2, MEKK1/2/3/4 sowie MLK1/2/3, die den JNK-Signalweg durch Phosphorylierung von MKK4 und MKK7 zell- und stimuluspezifisch initiieren (Dhanasekaran and Reddy 2008). Durch Dephosphorylierung wird die JNK-Aktivität von den verschiedenen MAPK-Phosphatasen (MKP)1/2/5/7 und hVH5/DUSP8 terminiert und so eine Balance zur aktivierenden Phosphorylierung erzeugt (Wu 2007). Eine weitere Ebene der Regulation entsteht durch Gerüstproteine, die alle Komponenten des Signalweges binden und somit eine räumliche Anordnung des Moduls in einem großen Proteinkomplex herbeiführen. Bis jetzt wurden zwölf Gerüstproteine im JNK-Signalweg identifiziert, darunter *JNK Interacting Protein* (JIP)1/2/3/4, POSH, Filamin und MEKK1 (Johnson and Nakamura 2007). Letztere fungiert sowohl als MAPKKK als auch als Strukturgeber für die einzelnen Komponenten der JNK-Signalkaskade und verbindet dadurch die beiden Funktionen. Die JIPs weisen ein sehr distinktes Expressionsmuster auf (Gehirn, Hoden) und in Studien mit *Knockout*-Mäusen konnte aufgrund von Entwicklungsstörungen auf spezifische Funktionen der JIPs in der JNK-Signaltransduktion geschlossen werden (Engstrom, Ward et al. 2010).

Des Weiteren erhöhen Erkennungsmotive zwischen verschiedenen Signalkomponenten die Effizienz und Spezifität der Kaskade (Cargnello and Roux 2011). So weisen MAPKKs, MKPs, einige MAPK-Substrate und Gerüstproteine sogenannte *Docking Domains* (D-Domänen) auf (Tanoue and Nishida 2003). Die D-Domäne besteht aus einer basischen Region, der ein hydrophober Bereich folgt. Sie wird mit hoher Spezifität und Effizienz von der MAPK über die C-terminale *Common Docking Domain* (CD-Domäne) erkannt. Diese liegt außerhalb der katalytischen Region, besteht aus einer Sequenz saurer und hydrophober Aminosäuren und wechselwirkt über elektrostatische und hydrophobe Bindungen mit der D-Domäne (Tanoue, Adachi et al. 2000).



**Abb. 8 Der JNK-Signalweg** (verändert nach Wagner and Nebrada 2009)

Das MAPK-Modul wird durch Umgebungsstress (Hitze, osmotischer Stress, Chemotherapeutika,  $\gamma$ - und UV-Strahlung) sowie durch Wachstumsfaktoren oder Zytokine ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-1) aktiviert. Über eine Phosphorylierungskaskade aktivieren zahlreiche MAPKKKs die MAPKKs MKK4 und MKK7 und diese schließlich die MAPK JNK. Während JNK1 und JNK2 ubiquitär exprimiert werden, ist die Expression von JNK3 auf wenige Organe beschränkt (Gehirn, Herz, Hoden). Die aktiven JNK-Proteine phosphorylieren zahlreiche Substrate wie Transkriptionsfaktoren, Bcl-2 Familienproteine, Kinasen, Gerüstproteine sowie Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems und modulieren damit ihre Aktivität positiv oder negativ. Hierdurch nimmt JNK Einfluss auf zahlreiche biologische Antworten wie Proliferation, Differenzierung, Zellmigration, Embryonalentwicklung und Apoptose.

### **1.2.3 Physiologische Funktionen der c-Jun N-terminalen Kinasen**

Die JNKs besitzen in einer Vielzahl von Prozessen und zellulären Antworten eine regulatorische Funktion. So wurde ihr Einfluss auf Überleben, Apoptose, Proliferation, Differenzierung, Zellmigration, Zellzyklusarrest, T-Zelldifferenzierung und embryonale Organogenese festgestellt (Davis 2000; Nishina, Wada et al. 2004). Daher ist es nicht verwunderlich, dass eine Dysfunktion der c-Jun N-terminalen Kinasen auch mit Krankheiten in Zusammenhang gebracht wird wie etwa Diabetes mellitus, Myokardinfarkt, Rheumatoider Arthritis, Arteriosklerose, Krebs und neurodegenerativen Erkrankungen (Karin and Gallagher 2005; Bogoyevitch 2006). Somit ist die JNK-Familie in den Fokus von Forschung und Medikamentenentwicklung gerückt, da man sich von der Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Signalmechanismen die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten erhofft.

Die Regulation dieser verschiedenen biologischen Prozesse wird möglich, indem die JNK-Proteine ihre zahlreichen – mehr als 50 bekannten – Substrate durch Phosphorylierung in ihrer Aktivität positiv oder negativ beeinflussen (Bogoyevitch and Kobe 2006). Der Transkriptionsfaktor c-Jun stellt das prominenteste Ziel der c-Jun N-terminalen Kinasen dar und ist Teil des AP-1 Komplexes, der aus zahlreichen dimerisierenden Proteinen der Jun-, ATF-, Fos-, CREB- und Maf-Gruppe besteht (Adler, Polotskaya et al. 1992; Hibi, Lin et al. 1993). JNK fördert die transkriptionelle Aktivität von c-Jun durch Phosphorylierung der Serinreste 63 und 73 und damit die Expression von Genen, die mit Zellzyklus und Proliferation assoziiert sind (Pulverer, Kyriakis et al. 1991). Zur Modulation der Genexpression finden sich neben Mitgliedern des AP-1-Komplexes (c-Jun, JunD, ATF2) noch eine Vielzahl weiterer Transkriptionsfaktoren unter den JNK-Substraten, beispielsweise p53, FoxO-Familienmitglieder, c-Myc, NFAT- und STAT-Proteine sowie der Glucocorticoidrezeptor (Bogoyevitch and Kobe 2006). Über die veränderte Induktion zahlreicher Zielgene ist somit eine Regulation von Proliferation, Zellzyklus, Differenzierung und auch Apoptose möglich (Wagner and Nebreda 2009). Daneben wurden auch weitere Substrate identifiziert, die nicht transkriptionell aktiv sind, wie viele Apoptose-regulierende Bcl-2 Familienproteine sowie Komponenten der Zellmigration und weitere Kinasen (Davis 2000; Sun, Yang et al. 2007). Aktive JNK-Proteine regulieren das komplexe Netzwerk der Motilität, indem sie fokale Adhäsionsproteine oder solche Proteine phosphorylieren, die mit Intermediärfilamenten und Mikrotubuli assoziiert sind (Bogoyevitch and Kobe 2006). Auch auf die

Proteindegradation kann JNK Einfluss nehmen, indem Zielproteine durch Phosphorylierung für die Ubiquitylierung und die anschließende proteasomale Degradation markiert werden (Weidenfeld-Baranboim, Koren et al. 2011). Alternativ wird die Aktivität der E3-Ubiquitin-Ligase Itch durch Phosphorylierung erhöht und somit über die Eliminierung von Proteinen Einfluss auf bestimmte Signalwege genommen (Chang, Kamata et al. 2006). Schließlich ist auch ein Kinase-unabhängiger Einfluss von JNK auf die Proteinstabilität einiger Transkriptionsfaktoren (c-Jun, ATF2, p53, c-Myc) beschrieben, indem die inaktiven Kinasen durch Bindung die Degradation dieser Proteine fördern (Fuchs, Xie et al. 1997).

#### **1.2.4 Regulation von Apoptose durch die c-Jun N-terminalen Kinasen**

Während eine transiente JNK-Aktivierung mit überlebensfördernden Signalen in Verbindung gebracht wird, führt eine anhaltende und starke Aktivierung von JNK Zellen in die Apoptose (Chen, Wang et al. 1996; Ventura, Hubner et al. 2006). So ist die Zelltod-fördernde Rolle von JNK im extrinsischen Apoptose-Signalweg nach TNF $\alpha$ - und CD95-Rezeptorstimulation sowie im intrinsischen Signalweg nach DNA-Schäden durch UV- und  $\gamma$ -Strahlung, nach Entzug von Wachstumsfaktoren und nach Einsatz zahlreicher Chemotherapeutika wie proteasomaler Inhibitoren, Taxol oder Cisplatin beschrieben (Wang, Wang et al. 2000; Brozovic and Osmak 2007; Dhanasekaran and Reddy 2008; Nakata, Hayakawa et al. 2011). Hierbei wurde ihre Rolle durch die Resistenz der JNK1<sup>-/-</sup>/JNK2<sup>-/-</sup> Fibroblasten gegenüber einer Vielzahl dieser Stimuli bestätigt (Tournier, Hess et al. 2000; Dhanasekaran and Reddy 2008).

JNK-Proteine steuern die Apoptoseinduktion durch eine veränderte Genexpression, beispielsweise durch die AP-1-abhängige Hochregulierung von FasL, TNF $\alpha$  oder Bim (Shaulian and Karin 2002). Daneben sind auch die Induktion weiterer pro-apoptotischer Proteine (Noxa, Puma) oder die verminderte Expression anti-apoptotischer Proteine nach JNK-abhängiger Regulation von beispielsweise p53, c-Myc, FoxO oder HIF1 $\alpha$  beschrieben (Dhanasekaran and Reddy 2008). Eine transkriptionsunabhängige Regulation der Apoptose erfolgt durch die Phosphorylierung der Bcl-2 Familienproteinen Bad, Bim, Bax, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-2 und Mcl-1, wodurch JNK ihre pro- oder anti-apoptotische Funktion und damit den Zelltod Stimulus- und Zelltyp-spezifisch beeinflussen kann (Bogoyevitch and Kobe 2006).

Einblicke in die apoptotische Funktion der einzelnen JNK-Formen konnten auch mit Hilfe von *Knockout*-Studien erzielt werden. Mäuse mit einer Deletion von JNK1 bzw. JNK2 sind vital und zeigen nur wenige phänotypische Veränderungen, so dass auf eine funktionale Redundanz beider Proteine geschlossen werden kann. So weisen JNK1-defiziente Mäuse eine verzögerte Epithelentwicklung der Epidermis, der Lunge und des Darms auf, wohingegen JNK2-defiziente Mäuse eine Hyperplasie der Keratinozyten ausprägen (Weston, Wong et al. 2004). Des Weiteren besteht in den *Knockout*-Mäusen ein Defekt in der Entwicklung von T-Lymphozyten, der zu einem Ungleichgewicht zwischen T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen führt (Dong, Yang et al. 1998; Yang, Conze et al. 1998). In JNK3-defizienten Mäusen können keine Entwicklungsdefekte festgestellt werden, jedoch eine Resistenz gegenüber exzitotoxischem neuronalen Tod (Yang, Kuan et al. 1997). In den Doppel-*Knockout*-Studien werden vitale JNK1<sup>-/-</sup>JNK3<sup>-/-</sup> und JNK2<sup>-/-</sup>JNK3<sup>-/-</sup> Mäuse geboren, während sich die gemeinsame Deletion von JNK1 und JNK2 als letal herausstellt (Kuan, Yang et al. 1999). Hierbei sterben die Mäuse während der Embryonalentwicklungsstufe E10.5 und weisen eine defekte Schließung des Neuralrohrs sowie massive Missbildungen des Gehirns auf (Sabapathy, Jochum et al. 1999). Diese entstehen durch eine erhöhte Apoptoseinduktion im Vorderhirn sowie eine verringerte Apoptoserate an den lateralen Kanten des Hinterhirns und führen dadurch in den Mäuseembryos zu einer Exenzephalie. Somit ergänzt der Phänotyp die in Zelllinien erzielten Ergebnisse, die für JNK1 und JNK2 eine wichtige Funktion in der Apoptose-Regulation aufzeigen (Dhanasekaran and Reddy 2008).

### **1.2.5 Die Rolle der c-Jun N-terminalen Kinasen in der Onkogenese**

JNK-Proteine sind durch ihre Modulation von Proliferation, Differenzierung, Migration und Überleben eng mit der Tumorgenese verknüpft und werden mit Krebs in Zusammenhang gebracht (Manning and Davis 2003). So überrascht es nicht, dass in der Tat eine Dysregulation des JNK-Signalweges in humanen Tumoren festgestellt wurde und in Mausmodellen mit gezielter Gendelektion bestätigt werden konnte (Wagner and Nebreda 2009). Zahlreiche Tumorzelllinien zeichnen sich durch eine konstitutive Aktivierung der JNKs aus, die zudem Isoform-spezifisch auftritt. Beispielsweise wurde eine erhöhte Aktivität von JNK1 im hepatozellulären Karzinom und in Prostatakrebs beobachtet (Vivanco, Palaskas et al. 2007; Hui, Zatloukal et al. 2008). Außerdem sind das bedeutende JNK-Substrat c-Jun und der unter anderem durch JNK regulierte AP-1

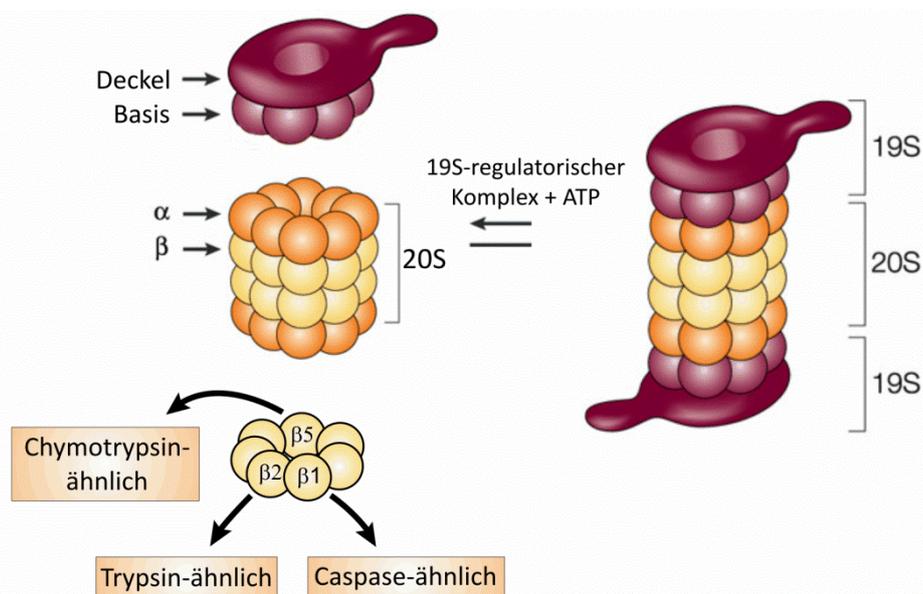
Komplex aufgrund ihrer positiven Regulation der Zellproliferation ein wichtiger Bestandteil der Onkogenese, da sie sowohl die onkogene Transformation als auch die Tumorprogression und Metastasierung fördern (Angel, Szabowski et al. 2001; Bode and Dong 2007). Im Gegensatz zu dieser Hyperaktivierung von JNK konnte in der Hälfte von 19 getesteten Gehirntumoren eine inaktivierende Mutation der vor allem proapoptotisch wirkenden Kinase JNK3 festgestellt werden (Yoshida, Fukino et al. 2001). Des Weiteren wurde eine reduzierte JNK-Aktivität, etwa durch die erhöhte Expression der JNK-Phosphatasen MKP1 und 2 in Lungen- und Brustkarzinomzellen beobachtet (Wang, Cheng et al. 2003; Vicent, Garayoa et al. 2004; Wu 2007). Darüber hinaus weisen insgesamt etwa 5% der Tumoren verschiedener Gewebe einen Funktionsverlust der JNK-Kinase MKK4 auf, welcher mit einem aggressiven Wachstum sowie Metastasierung einhergeht und eine tumorsupprimierende Rolle der MKK4 nahelegt (Whitmarsh and Davis 2007). Somit scheint in einigen Tumoren eine erhöhte Aktivierung der JNK-Proteine stattzufinden, während dieser Signalweg wiederum in anderen Krebsarten ausgeschaltet wird. Auf diese widersprüchliche Rolle der JNK-Aktivität sowie der Isoformen JNK1 und JNK2 in der Tumorbildung weisen ebenfalls Deletionsstudien in Mäusen hin. So erhöht die Defizienz von JNK1, jedoch nicht von JNK2, in DMBA/PMA-induzierten Modellen die Sensitivität gegenüber der Bildung von Hauttumoren (Chen, Nomura et al. 2001; She, Chen et al. 2002). Im Gegensatz hierzu besitzen JNK1-defiziente, jedoch nicht JNK2-defiziente Mäuse, in Diethylnitrosamin (DEN)-Modellen eine geringere Anfälligkeit für die Entwicklung von Leberkrebs im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Sakurai, Maeda et al. 2006; Hui, Zatloukal et al. 2008). Diese Daten zeigen, dass die JNK-Isoformen gewebespezifisch eine Tumor-fördernde oder -supprimierende Rolle besitzen und dabei auch entgegengesetzte Funktionen einnehmen können. Interessanterweise fiel in den Studien zu Lungenkrebsmodellen nicht nur auf, dass Mäuse mit JNK1- oder JNK2-Defizienz eine erhöhte Anzahl von Tumoren ausbildeten, sondern auch, dass diese eine verringerte Größe besaßen (Heasley and Han 2006). Daraus kann geschlossen werden, dass die JNK-Isoformen in diesem Modell die onkogene Transformation supprimieren, jedoch anschließend die proliferative Funktion der Kinasen für das Tumorstadium benötigt wird. Folglich können die JNK-Isoformen gewebeabhängig sowohl in der Tumor-Initiation als auch -Progression eine wichtige Funktion besitzen (Manning and Davis 2003). Andererseits ist bekannt, dass JNKs auch eine entscheidende Rolle bei der Induktion von Apoptose in der Behandlung von Krebs

mit Chemotherapeutika spielen. Die offensichtlich gegensätzlichen Funktionen der JNK-Isoformen in Tumoren müssen besser definiert werden, bevor die Entwicklung von neuen Krebstherapien mit zentralem Augenmerk auf JNK beginnen kann.

### 1.3 Das Ubiquitin-Proteasom-System

#### 1.3.1 Die Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems

Das Proteasom ist ein 2,5 MDa großer Multiproteinkomplex, der beschädigte oder für die Degradation mit Ubiquitin gekennzeichnete Proteine in einem kontrollierten Prozess zu kurzen Peptiden abbaut (Cheng 2009). In Abhängigkeit vom Zell- und Gewebetyp ist das proteolytische System sowohl im Zytosol als auch im Nukleus aktiv (Brooks, Fuentes et al. 2000). Insgesamt unterliegen 80% der intrazellulären Proteine und damit eine Vielzahl von Signalwegen und biologischen Prozessen der Regulation durch das Proteasom, beispielsweise Transkription, Zellzyklus, Differenzierung und Apoptose (Goldberg 2005). Zudem ist das Proteasom an der Qualitätskontrolle von Proteinen beteiligt (Xie 2010). Die Proteine werden im Allgemeinen durch Anhängen einer Ubiquitinkette, durch in ihrer Sequenz enthaltene Signale (PEST-Sequenz) oder durch Missfaltungen für den proteasomalen Abbau markiert (Rechsteiner and Rogers 1996; Goldberg 2003).



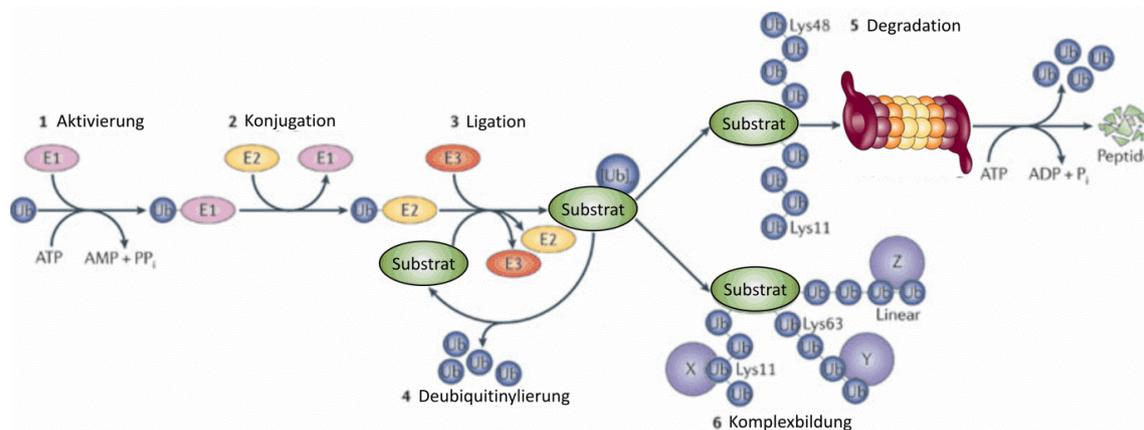
**Abb. 9 Aufbau des Proteasoms** (verändert übernommen aus Adams 2004)

Das 26S-Proteasom ist ein Multiproteinkomplex, der aus einem zylindrischen 20S-Mittelstück und zwei regulatorischen 19S-Einheiten besteht. Das Mittelstück ist aus vier heptameren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ringern aufgebaut und weist in seinem Inneren proteolytisch aktive Zentren zur Degradation von Proteinen in kurze Peptide auf. Hierfür besitzen einige der  $\beta$ -Einheiten Chymotrypsin-, Trypsin- und Caspase-ähnliche proteolytische Aktivität. Der regulatorische 19S-Komplex teilt sich in Basis und Deckel ein. Während die Basis ATPasen beherbergt und somit sowohl Energie für die Assemblierung des Proteasoms als auch für die Entfaltung der Polypeptide bereitstellt, dient der Deckel der spezifischen Erkennung von Substraten.

Das 26S-Proteasom besteht aus einem fassförmigen 20S-Mittelstück, das aus vier heptameren Ringen aufgebaut ist ( $\alpha\beta\beta\alpha$ ), sowie zwei regulatorischen 19S-Einheiten (Abb. 9) (Cheng 2009). Im Innenraum der 20S-Einheit befinden sich an den beiden inneren  $\beta$ -Ringen proteolytische Komponenten ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_5$ ), die Trypsin-ähnliche (bevorzugte Spaltung nach Arginin oder Lysin), Chymotrypsin-ähnliche (bevorzugte Spaltung nach Tyrosin oder Phenylalanin) und Caspase-ähnliche (bevorzugte Spaltung nach Aspartat oder Glutamat) Aktivität besitzen (DeMartino and Slaughter 1999). Das zylindrische Mittelstück wird an beiden Enden von der 19S-regulatorischen Einheit flankiert, die aus 20 Proteinen aufgebaut ist und in eine Basis und einen Deckel eingeteilt werden kann (Glickman, Rubin et al. 1998). Der Deckel ist für die spezifische Erkennung der ubiquitinylierten Substrate notwendig. Sechs Komponenten der Basis sind ATPasen und stellen die nötige Energie für die Assemblierung des Proteasoms sowie das Entfalten des Substrats in ein lineares Polypeptid durch eine Chaperonaktivität bereit (Benaroudj, Zwickl et al. 2003). Nach Entfernung der Ubiquitinkette kann die entfaltete Polypeptidkette daraufhin zur Degradation in das Lumen des Proteasoms eingeführt werden. Es existieren auch alternative Proteasomen, bei denen die 19S-Einheit durch die weniger gut charakterisierte 11S- oder PA200-Einheit ersetzt wird bzw. alternative  $\beta$ -Einheiten speziell Peptide für die *Major Histocompatibility Complex* (MHC) I-Präsentation bereitstellen (Immunoproteasom) (Rock and Goldberg 1999; Jariel-Encontre, Bossis et al. 2008).

Für die Ubiquitinylierungsreaktion werden Proteine beispielsweise durch Beschädigung oder gezielt durch Phosphorylierung oder andere posttranslationale Modifikationen markiert (Gao and Karin 2005). Die Ubiquitinylierung erfolgt in einem dreistufigen enzymatischen Prozess (Abb. 10). Das 76 Aminosäuren große Ubiquitin wird zunächst ATP-abhängig von dem Ubiquitin-aktivierenden Enzym, auch E1 genannt, kovalent gebunden und anschließend auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) übertragen (Glickman and Ciechanover 2002). Einige E2-Enzyme transferieren das acht kDa große Ubiquitin selbstständig auf ein Substrat. In der Regel wird Ubiquitin jedoch zunächst auf das Ubiquitin-ligierende Enzym (E3) und von diesem spezifisch auf das Substrat übertragen (Bedford, Lowe et al. 2011). Alternativ unterstützt das E3-Enzym nur die Substraterkennung und leitet den Transfer des Ubiquitins vom E2-Enzym auf das Substrat. Hierbei wird eine kovalente Bindung zwischen dem C-Terminus des Ubiquitins und einem Lysin des Substrats hergestellt. Verknüpfungen zwischen dem Lysin des

Ubiquitins und dem C-Terminus eines weiteren Ubiquitins zur Entstehung längerer Ketten werden ebenfalls von diesen drei Enzymen vermittelt (Deshaies and Joazeiro 2009). Es handelt sich somit um einen regulierten und hochspezifischen Prozess. Dies wird auch anhand der Vielfalt der beteiligten Enzyme deutlich. Während in Mammalia nur zwei E1-Enzyme (*Ubiquitin-like Modifier Activating Enzyme*, UBA1 und UBA6) existieren, wurden mehr als 30 verschiedene E2-Enzyme und über 700 Substrat-bindende E3-Enzyme identifiziert (Jariel-Encontre, Bossis et al. 2008; Deshaies and Joazeiro 2009). Interessanterweise bestimmt die Kettenlänge und die Verknüpfungsart der Ubiquitine untereinander die biologische Antwort. So bieten sich von 76 Aminosäuren des Ubiquitins sieben interne Lysine sowie der N-Terminus für Verknüpfungen an. Ubiquitinketten, die über Lysin 48 (die häufigste Verknüpfungsform) oder Lysin 11 verbunden sind, wirken als Zeichen für proteasomale Degradation (Ikeda and Dikic 2008; Vucic, Dixit et al. 2011). Im Gegensatz hierzu können Verknüpfungen über Lysin 63, den N-Terminus und in einigen Fällen auch Lysin 11, ähnlich wie andere posttranslationale Modifikationen, regulierend wirken und beispielsweise Proteintransport, Signalwege, DNA-Reparatur und Enzymaktivierung steuern (Haglund and Dikic 2005). Eine Entfernung der Ubiquitine von den Substraten wird von den deubiquitylierenden Enzymen (DUBs) gesteuert (Komander, Clague et al. 2009).

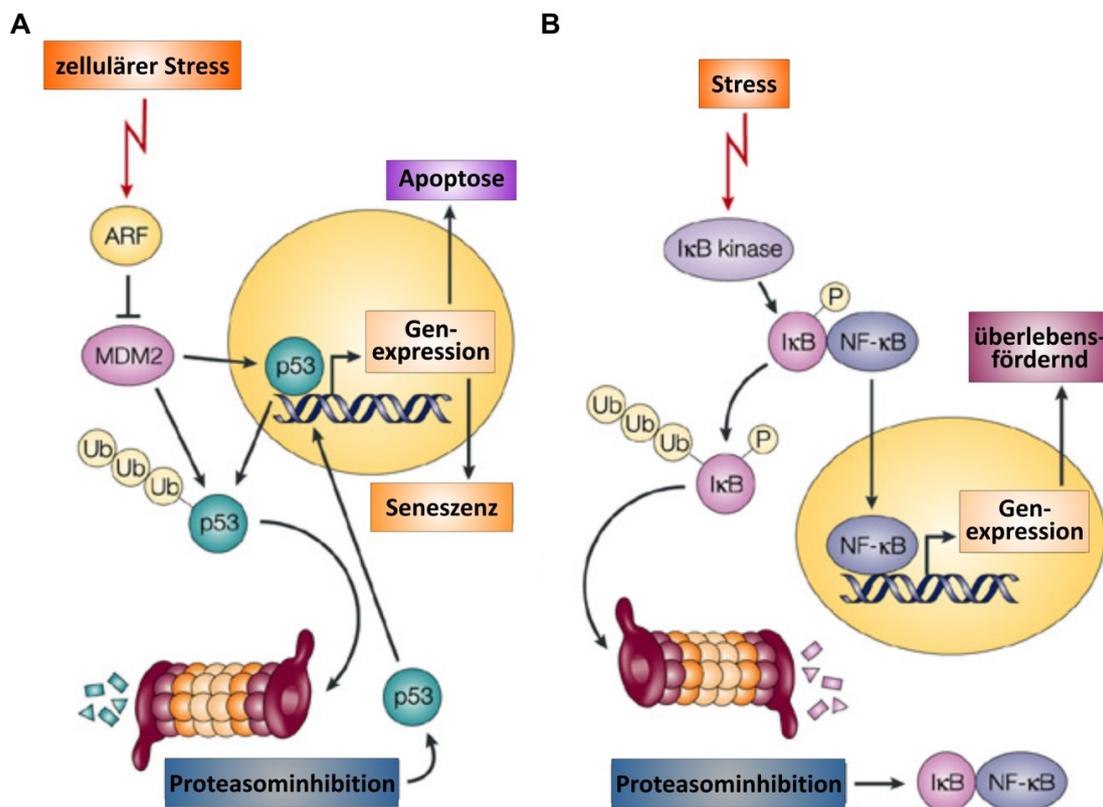


**Abb. 10 Die Reaktionen der Ubiquitylierung und proteasomalen Degradation** (entnommen aus Vucic, Dixit et al. 2011)

In einer ersten Reaktion wird Ubiquitin ATP-abhängig an ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) gebunden (Schritt 1) und anschließend auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) übertragen (Schritt 2). Das Ubiquitin-ligierende Enzym (E3) vermittelt die Substratspezifität und katalysiert die kovalente Bindung des Ubiquitins an das Substrat alleine oder zusammen mit E2 (Schritt 3). Zur Entstehung längerer Ketten von miteinander verknüpfter Ubiquitine kann dieser Prozess wiederholt werden. Als Gegenspieler wirken die deubiquitylierenden Enzyme (DUBs), welche die angehängten Ubiquitine wieder vom Substrat entfernen (Schritt 4). Ubiquitinketten, in denen die Ubiquitine über die Lysine 11 oder 48 miteinander verknüpft sind, wirken als Signal für die proteasomale Degradation der Substrate. Die Ubiquitine werden zunächst entfernt, bevor das Proteine schließlich in kurze Peptide geschnitten wird (Schritt 5). Dahingegen regulieren Ubiquitinketten, in denen die Ubiquitine linear oder über Lysin 63 (und in einigen Fällen auch über Lysin 11) verknüpft sind, Enzymaktivierung, Proteintransport und die Bildung von Signalkomplexen (Schritt 6).

### 1.3.2 Funktion des Proteasoms in der Regulation von Signalwegen

Das Proteasom dient nicht nur der Beseitigung von überflüssigen oder beschädigten Proteinen, sondern kann auch die Aktivität vieler Signalwege durch Degradation regulatorischer Proteine positiv oder negativ regulieren (Brancolini 2008). Eine entscheidende Funktion besitzt das Proteasom beispielsweise in der Regulation des Zellzyklus (King, Deshaies et al. 1996). Das Fortschreiten der Zellzyklusphasen von G1- über die Synthese- zur G2-/Mitose-Phase wird beim Durchlaufen von Kontrollpunkten entscheidend von der transienten Aktivität der *Cyclin-dependent Kinases* (CDKs) gesteuert, die nur im Komplex mit Cyclinen aktiv sind. Die Cycline werden gezielt zu bestimmten Zeitpunkten des Zellzyklus exprimiert und erlauben auf diese Weise den Eintritt in die nächste Zellzyklusphase. Anschließend wird die Aktivität der CDKs gezielt durch den proteasomalen Abbau der Cycline beendet (Murray 2004).



**Abb. 11 Proteasom-regulierte Signalwege** (entnommen aus Adams 2004)

(A) Unter basalen Bedingungen wird der Transkriptionsfaktor p53 permanent von der E3-Ligase MDM2 aus dem Nukleus sequestriert und durch Ubiquitinylierung für den proteasomalen Abbau markiert. Bei zellulärem Stress wie DNA-Schäden oder Onkogenaktivierung wird dieser Abbau verhindert, da ARF MDM2 hemmt. p53 wird aktiviert und kann durch Modulation der entsprechenden Genexpression DNA-Reparatur, Apoptose oder Seneszenz einleiten. Die Aktivierung von p53 erfolgt auch bei proteasomaler Inhibition. (B) Bei Zytokin-vermitteltem Stress wird die IκB-Kinase aktiviert, die den Inhibitor von NF-κB, IκBα, phosphoryliert und dadurch dem Ubiquitin-Proteasom-System zuführt. Der Transkriptionsfaktor NF-κB wird nun nicht mehr im Zytosol gehalten, sondern kann in den Kern translozieren und dort die Expression von überlebensfördernden und anti-apoptotischen Genen induzieren. Die Inhibition des Proteasoms verhindert die Aktivierung von NF-κB und sensitiviert die Zellen somit für pro-apoptotische Stimuli.

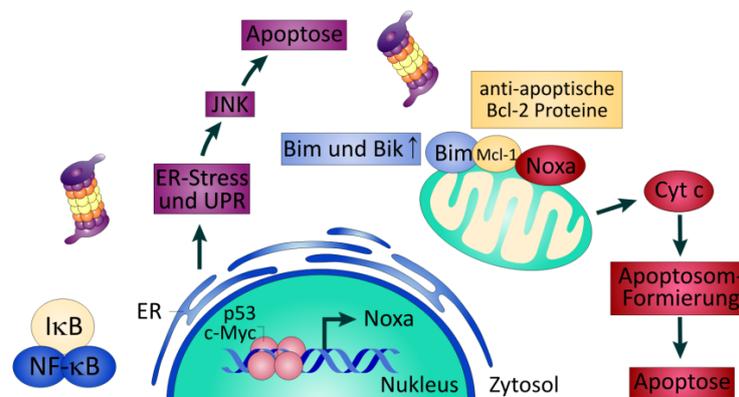
Ein weiteres prominentes Ziel des Proteasoms ist der Transkriptionsfaktor p53, der unter Normalbedingungen in Zellen eine kurze Halbwertszeit besitzt, da er von der Ubiquitin-Ligase *Mouse Double Minute 2* (MDM2) aus dem Nukleus ins Zytosol sequestriert und durch Ubiquitinylierung für die proteasomale Degradation markiert wird (Abb. 11A) (Momand, Wu et al. 2000). Unter Stressbedingungen wird p53 an zahlreichen Stellen phosphoryliert und weiteren posttranslationalen Modifikationen unterzogen, wodurch die Bindung an MDM2 nicht mehr möglich ist und eine Stabilisierung des Proteins stattfindet (Lavin and Gueven 2006). Während das Proteasom folglich p53 negativ reguliert, ist es entscheidend in die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Weges involviert (Abb. 11B). So wird der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B durch seinen Gegenspieler *Inhibitor of NF- $\kappa$ B* (I $\kappa$ B) durch Maskierung des nukleären Lokalisationssignals inaktiv im Zytosol gehalten (Karin and Ben-Neriah 2000). Durch Zytokine und andere Signale wird I $\kappa$ B phosphoryliert und über das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert (Li, Dai et al. 1995). Daraufhin kann der nun freie Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B in den Nukleus translozieren und dort die Expression überlebensfördernder Gene aktivieren. Zellzyklus, p53 und NF- $\kappa$ B stellen nur einige Beispiele für die Vielzahl von Signalwegen dar, die unter der Kontrolle des Proteasoms stehen.

### **1.3.3 Die Rolle des Proteasoms in der Apoptoseregulation**

Über die Degradation einer großen Anzahl von Proteinen steuert das Proteasom diverse Signalwege und zelluläre Funktionen positiv oder negativ. Interessanterweise wurde 1999 festgestellt, dass die Inhibition dieses Multiproteinkomplexes eine gezielte Apoptose von Krebs-, jedoch nicht von gesunden Gewebezellen auslöst und somit den Einsatz in der Chemotherapie ermöglicht (Adams, Palombella et al. 1999). Als erster Proteasominhibitor wurde das Peptidboronat Bortezomib (Velcade™, PS-341) bereits 2003 innerhalb kürzester Zeit für die Behandlung des Multiplen Myeloms zugelassen.

Dabei stellt sich die Frage, wie die Inhibition des ubiquitär agierenden Proteasoms ein derartig spezifisches zytotoxisches Muster auslösen kann. Es scheint ein Zusammenspiel von mehreren Signalwegen für die Apoptoseinduktion unter diesen Bedingungen notwendig zu sein (Abb. 12). Eine wichtige Komponente ist die Inhibition der überlebensfördernden NF- $\kappa$ B-Aktivierung, indem der NF- $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ B stabilisiert und dadurch eine Translokation von NF- $\kappa$ B in den Kern verhindert wird (Jeremias,

Kupatt et al. 1998). Somit wird vor allem in Zellen des Multiplen Myeloms, die im Knochenmark in einem überlebensfördernden Mikromilieu lokalisiert sind, die Ausschüttung von wachstumsfördernden Zytokinen und die Expression von Adhäsionsmolekülen verhindert (Read, Neish et al. 1995). Gleichzeitig wird die Expression anti-apoptotischer Proteine eingeschränkt. Dies hemmt überlebensfördernde Signale, Angiogenese sowie Proliferation und fördert stattdessen Apoptose (Chauhan, Hideshima et al. 2005). Des Weiteren wird vermutet, dass die erhöhte Sensitivität der Krebszellen gegenüber proteasomaler Inhibition auf ihre erhöhte Teilungsrate und auf die gestörten Kontrollpunkte des Zellzyklus zurückzuführen ist (Galluzzi, Maiuri et al. 2007). Während in gesunden Zellen der streng regulierte Zellzyklus bei proteasomaler Inhibition nur kurzzeitig gestoppt wird, werden hierdurch in Krebszellen massive Störungen der Zellteilung und schließlich Apoptose ausgelöst (Ghobrial, Witzig et al. 2005). Die Expression zahlreicher Proteine wird während der Onkogenese unterdrückt, jedoch werden diese durch proteasomale Inhibition stabilisiert und reaktiviert, darunter auch Zellzyklus-kontrollierende Proteine wie die CDK-Inhibitoren p21 und p27 sowie der Transkriptionsfaktor p53 (Wu, Cho et al. 2009).



**Abb. 12 Apoptoseinduktion nach proteasomaler Inhibition** (verändert übernommen aus Ping Duo 2011)

Proteasomale Inhibition löst über das Zusammenspiel mehrerer Signalwege Apoptose aus. Einerseits wird durch Stabilisierung von IκBα die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB verhindert, welcher Zellteilung, Wachstum und Angiogenese fördert. Zudem entstehen durch die proteasomale Inhibition Ansammlungen von unkorrekt gefalteten Proteinen, welche zu ER-Stress führen. Dieser löst die *Unfolded Protein Response* (UPR) aus, welche bei dauerhaftem ER-Stress schließlich zu Apoptose führt. Essenziell bei der Apoptoseinduktion nach ER-Stress und proteasomaler Inhibition ist der JNK-Signalweg, welcher den mitochondrialen Apoptose-Signalweg fördert. Dieser wird auch durch die massive Hochregulierung von pro-apoptischen *BH3-only* Proteinen (Bim, Noxa, Bik) ausgelöst, die durch proteasomale Inhibition entweder stabilisiert oder durch Induktion von Transkription gezielt exprimiert werden. So ist eine massive Genexpression von Noxa nach proteasomaler Inhibition zu beobachten, wobei die genauen Kontrollmechanismen noch völlig ungeklärt sind. Eventuell sind hierbei die Transkriptionsfaktoren p53, HIF1α oder c-Myc beteiligt, welche durch die proteasomale Inhibition ebenfalls stabilisiert werden. An den Mitochondrien akkumuliert das anti-apoptische Bcl-2 Familienprotein Mcl-1, welches jedoch durch die starke Akkumulation der *BH3-only* Proteine und insbesondere durch Noxa neutralisiert wird. Dies ermöglicht die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und die damit verbundene Freisetzung von Cytochrom c zur Auslösung des apoptotischen Zelltods.

Zudem wird in diesen Zusammenhang vermutet, dass Krebszellen durch unkontrollierte Proliferation vermehrt DNA-Mutationen und damit verstärkt beschädigte Proteine akkumulieren. Dem Proteasom kommt hierdurch eine bedeutendere Rolle zur Beseitigung dieser defekten Proteine zu, welche bei seiner Inhibition stark akkumulieren und zu einer zellulären Dysfunktion sowie Apoptose führen können (Adams 2004). Durch proteasomale Inhibition wird auch die Funktion des ER gestört, welches neben seiner Rolle in der Glukoneogenese und der Kalziumspeicherung auch die korrekte Faltung der zu sekretierenden Proteine überwacht (Hetz 2012). Bei Akkumulation von falsch gefalteten Proteinen im ER wird die sogenannte *Unfolded Protein Response* (UPR) als Reaktion auf diesen ER-Stress aktiviert (Schroder and Kaufman 2005). Die UPR umfasst mehrere Signalwege, die unter anderem eine weitere Proteinakkumulation beispielsweise durch einen Translationsstopp verhindern und die Beseitigung der Proteine über Autophagie, jedoch bevorzugt über das Proteasom, einleiten. Bei dauerhaftem ER-Stress, wie er bei proteasomaler Inhibition stattfindet, wird die Beseitigung der beschädigten Zelle durch Apoptose eingeleitet (Tabas and Ron 2011). Zellen mit einem hochaktiven sekretorischen Weg sind besonders anfällig für ER-Stress, so auch die Zellen des Multiplen Myeloms, die durch massive Antikörperausschüttung gekennzeichnet sind (Obeng, Carlson et al. 2006).

Die Einleitung der Apoptose unter diesen Bedingungen ist nicht vollständig verstanden. Es erfolgt einerseits die Ausschüttung von Kalzium-Ionen aus dem ER, welche die Mitochondrien für den intrinsischen Signalweg sensitivieren (Orrenius, Zhivotovsky et al. 2003). Daneben wird auch die Aktivierung der Caspase-2 und -4 sowie der murinen Caspase-12 diskutiert (Nakagawa, Zhu et al. 2000; Hitomi, Katayama et al. 2004; Upton, Austgen et al. 2008). Ein wichtiges pro-apoptotisches Signal sowohl nach proteasomaler Inhibition als auch generell bei chronischem ER-Stress ist Initiierung der JNK-Kaskade über die Aktivierung der MAPKKK ASK1 durch einen TRAF2-*Inositol Requiring Enzyme 1a* (IRE1a)-Komplex an der ER-Membran (Urano, Wang et al. 2000; Mitsiades, Mitsiades et al. 2002; Hideshima, Mitsiades et al. 2003). Auch die genauen Details der JNK-vermittelten Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalweges unter diesen Stress-Stimuli sind unvollständig aufgeklärt. JNK ist hierbei jedoch ein entscheidender pro-apoptotischer Faktor, wie auch die verringerte Apoptoseinduktion bei pharmakologischer oder siRNA-vermittelter Inhibition von JNK zeigt (Yang, Ikezoe et al. 2004). Wichtig für die Apoptoseinduktion nach ER-Stress ist auch die erhöhte

Expression der *BH3-only* Proteine Bim, Puma und Noxa durch die Transkriptionsfaktoren Chop, p53 oder ATF4 (Tabas and Ron 2011).

Nach proteasomaler Inhibition ist die Regulierung der Bcl-2 Familienproteine leicht moduliert. So ist beschrieben, dass unter diesen Bedingungen insbesondere das anti-apoptotische Protein Mcl-1 sowie die *BH3-only* Proteine Noxa, Bim und Bik stabilisiert bzw. transkriptionell hochreguliert werden (Fennell, Chacko et al. 2008). Mcl-1 ist ein überwiegend posttranslational reguliertes Protein, das mit einer Halbwertszeit von 30 Minuten der Degradation durch das Proteasom unterliegt (Adams and Cooper 2007). Es wird bei proteasomaler Inhibition in hohem Maße stabilisiert und wirkt der Apoptoseinduktion entgegen (Nencioni, Hua et al. 2005). Als Gegenspieler wirkt hierbei Noxa, das präferenziell mit Mcl-1 und A1 interagiert und nach proteasomaler Inhibition in Krebszellen innerhalb kurzer Zeit massiv transkriptionell hochreguliert wird (Perez-Galan, Roue et al. 2006). Obwohl die hierbei zugrunde liegenden Mechanismen nur unvollständig aufgeklärt sind, kann die Noxa-Expression unter anderem durch p53, c-Myc und HIF1 $\alpha$  induziert werden (Oda, Ohki et al. 2000; Kim, Ahn et al. 2004; Nikiforov, Riblett et al. 2007).

Da Bim durch Transkription, Phosphorylierung und proteasomale Degradation reguliert wird, ist es naheliegend, dass dessen Stabilisierung auch nach proteasomaler Inhibition beobachtet wurde (Tan, Degenhardt et al. 2005). Bim ist von entscheidender Bedeutung für die Aktivierung von Bax und Bak, indem es sämtliche anti-apoptotische Bcl-2 Proteine neutralisiert (Lomonosova and Chinnadurai 2008). Interessanterweise kann es durch Phosphorylierung von JNK aktiviert werden (Lei and Davis 2003). Daneben wurde in einigen Fällen die p53-vermittelte transkriptionelle Hochregulierung von Puma sowie die Stabilisierung von Bik berichtet (Zhu, Zhang et al. 2005; Ding, Ni et al. 2007). Bik kann nicht nur Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> antagonisieren, sondern im Fall von ER-Stress auch bei der Freisetzung von Kalziumionen aus dem ER-Speicher mitwirken (Mathai, Germain et al. 2005). Das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinen verschiebt sich bei Hochregulierung von Noxa, Bim, Puma oder Bik in Richtung Apoptose, so dass nach Aktivierung von Bax und Bak die Freisetzung von Cytochrom c und schließlich die Caspasenkaskade induziert wird (Fennell, Chacko et al. 2008).

### **1.3.4 Proteasomale Inhibitoren in der Krebstherapie**

Als proteasomale Inhibitoren sind verschiedene kleine Moleküle bekannt, die in die Klassen der Peptidaldehyde, Peptidboronate, Lactacystine, Peptidepoxide und Peptidepoxyketone eingruppiert werden können und sich in ihrer Spezifität, Reversibilität, metabolischen Stabilität sowie bezüglich der Inhibition der drei proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms unterscheiden (Kisselev, van der Linden et al. 2012).

Bortezomib wurde 2003 als erster Proteasominhibitor für die Behandlung des Multiplen Myeloms, zunächst in dritter Therapiereihe, zugelassen. Von dieser Behandlung wurde gezeigt, dass sie die Lebenszeit der Patienten bis zum Fortschreiten der Krankheit im Vergleich zu konventionellen Therapien verdoppeln kann (Kumar, Rajkumar et al. 2008). Das Multiple Myelom ist die zweithäufigste hämatologische Krebserkrankung. Charakteristisch ist die neoplastische Expansion von Plasmazellen sowie ein hoher Gehalt an Antikörpern in Blut oder Urin (Hillengass, Moehler et al. 2011). Diese Krebsart gilt als unheilbar, jedoch kann die Lebenszeit der Patienten mit chemotherapeutischer Behandlung deutlich um sieben bis acht Jahre verlängert werden (Anderson 2012).

Bortezomib wird intravenös in mehreren Zyklen verabreicht (Russo, Bronte et al. 2010). Die Substanz verteilt sich schnell und gleichmäßig in allen Organen, ausgenommen ist das Fettgewebe und auch die Blut-Hirn-Schranke wird nicht überwunden (Schwartz and Davidson 2004). Messungen in Blutzellen ergaben eine Inhibition des Proteasoms um etwa 70% (Hamilton, Eder et al. 2005). Bortezomib hemmt alle drei proteolytischen Zentren des Proteasoms, jedoch besonders die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität (Rock, Gramm et al. 1994). Seit der Zulassung von Bortezomib wurden zahlreiche klinische Studien durchgeführt, die den Einsatz des proteasomalen Inhibitors auch in Kombination mit anderen Apoptose-fördernden Chemotherapeutika (Doxorubicin, Dexamethason, Doxetaxel, Carboplatin, Gemcitabine) oder Bestrahlung sowie in weiteren lymphatischen Krebsarten und soliden Tumoren untersucht haben (Russo, Bronte et al. 2010). Mittlerweile ist Bortezomib für die Erstbehandlung des Multiplen Myeloms sowie die Zweitbehandlung des Mantelzelllymphoms zugelassen. Ein entscheidender Fortschritt wurde mit der Kombinationstherapie von Lenalidomide, Bortezomib und Dexamethason erreicht. Hiermit wurde eine Ansprechrates von 100% erzielt, davon in 52% der Fälle mit komplettem oder fast komplettem Ansprechen (Richardson, Weller et al. 2010). Obwohl Bortezomib in Zellkultursystemen und

Tiertumormodellen eine gute Wirkung gegen Brust-, Kolorektum-, Leber-, Nieren-, Lungen-, Eierstock-, Pankreas- und Prostatakrebs erzielte, blieben die Ergebnisse der klinischen Studien weit hinter den Erwartungen zurück (Russo, Bronte et al. 2010). Allerdings konnte in Studien bei einigen Krebsarten (Brust-, Prostata-, Urothel-, Melanom-, kolorektalen und neuroendokrinen Tumoren) kein objektives Ansprechen auf alleinige Bortezomib-Behandlung festgestellt werden. Jedoch wurde in wenigen Fällen eine Stabilisierung des Krankheitsverlaufs oder partielles Ansprechen bei Patienten mit metastasierendem Nierenkrebs, nichtkleinzelligem Lungenkrebs, diversen metastasierenden Sarkomas und kleinzelligem Lungenkrebs beobachtet (Davis, Taber et al. 2004; Kondagunta, Drucker et al. 2004; Maki, Kraft et al. 2005; Lara, Chansky et al. 2006). Verbesserte Ergebnisse konnten jedoch in Kombinationstherapien mit Bortezomib und Carboplatin, etwa bei der Behandlung von Eierstock- oder peritonealen Tumoren erreicht werden (Aghajanian, Dizon et al. 2005). Bevor Bortezomib in Kombinationstherapie für die Behandlung von soliden Tumoren routinemäßig zum Einsatz kommt, müssen zwar noch intensive klinische Studien betrieben werden, jedoch sind die bisher erzielten Ergebnisse durchaus erfolgsversprechend. Die molekularen Grundlagen, die ein Ansprechen des Multiplen Myeloms auf proteasomale Inhibitoren erlauben, jedoch in soliden Tumoren verhindern, müssen entschlüsselt werden, bevor diese molekularen Ziele in kombinatorischer Therapie exakt getroffen werden können (Russo, Bronte et al. 2010).

In den letzten Jahren wurden fünf neue proteasomale Inhibitoren (Carfilzomib, ONX-0912, Marizomib, CEP-18770, MLN-9708) mit verbesserten pharmakologischen Eigenschaften entwickelt und in ersten klinischen Phasen auf ihre chemotherapeutische Wirkung getestet. Die neuen Substanzen erreichen bis zu 100% Proteasominhibition in Blutzellen, überqueren die Blut-Hirn-Schranke, können oral aufgenommen werden, besitzen verlängerte Halbwertszeiten oder verursachen weniger Nebenwirkungen (Kisselev, van der Linden et al. 2012). Der Antrag, Carfilzomib für die Behandlung von refraktärem, vorbehandelten Multiplen Myelom zuzulassen, wird zurzeit in den USA geprüft. Die Ergebnisse der ersten klinischen Studie der Phase I zur Behandlung von soliden Tumoren mit den proteasomalen Inhibitoren der zweiten Generation stehen noch aus.

### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Das Proteasom ist ein Multiproteinkomplex, der gezielt beschädigte oder markierte Proteine degradiert, wodurch 80% der intrazellulären Proteine (Voorhees, Dees et al. 2003) und somit auch die Regulation einer Vielzahl von Signalwegen dessen Kontrolle unterliegen (Adams 2004). Inhibitoren des Proteasoms haben in den letzten Jahren Einzug in klinische Studien und schließlich in die Chemotherapie gehalten, da sie spezifisch nur in entarteten Krebszellen, jedoch nicht in gesunden Zellen apoptotisch wirken (Adams, Palombella et al. 1999). Präklinische Studien haben zwar gezeigt, dass hierbei eine Reihe von Apoptose-induzierenden Signalwegen involviert sind, die genauen Details sind jedoch nicht bekannt (Mujtaba and Dou 2011). Nach proteasomaler Inhibition sind unter anderem die Aktivierung von pro-apoptotischen Bcl-2 Familienproteinen und von JNK für die Initiierung von Apoptose essenziell. Es ist aber unbekannt, ob JNK bei proteasomaler Inhibition die Transkription von pro- oder anti-apoptotischen Genen moduliert oder direkten Einfluss auf Bcl-2 Familienproteine nimmt. Bis jetzt wurde ebenfalls nicht untersucht, ob die beiden Isoformen JNK1 und JNK2 spezifische oder redundante Funktionen in der Einleitung von Zelltod nach proteasomaler Inhibition ausüben. So wurden bis jetzt in der Tat unterschiedliche Rollen für diese beiden Isoformen in TNF $\alpha$ - und UV-induzierter Apoptose sowie ihre Dysregulation in der Tumorgenese festgestellt. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Bedeutung der Isoformen JNK1 und JNK2 für die Proteasominhibitor-vermittelte Apoptose zu analysieren und zu bestimmen, welche Signalwege von diesen Kinasen moduliert werden. Die genaue Aufklärung der molekularen Mechanismen kann dabei helfen, Strategien zur Behandlung von Proteasominhibitor-resistenten Tumoren zu entwickeln. Als zelluläres System wurden hierbei embryonale Mausfibroblasten verwendet, in denen durch gezielte homologe Rekombination entweder das JNK1- oder das JNK2-Gen deletiert wurde.

# *2. Material und Methoden*

---

## 2.1 Material

### 2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, falls nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt), AppliChem (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

### 2.1.2 Häufig verwendete Reagenzien

Reagenz	Beschreibung	Bezugsquelle
<b>Actinomycin D</b>	Transkriptions-Inhibitor	Sigma-Aldrich
<b>Bortezomib</b>	Proteasom-Inhibitor	LC Laboratories (Woburn, USA)
<b>Calpain-Inhibitor I</b> N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal, (ALLN)	Proteasom-Inhibitor	Biomol (Hamburg)
<b>Calpain-Inhibitor II</b> N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-methional, (ALLM)	Proteasom-Inhibitor	Biomol
<b>clasto-Lactacystin <math>\beta</math>-lacton</b>	Proteasom-Inhibitor	BostonBiochem (Wiesbaden-Nordenstadt)
<b>Cycloheximid (Chx)</b>	Translations-Inhibitor	Sigma-Aldrich
<b>N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aminomethylcoumarin (Ac-DEVD-AMC)</b>	Fluorochrom-gekoppeltes Peptid	Biomol
<b>Ethidiumbromid</b>	DNA-Farbstoff	Sigma-Aldrich
<b>MG-132</b>	Proteasom-Inhibitor	Enzo Life Sciences
<b>Propidiumiodid (PI)</b>	DNA-Farbstoff	Sigma-Aldrich
<b>Quinoline-Val-Asp-CH<sub>2</sub>-O-Ph (Q-VD-Oph, QVD)</b>	Pancaspase-Inhibitor	MP Biomedicals (Eschwege)

### 2.1.3 Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper

Antigen	Reaktivität	Spezies	Bezugsquelle
<b>IgG</b>	Kaninchen	Ziege	Bio-Rad (München)
<b>IgG</b>	Maus	Ziege	Bio-Rad
<b>IgG</b>	Ziege	Kaninchen	Invitrogen (Darmstadt)

## 2.1.4 Primäre Antikörper

Antigen	Klon	Spezies, Isotyp	Firma	Artikelnr.
<b>β-Aktin</b>	AC-74	Maus IgG <sub>2a</sub>	Sigma-Aldrich	A 5316
<b>ATF3</b>	C-19	Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)	sc-188
<b>ATF4</b>	C-20	Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology	sc-200
<b>Bak, NT</b>		Kaninchen IgG	Upstate, Millipore (Schwalbach)	06-536
<b>Bax, NT</b>		Kaninchen IgG	Upstate, Millipore	06-499
<b>Bcl-2</b>	C-2	Maus IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology	sc-7382
<b>Bcl-X<sub>L</sub></b>		Kaninchen IgG	BD Biosciences (Heidelberg)	610211
<b>Bim</b>	C34C5	Kaninchen IgG	Cell Signaling (Frankfurt am Main)	2933
<b>Caspase-3</b>	8G10	Kaninchen IgG	Cell Signaling	9665
<b>c-Jun</b>	60A8	Kaninchen IgG	Cell Signaling	9165
<b>Phospho-c-Jun (Ser73)</b>		Kaninchen IgG	Cell Signaling	9164
<b>Glucocorticoid- rezeptor</b>	M-20	Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology	sc-1004
<b>HIF1α</b>		Kaninchen IgG	Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)	NB100-449
<b>JNK1</b>	G151-333	Maus IgG <sub>1</sub>	BD Biosciences	554286
<b>JNK2</b>		Kaninchen IgG	Cell Signaling	4672
<b>c-Myc</b>		Kaninchen IgG	Cell Signaling	9402
<b>Phospho-c-Myc (Thr58/Ser62)</b>		Kaninchen IgG	Cell Signaling	9401
<b>Noxa</b>	N-15	Ziege IgG	Santa Cruz Biotechnology	sc-26917
<b>p53 (Ab-1)</b>	PAb421	Maus IgG <sub>2a</sub>	Calbiochem, Merck (Darmstadt)	OP03

### 2.1.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden lyophilisiert von Invitrogen bezogen.

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung	Produkt
<b>BIM-fw</b>	GTGTTCCACTTGGATTACAC	semi-quantitative PCR	~300 bp
<b>BIM-L_rw</b>	GACAGCAGAGAAGATCTTCTC		
<b>GAPDH-5'</b>	GCCAAAGGGTCATCATCTC	semi-quantitative PCR	~300 bp
<b>GAPDH-3</b>	GTAGAGGCAGGGATGTTC		
<b>Noxa-fw</b>	GAGTTCGCAGCTCAACTCAG	semi-quantitative PCR	~300 bp
<b>Noxa-rw</b>	CACAATCCATCCAATACCAG		

### 2.1.6 Eukaryotische Zellen

Zelllinie	Herkunft	Charakteristika	Medium
<b>MEF JNK1<sup>+/-</sup></b>	murine embryonale Fibroblasten	adhärente Zellen, nach 3T3-Methode immortalisiert, mit Heterozygotie für <i>Mapk8</i>	DMEM-Medium (PAA Laboratories, Cölbe) mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (Biowest, Renningen), 90 Units/ml Penicillin, 90 µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories)
<b>MEF JNK1<sup>-/-</sup></b>	murine embryonale Fibroblasten	Derivat von MEF JNK1 <sup>+/-</sup> mit <i>Mapk8</i> -Defizienz	wie MEF JNK1 <sup>+/-</sup>
<b>MEF JNK2<sup>-/-</sup></b>	murine embryonale Fibroblasten	Derivat von Wildtyp-MEF mit <i>Mapk9</i> -Defizienz	wie MEF JNK1 <sup>+/-</sup>

Es wurde die sogenannte 3T3-Methode angewandt, bei der die primären Fibroblasten in einer Dichte von  $3 \times 10^5$  auf 20 cm<sup>2</sup> ausgesät und alle drei Tage wieder auf diese Konzentration verdünnt werden, bis sie nach Durchlaufen einer „Krise“ immortalisiert sind (Todaro and Green 1963; Sabapathy, Hochedlinger et al. 2004).

Die MEF-Zelllinien wurden freundlicherweise von Prof. Kanaga Sabapathy (Labor für Molekulare Karzinogenese, Nationales Krebszentrum, Singapur, Republik Singapur) zur Verfügung gestellt.

### 2.1.7 Größenstandards

Name	Verwendungszweck	Bezugsquelle
<b>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</b>	Protein-Größenstandard (11-170 kDa)	Fermentas (St. Leon-Rot)
<b>SmartLadder</b>	DNA-Größenstandard (0,2 – 10 kb)	Eurogentec (Köln)

### 2.1.8 Enzyme

Name	Verwendungszweck	Bezugsquelle
<b>Trypsin</b>	Lösen von adhärennten Zellen	PAA Laboratories
<b>Taq-Polymerase</b>	Generierung von PCR-Produkten	Qiagen (Hilden)
<b>M-MLV Reverse Transkriptase</b>	Generierung von cDNA	Invitrogen

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Isolation von RNA

Die Isolation der RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen). Hierbei wurden die Zellen zunächst mit einem Guanidin-Thiocyanat-Puffer lysiert, der zur Inaktivierung der RNAsen führt. Die Lysate wurden anschließend mit einem QIAshredder (Qiagen) homogenisiert und unter Hochsalzbedingungen an eine Silicamembran gebunden, die spezifisch für RNAs mit einer Größe über 200 bp ist. Dies ermöglicht eine selektive Aufreinigung von mRNAs unter Ausschluss von tRNAs und kleiner ribosomaler RNAs. Abschließend wurde die RNA mit Wasser eluiert.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Hierbei wurde die Verwendung von RNase-freien Geräten, Filterspitzen und Flüssigkeiten beachtet, um die RNAs in intaktem Zustand aufzureinigen. Die Konzentrationsbestimmung der RNAs erfolgte mit Hilfe des NanoDrop1000 (s. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren).

#### 2.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch Messung eines 2 µl-Aliquots der Probe mit Hilfe des NanoDrop 1000 Spektrophotometers (PEQLAB, Erlangen). Über das Verhältnis von OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> und OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> wurden Protein- bzw. Lösungsmittelverunreinigungen in der Nukleinsäure-Lösung bestimmt.

### 2.2.1.3 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese werden mit Hilfe der Reversen Transkriptase in einer PCR aus mRNAs doppelsträngige DNA/RNA-Hybride synthetisiert. Dies geschieht unter Einsatz von Primern, die aus einer Vielzahl von Desoxythymidinen (Oligo-dTs) bzw. aus sechs zufälligen Nukleotiden (*Random-Primer*) bestehen und deshalb an die Poly(A)-Schwänze am 3'-mRNA-Ende bzw. an vielen Stellen innerhalb der mRNAs binden können. Die cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung von RNase-freien Geräten, Filterspitzen und Flüssigkeiten und wurde nach folgendem Schema angesetzt:

2 µg	RNA
100 pmol	<i>Random-Primer</i> (Invitrogen)
ad 16 µl	10 mM Hepes, 0,1 mM EDTA, pH 7,8

Für die initiale Denaturierung der RNA wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend 5 Minuten auf Eis gekühlt. Schließlich wurde folgender Mix hinzugefügt:

8 µl	5x <i>First Strand</i> -Puffer (250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> ; Invitrogen)
8 µl	dNTP (10 mM)
3 µl	DTT (0,1 M)
2 µl	RNase OUT, rekombinanter Ribonuklease-Inhibitor (Invitrogen)
3 µl	M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl; Invitrogen)

Die Reaktion wurde in dünnwandigen 0,2 ml Reaktionsgefäßen (Biometra, Göttingen) unter folgenden Bedingungen in einem TProfessional Thermocycler (Biometra) durchgeführt:

Hybridisierung		Elongation	Inaktivierung
25°C	30°C	37°C	95°C
5 Min	5 Min	90 Min	5 Min

### 2.2.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine enzymatische Reaktion, bei der eine thermostabile Polymerase DNA-Abschnitte, die durch Primer spezifisch eingegrenzt werden, von einer DNA-Matrize zyklisch amplifiziert. Die PCR wurde nach folgendem Schema angesetzt:

5 µl	10x DNA-Polymerase-Puffer (Qiagen)
1 µl	dNTP-Mix (10 mM)
1 µl	Vorwärts-Primer (20 µM)
1 µl	Rückwärts-Primer (20 µM)
2 µl	cDNA
0,5 µl	Taq DNA-Polymerase (Qiagen)
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O

Die Reaktion wurde in dünnwandigen 0,2 ml Reaktionsgefäßen unter folgenden Bedingungen durchgeführt und anschließend mittels analytischer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und quantitativ ausgewertet (s. Analytische Agarosegele).

Initiale Denaturierung	Denaturierung	Hybridisierung	Elongation	Finale Elongation
94°C	94°C	55°C	72°C	72°C
5 Minuten	1 Minute	1 Minute	30 Sekunden	20 Minuten
1 Zyklus	25-27 Zyklen			1 Zyklus

### 2.2.1.5 Analytische Agarosegele

Zur Restriktionsanalyse werden die DNA-Fragmente in einem Agarosegel elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Man macht sich hierbei zunutze, dass Nukleinsäuren aufgrund der Phosphatgruppen im Rückgrat negativ geladen sind und ein konstantes Masse-Ladungsverhältnis aufweisen.

Die DNA-Analyse erfolgte in 2%-igen Agarosegelen (2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris pH 8, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid)). Die Elektrophorese wurde bei konstanten 10 V/cm in einer mit TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer (PerfectBlue Gelsystem Mini L, PEQLAB) durchgeführt. Ein DNA-Größenstandard ermöglichte die Größenbestimmung der Banden. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren diente der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid. Die Gele wurden zur Dokumentation bei UV-Licht (312 nm) mit der Dokumentationseinheit ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Freiburg) fotografiert und anschließend mit der Multi Gauge Software Version 3.2 (Fujifilm, Düsseldorf) quantifiziert.

## **2.2.2 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen**

Zur Vermeidung von Kontaminationen durch Prokaryoten, Hefe oder Pilze wurde mit den Zelllinien unter sterilen Bedingungen in Zellkulturlaboren unter Sicherheitswerkbänken (Hera Safe, Heraeus) gearbeitet. Des Weiteren wurden nur mit Gammastrahlung behandelte Zellkulturmedien, sterile Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen), Pipetten (Corning Incorporated, Amsterdam, Niederlande; Sarstedt), Zentrifugenröhrchen (Greiner) sowie Zellkulturschalen (Greiner) verwendet. Die Zelllinien wurden bei 5% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C in Inkubatoren (HeraCell 240, Heraeus) kultiviert.

### **2.2.2.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen**

Für die Kryokonservierung wurden die MEF-Zellen in DMSO-haltiges Medium überführt (18% (v/v) fötales Kälberserum, 10% (v/v) DMSO, 90 Units/ml Penicillin, 90 µg/ml Streptomycin in DMEM-Medium) und über Nacht langsam auf -80°C heruntergekühlt. Die dauerhafte Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

Zur Rekultivierung wurden die kryokonservierten Zellen im Wasserbad aufgetaut und in eine Zellkulturflasche mit frischem, vorgewärmtem Medium überführt.

### **2.2.2.3 Herstellung und Lagerung von Zellpellets**

Bei der Herstellung von Zellpellets wurden die adhärenenten Zellen mechanisch (durch Verwendung von Zellschabern) oder enzymatisch (durch Inkubation mit Trypsin) von der Oberfläche der Zellkulturschalen gelöst, in ein geeignetes Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C (5204 x g) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Zellen mit PBS gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert oder direkt lysiert.

### **2.2.2.4 Transiente Transfektion von *small-interfering RNAs* (siRNAs)**

Die RNA-Interferenz ist ein natürlicher Mechanismus der Zelle, um die Expression von bestimmten Genen zu reduzieren. Eine zentrale Rolle spielen hierbei kurze doppelsträngige RNA-Stränge (*microRNAs*, miRNAs), die durch Anwesenheit von viraler RNA oder im Rahmen der endogenen Genregulation entstehen. Der Proteinkomplex

RISC (*RNAi-induced Silencing Complex*) trennt die doppelsträngige miRNA und bildet mit einem der Stränge einen Komplex, um damit anschließend an komplementäre mRNA zu binden und deren Abbau oder eine Translationsinhibition einzuleiten. In Folge dessen wird die Expression eines bestimmten Gens reduziert. Transfiziert man in Zellen künstlich hergestellte miRNA, sogenannte *small-interfering* RNA (siRNA), die komplementär zur mRNA eines Gens ist, so kann man somit gezielt die Expression des dazugehörenden Gens auf Proteinebene reduzieren (*Knockdown*).

Für RNA-Interferenz wurden ON-TARGETplus SMARTpool siRNAs (Thermo Scientific Dharmacon, Schwerte) verwendet, die stabilisierende Modifikationen besitzen und aus einem Mix von vier verschiedenen siRNAs bestehen, welche allesamt gegen die gleiche kodierende mRNA gerichtet sind. Als Transfektionsreagenz diente Dharmafect 3 (Thermo Fisher Scientific Dharmacon). Die MEF-Zellen wurden in subkonfluenter Dichte nach Herstellerangaben mit siRNA transfiziert, 48 Stunden nach Transfektion aufgeteilt und nach weiteren 24 Stunden stimuliert. Anschließend erfolgte die Analyse der Proteinmenge mittels Western Blot (s. Western Blot).

### **2.2.3 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS) ermöglicht die Analyse von einzelnen Zellen, Zellkernen oder Partikeln in Bezug auf ihre Größe, Granularität und spezifische Fluoreszenz mit hoher Durchsatzrate und geringem zeitlichem Aufwand. Bei dieser Messmethode werden suspendierte Einzelzellen durch hydrodynamische Fokussierung an einem Laser vorbeigeführt, die von ihnen ausgesandten charakteristischen Lichtsignale detektiert werden. Die relative Größe der Partikel wird hierbei über das Vorwärtsstreulicht und ihre relative Granularität über das Seitwärtsstreulicht ermittelt. Gleichzeitig kann bei verschiedenen Fluorochromgekoppelten Analysen die Fluoreszenzintensität einzelner Partikel bestimmt werden. Durch Anwendung von Fluorochrom-Fusionsproteinen oder Fluoreszenz-markierten Antikörpern kann beispielsweise die Expression extra- und intrazellulärer Proteine analysiert werden. Alternativ ist es möglich, durch den Einsatz von DNA-interkalierenden Fluorochromen den relativen DNA-Gehalt von Zellkernen zu bestimmen und somit die Zelltodrate und die Zellzyklusphasen einer Zellpopulation zu ermitteln. Die Analyse der Daten erfolgte mit CellQuest Pro Analysis Software Version 4.0.1.

Für Messungen mit dem Durchflusszytometer (FACSCalibur, BD Biosciences, Anregungswellenlänge 488 nm) wurden folgende Fluorochrome eingesetzt:

Fluorochrom	Absorptions-Maximum (nm)	Emissions-Maximum (nm)	Detektor, Wellenlänge (nm)
<b>Propidiumiodid</b>	536	617	FL-3, $\geq 670$
<b>Tetramethylrhodamin-ethylester (TMRE)</b>	549	575	FL-2, $585 \pm 42$

### 2.2.3.1 Bestimmung apoptotischer Zellen nach Nicoletti

Der Zelltodnachweis nach Nicoletti (Nicoletti, Migliorati et al. 1991) ermöglicht es, mit Hilfe eines hypotonen Citrat-Puffers und dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid den relativen DNA-Gehalt von Zellkernen zu ermitteln. Somit analysiert man im FACS den relativen DNA-Gehalt der isolierten Zellkerne und kann damit sowohl die Zellzyklusphase ( $G_1$ -, S-,  $G_2$ -Phase) als auch den Anteil an toten Zellen im sogenannten Sub- $G_1$ -Bereich bestimmen, wenn durch Zelltod die genomische DNA degradiert und dadurch der DNA-Gehalt verringert wird.

Für den Zelltodnachweis wurden die Zellen nach Stimulation geerntet, in ein FACS-Röhrchen (BD Biosciences) überführt und bei 485 x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert (Multifuge 3 S-R, Heraeus, Langensebold). Nach Verwerfen des Überstands wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit 1 ml PBS in Nicolettipuffer (0,1% (w/v) Natriumcitrat, 0,1% (v/v) Triton X-100, 50 µg/ml Propidiumiodid) aufgenommen.

### 2.2.3.2 Messung der zellulären Membranintegrität mittels Propidiumiodid-ausschluss

Propidiumiodid ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, der nicht zellpermeabel ist. Nekrotische oder spät apoptotische Zellen besitzen eine defekte Zellmembran und erscheinen im FACS Propidiumiodid-positiv. So erlaubt es die Methode, zwischen lebenden (PI-negativen) und toten (PI-positiven) Zellen zu unterscheiden.

Die Zellen wurden hierfür mit Trypsin geerntet, in FACS-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation pelletiert (485 x g, 5 Minuten, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen nach einem Waschschrift mit 1 ml PBS in 2 µg/ml Propidiumiodid in PBS aufgenommen und im FACS analysiert.

### 2.2.3.3 Messung des mitochondrialen Membranpotenzials

Die Messung des mitochondrialen Membranpotenzials erfolgte mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Tetramethylrhodaminethylester T669 (TMRE, Molecular Probes, Life Technologies, Darmstadt). Dieses Fluorochrom akkumuliert in Zellen abhängig vom Membranpotenzial in den Mitochondrien und zeigt dabei eine Verschiebung des Emissionsmaximums in den längerwelligen Bereich. Hierbei ist im Durchflusszytometer der Anteil an Zellen mit Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials als Population mit geringerer Fluoreszenzintensität ermittelbar.

Nach Stimulation wurde den Zellen der Farbstoff TMRE in einer finalen Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  zugegeben und die Proben wurden für weitere 30 Minuten bei 37°C und in wassergesättigter Atmosphäre bei 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach Überführung in FACS-Röhrchen wurden die Zellen 5 Minuten bei 485 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit jeweils 1 ml PBS in PBS aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

### 2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.2.4.1 Herstellung von zytosolischen Zellextrakten

Zur Analyse von Proteinen des Zytosols und der Organellen wurden die Zellen in Lysepuffer mit physiologischer Salzkonzentration und dem milden Detergens NP-40 aufgeschlossen. Hierzu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 50  $\mu\text{l}$  Lysepuffer (inklusive Phosphatase- und Protease-Inhibitoren) resuspendiert, 20 Minuten auf Eis inkubiert und zur Verbesserung des Aufschlusses regelmäßig durchmischt.

<b>Lysepuffer</b>	50 mM	Tris pH 7,4
	1%	NP-40
	150 mM	Natriumchlorid
	1 mM	Dithiothreitol (DTT)
	1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
	1mM	Natriumpyrophosphat
	1 mM	Natriumorthovanadat
	10 $\mu\text{g/ml}$	Aprotinin
	10 $\mu\text{g/ml}$	Leupeptin
	10 $\mu\text{g/ml}$	Pepstatin

Nachfolgend wurde der Zelldebris durch Zentrifugation (20.800 x g, 20 Minuten, 4°C, Eppendorf Centrifuge 5417R) abgetrennt und der proteinhaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentration der Proteine wurde mittels Bradford-Methode (s. Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bradford) bestimmt. Die Proteinlysate wurden dauerhaft bei -80°C gelagert.

#### **2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bradford**

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach dem Prinzip der Bradford-Methode mittels Protein-Assay Färbelösung (Bio-Rad, München). Hierbei wird eine saure Lösung von Coomassie Brilliant Blau G-250 mit der Proteinlösung gemischt. In Abhängigkeit von der Proteinbindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm durch die Bildung des Komplexes kann photometrisch bestimmt werden und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Es ist zu beachten, dass Coomassie Brilliant Blau G-250 bevorzugt an basische und aromatische Aminosäurereste bindet und folglich das Ergebnis abhängig von der Aminosäurezusammensetzung der Proteine verfälscht werden kann.

2 µl der Proteinlösung wurden mit 1000 µl der (1:5 in Wasser vorverdünnten) Protein-Assay Färbelösung in einer Halb-Mikro-Küvette (Sarstedt, Nümbrecht) gemischt und die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt (Biophotometer RS 232C, Eppendorf, Hamburg). Als Blindprobe wurden 2 µl Lysepuffer eingesetzt.

#### **2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dient dazu, Proteine in einem Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Hierbei werden die Proteine mit dem anionischen Detergens SDS behandelt, das sich in einem konstanten Verhältnis (1,4 g SDS/1 g Protein) an die hydrophoben Bereiche der Proteine anlagert und dabei ihre Eigenladung überdeckt. Durch die negative Ladung des Detergens wird ein konstantes Masse-Ladungsverhältnis erzeugt und die Proteine können dadurch im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Hierbei ist die Laufweite des Proteins umgekehrt proportional zu seiner Molekülmasse.

	Sammelgel (3,75%)	Trenngel (7,5%)	Trenngel (10%)	Trenngel (12,5%)	Trenngel (15%)
Gesamtvolumen	20 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml
30% Acryl-Bis-Acrylamidmix	2,5 ml	7,5 ml	10 ml	12,5 ml	15 ml
3 M Tris, pH 8,8	-	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
0,5 M Tris, pH 6,8	5 ml	-	-	-	-
10% SDS	0,2 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
Wasser	11,3 ml	16,95 ml	14,45 ml	11,95 ml	9,45 ml
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
1,5% APS	1 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml

Die Proteinproben mit jeweils 25 µg Protein wurden mit einem SDS- und β-Mercaptoethanol-haltigen Proteinprobenpuffer versetzt und durch Aufkochen (5 Minuten, 95°C) denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel, wobei die Proteine zunächst in einem 3,75%-igen Sammelgel fokussiert und anschließend in einem 7,5%-, 10%-, 12,5%- bzw. 15%-igen Trenngel der Größe nach separiert wurden. Die Elektrophorese wurde im Mini-PROTEAN Tetra Cell-System von Bio-Rad bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel in einer mit Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, pH 8,3, 192 mM Glycin, 1% (w/v) SDS) gefüllten Kammer durchgeführt. Zur Kontrolle des Molekulargewichts wurde ein vorgefärbter Proteinstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) eingesetzt.

#### 2.2.4.4 Western Blot

Die durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden zur Immundetektion mittels „Tank Blot“-Verfahren elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran (Millipore) transferiert. Hierbei legt man senkrecht zum Polyacrylamidgel ein elektrisches Feld an, woraufhin die durch Anlagerung von SDS negativ geladenen Proteine zur Anode und damit aus dem Gel auf die Membran wandern. Für das „Tank Blot“-Verfahren wurde zunächst eine PVDF-Membran durch Schütteln in Methanol aktiviert und in Transferpuffer für 5 Minuten äquilibriert. Anschließend

wurden das Polylacrylamidgel und die Membran mit je einem in Transferpuffer getränkten 3 MM Filterpapier (Whatmann, GE Healthcare, Freiburg) sowohl unterschichtet als auch überschichtet und in einer Transfereinheit eingeklemmt. Diese wurde anschließend in eine mit Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin) gefüllte Blotkammer (Mini Trans Blot Cell, BIO-RAD) eingehängt. Der Transfer erfolgte für 120 Minuten bei 150 mA. Zur Absättigung von unspezifischen Proteinbindestellen wurde die Membran anschließend für 1 Stunde in Blockierlösung (5% (w/v) BSA, 0,2% (v/v) Tween-20 in PBS) geschwenkt. Hiernach erfolgte die Inkubation mit dem in Blockierlösung verdünnten Primärantikörper über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln. Im Anschluss wurde die Membran viermal für je 15 Minuten in 0,2% (v/v) Tween-20 in PBS gewaschen und für 1,5 Stunden mit Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (1:20.000 in Blockierlösung) bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach erneutem Waschen für viermal 15 Minuten mit 0,2% Tween-20 in PBS erfolgte die Detektion mittels Chemilumineszenz. Hierbei wurde das Luminol-basierte ECL (*Enhanced Chemiluminescence*)-System der Firma Amersham Bioscience (GE Healthcare, München) verwendet und der Film (ECL Hyperfilm, Amersham Bioscience) nach Exposition entwickelt (Curix 60, AGFA, Bonn).

#### **2.2.4.5 Fluorometrischer Caspase-3-Substrattest**

Beim fluorometrischen Substrattest wurden Zelllysate mit dem Fluoreszenz-markierten Caspase-3-Substrat Ac-DEVD-AMC (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aminomethylcoumarin) inkubiert und das Fluorochrom Aminomethylcoumarin wurde durch enzymatisch aktive Caspase-3-Proteine nach proteolytischer Spaltung freigesetzt. Die Zunahme des freien Fluorochroms in der Lösung kann spektrometrisch bestimmt werden und ist direkt proportional zur im Lysat befindlichen Caspase-3-Aktivität.

Die Aktivität von Caspase-3 wurde in zytoplasmatischen Zelllysaten analysiert und pro Probe 40 µg Protein in einem Volumen von 50 µl eingesetzt. Nach Zugabe von 150 µl Substratpuffer (50 mM HEPES, pH 7,3, 100 mM NaCl, 10% (w/v) Sucrose, 0,1% (w/v) CHAPS, 10 mM DTT, 50 µM Ac-DEVD-AMC) erfolgte die Messung der Fluoreszenzemission bei 442 nm über einen Zeitraum von 5 Stunden in Abständen von 10 Minuten mit einem Fluorometer (Tecan Infinite M200, Crailsheim) bei einer Anregungswellenlänge von 346 nm mittels der Tecan i-control Software Version 1.5.14.0.

# ***3. Ergebnisse***

---

### 3.1 MG-132 induziert in *JNK2*<sup>-/-</sup> murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) verstärkt Apoptose

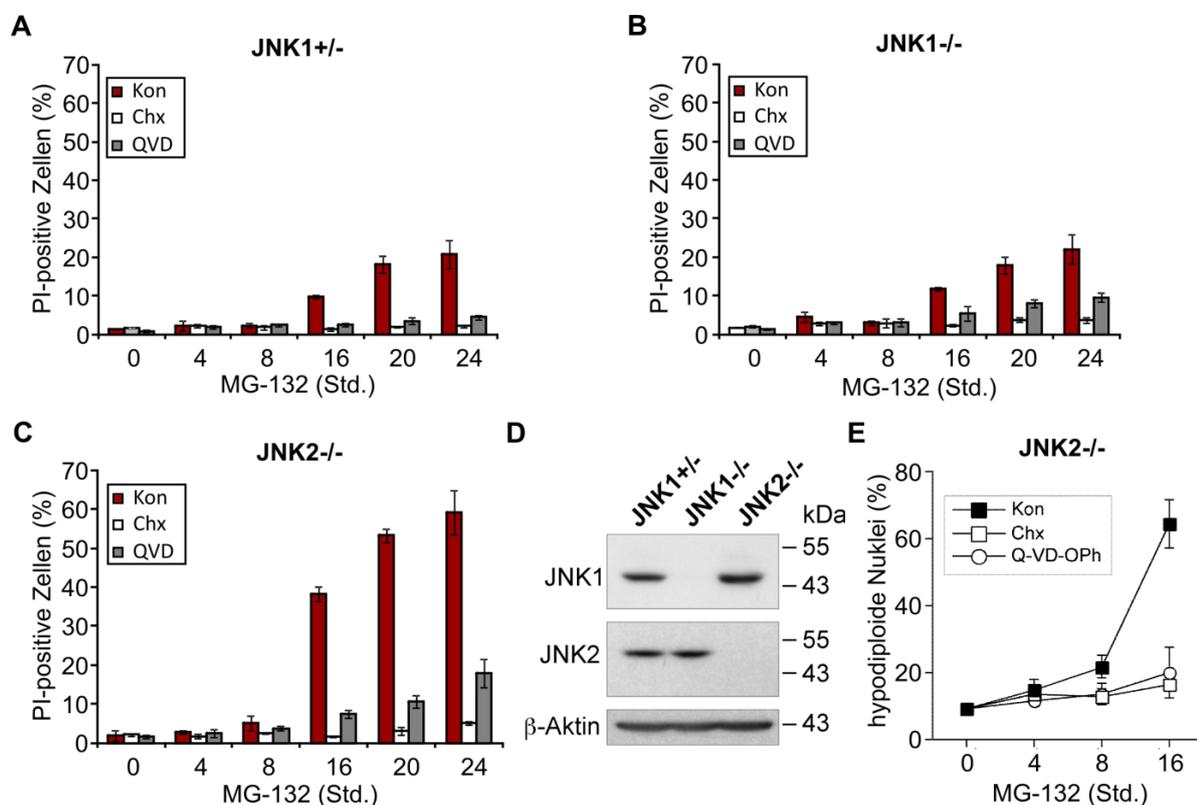
Eine Vielzahl von Studien zeigt, dass proteasomale Inhibition in Abhängigkeit von JNK-Aktivität Apoptose in einer Reihe von Krebszelllinien auslöst, jedoch ist der Einfluss der einzelnen JNK-Isoformen, JNK1 und JNK2, dabei bisher nicht näher bestimmt worden (Hideshima, Mitsiades et al. 2003; Yang, Ikezoe et al. 2004; Yin, Zhou et al. 2005). Um die Rolle der jeweiligen Isoformen näher zu untersuchen, wurden als zelluläres Model murine embryonale Fibroblasten (MEFs) verwendet, in denen durch homologe Rekombination entweder das *JNK1*- oder das *JNK2*-Gen deletiert wurde. Diese Zellen wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Sabapathy zur Verfügung gestellt (Sabapathy, Hu et al. 1999; Sabapathy, Jochum et al. 1999). Als Kontrolle dienten heterozygote *JNK1*<sup>+/-</sup> MEF-Zellen. Die *JNK2*-defizienten Zellen sind somit als einzige der untersuchten MEF-Linien homozygot für *JNK1*. Immunoblot-Analysen bestätigten die angegebene Defizienz der Zelllinien (Abb. 13D), so exprimieren die *JNK1*<sup>+/-</sup> MEFs in der Tat JNK1 und JNK2, während in den *JNK1*<sup>-/-</sup> MEFs nur die Expression von JNK2 nachgewiesen werden konnte. Umgekehrt exprimieren die *JNK2*<sup>-/-</sup> MEFs nur JNK1.

Zunächst wurde die Sensitivität der drei MEF-Linien gegenüber proteasomaler Inhibition mit dem Peptidalddehyd MG-132 zeitabhängig untersucht (Abb. 13A-C). So führte MG-132 in *JNK2*<sup>-/-</sup> MEFs bereits nach 16 Stunden zu einer effizienten und schnellen Zelltodinduktion (ca. 40% PI-positive Zellen) und nach 24 Stunden Behandlung zu einer maximalen Zelltodrate von 60%. Im Gegensatz hierzu wiesen *JNK1*<sup>+/-</sup> und *JNK1*<sup>-/-</sup> MEFs eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber MG-132 auf und erreichten im gleichen Zeitraum eine maximale Zelltodrate von lediglich ca. 20%.

Des Weiteren wurden die Zellen zur Analyse apoptotischen, also Caspasen-abhängigen, Zelltodes mit dem Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh (QVD) und MG-132 koinkubiert (Caserta, Smith et al. 2003) (Abb. 13A-C). Hierbei konnte in allen drei Zelllinien der MG-132-induzierte Zelltod durch Anwesenheit von QVD nahezu vollständig unterdrückt werden. Dieses Ergebnis stellt somit ein deutliches Indiz für apoptotischen Zelltod dar. MG-132-induzierte Apoptose wurde ebenfalls durch eine alternative durchflusszytometrische Messung, der Bestimmung der DNA-Fragmentierung nach der Methode von Nicoletti (Nicoletti, Migliorati et al. 1991) bestätigt, die unter analogen experimentellen Bedingungen in MG-132-behandelten *JNK2*<sup>-/-</sup> Zellen eine deutliche zeitabhängige

Zunahme der DNA-Fragmentierung zeigte (Abb. 13E). Diese wurde ebenfalls durch Koinkubation mit MG-132 und QVD in den JNK2-defizienten MEFs unterdrückt.

Parallel hierzu wurden die Zellen auch mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (Chx) behandelt (Siegel and Sisler 1964), um zu analysieren, ob und inwieweit der MG-132-induzierte Zelltod von einer Proteinneusynthese abhängig ist (Abb. 13A-C). Interessanterweise konnte durch Cycloheximid der Zelltod-induzierende Effekt von MG-132 in allen untersuchten MEF-Linien vollständig aufgehoben werden. Diese Beobachtung wurde auch bei der Messung der DNA-Fragmentierung in JNK2<sup>-/-</sup> MEFs gemacht, die mit MG-132 und Cycloheximid koinkubiert wurden (Abb. 13E). Folglich kann eine Abhängigkeit des MG-132-induzierten Zelltods von *de novo* Proteinsynthese postuliert werden.



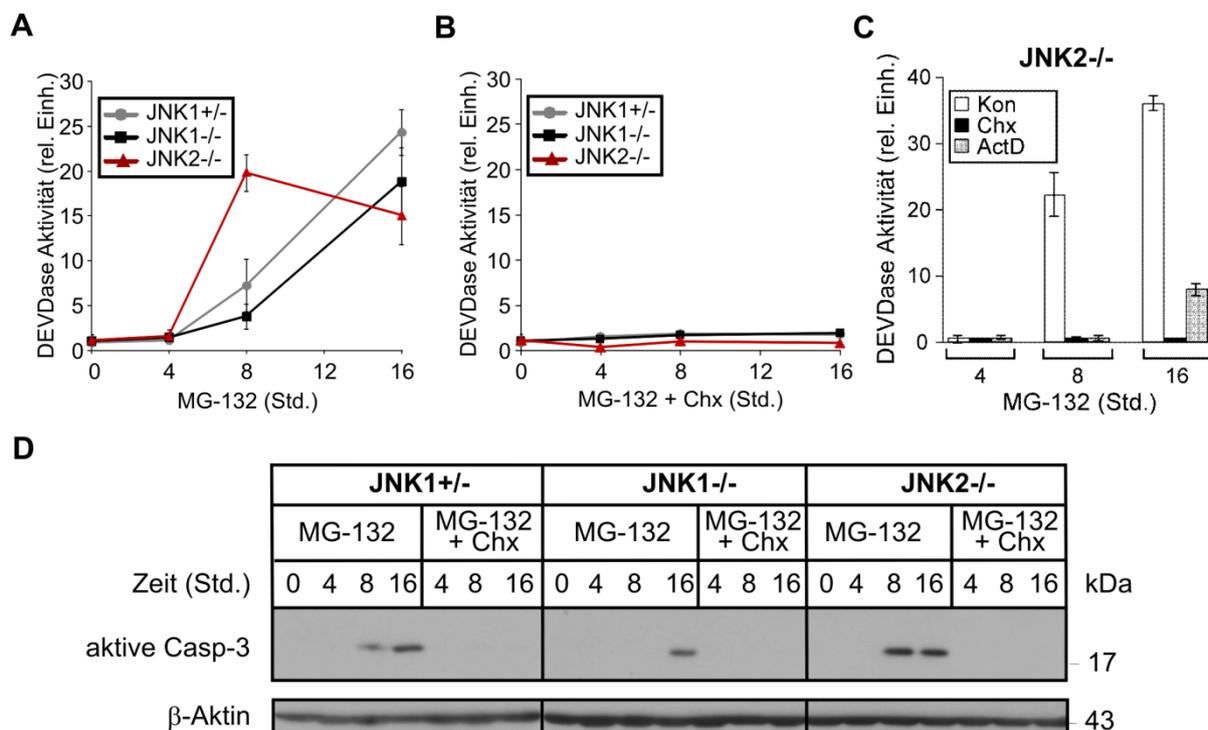
### Abb. 13 Charakterisierung des MG-132-induzierten Zelltodes

(A) JNK1<sup>+/-</sup>, (B) JNK1<sup>-/-</sup> und (C) JNK2<sup>-/-</sup> MEF wurden mit MG-132 (10  $\mu$ M) in An- oder Abwesenheit von Cycloheximid (Chx, 10  $\mu$ g/ml) bzw. Q-VD-OPh (QVD, 10  $\mu$ M) für die Dauer der angegebenen Zeiträume inkubiert. Anschließend wurde der Zelltod über den Verlust der Zellmembranintegrität anhand der Aufnahme von Propidiumiodid (PI) durchflusszytometrisch quantifiziert. Der Anteil PI-positiver Zellen in % ist als Balkendiagramm dargestellt (n=3, Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung). (D) Zelllysate von JNK1<sup>+/-</sup>, JNK1<sup>-/-</sup> und JNK2<sup>-/-</sup> MEFs wurden im denaturierenden Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennt und mittels Western Blot auf die Expression von JNK1 und JNK2 untersucht.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Es ist eines von drei repräsentativen Experimenten gezeigt. (E) JNK2<sup>-/-</sup> MEF wurden mit MG-132 (10  $\mu$ M) in An- oder Abwesenheit von Cycloheximid (Chx, 10  $\mu$ g/ml) bzw. Q-VD-OPh (10  $\mu$ M) für die Dauer der angegebenen Zeiträume inkubiert. Anschließend wurde der Zelltod über die Messung der DNA-Fragmentierung durchflusszytometrisch quantifiziert. Der Anteil von Zellen mit einem hypodiploiden DNA-Gehalt in % ist als Balkendiagramm dargestellt (n=3, Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

JNK1-profiziente JNK2<sup>-/-</sup> MEFs weisen folglich eine höhere Sensitivität gegenüber MG-132-induzierter Apoptose als JNK1<sup>+/-</sup> und JNK1<sup>-/-</sup> MEFs auf, welche zudem abhängig von *de novo* Proteinsynthese zu sein scheint.

### 3.2 Proteasomale Inhibition löst eine frühe Caspasenaktivierung in JNK2<sup>-/-</sup> MEFs aus

Die Hemmung des MG-132-induzierten Zelltodes in den untersuchten MEF-Linien durch den Caspase-Inhibitor QVD stellt ein Indiz für Caspasen-abhängige Apoptose dar. Dieses wurde in einem fluorometrischen Enzymaktivitätstest für die Effektorcaspasen 3 und 7 sowie anhand von Immunoblot-Analysen für aktive Caspase-3-Fragmente näher untersucht (Abb. 14).



#### Abb. 14 Analyse der MG-132-induzierten Caspase-3-Aktivierung

JNK1<sup>+/-</sup>, JNK1<sup>-/-</sup> und JNK2<sup>-/-</sup> MEFs wurden mit MG-132 (10  $\mu$ M) in (A) Ab- oder (B) Anwesenheit von Cycloheximid (Chx, 10  $\mu$ g/ml) für die Dauer der angegebenen Zeiträume inkubiert. Anschließend wurden Gesamtzelllysate hergestellt und in einem Fluoreszenz-basierten Enzymtest für Caspase-3-Aktivität mit dem Substrat Ac-DEVD-AMC analysiert (Liniendiagramme zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung für die DEVDase-Aktivität in relativen Einheiten, n=3). (C) JNK2<sup>-/-</sup> MEFs wurden mit MG-132 (10  $\mu$ M) in Ab- oder Anwesenheit von Chx (10  $\mu$ g/ml) oder Actinomycin D (ActD, 1  $\mu$ g/ml) für die Dauer der angegebenen Zeiträume inkubiert. Anschließend wurden Gesamtzelllysate hergestellt und in einem Fluoreszenz-basierten Enzymtest für Caspase-3-Aktivität mit dem Substrat Ac-DEVD-AMC analysiert (Liniendiagramme zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung für die DEVDase-Aktivität in relativen Einheiten, n=3). (D) Die Zellen wurden behandelt wie in A und B beschrieben und die Zelllysate mittels Western Blot auf das Auftreten von aktiven Caspase-3-Fragmenten untersucht.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Casp-3 = Caspase-3. Es sind repräsentative Western Blots aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

Die JNK2<sup>-/-</sup> MEFs erreichten bereits nach achtstündiger MG-132-Behandlung eine maximale DEVDase-Aktivität, während vergleichbare Werte in JNK1<sup>+/-</sup> und JNK1<sup>-/-</sup> MEFs erst nach 16 Stunden proteasomaler Inhibition gemessen wurden (Abb. 14A). Interessanterweise wiesen die JNK1<sup>-/-</sup> MEFs eine verzögerte Caspasenaktivität im Vergleich zu den JNK1<sup>+/-</sup> Zellen auf. Es konnte somit bestätigt werden, dass der MG-132-vermittelte Zelltod mit einer deutlichen Caspasenaktivierung einhergeht und folglich von apoptotischer Natur ist. Zusätzlich implizieren die Daten eine JNK1-Abhängigkeit der MG-132-induzierten Apoptose.

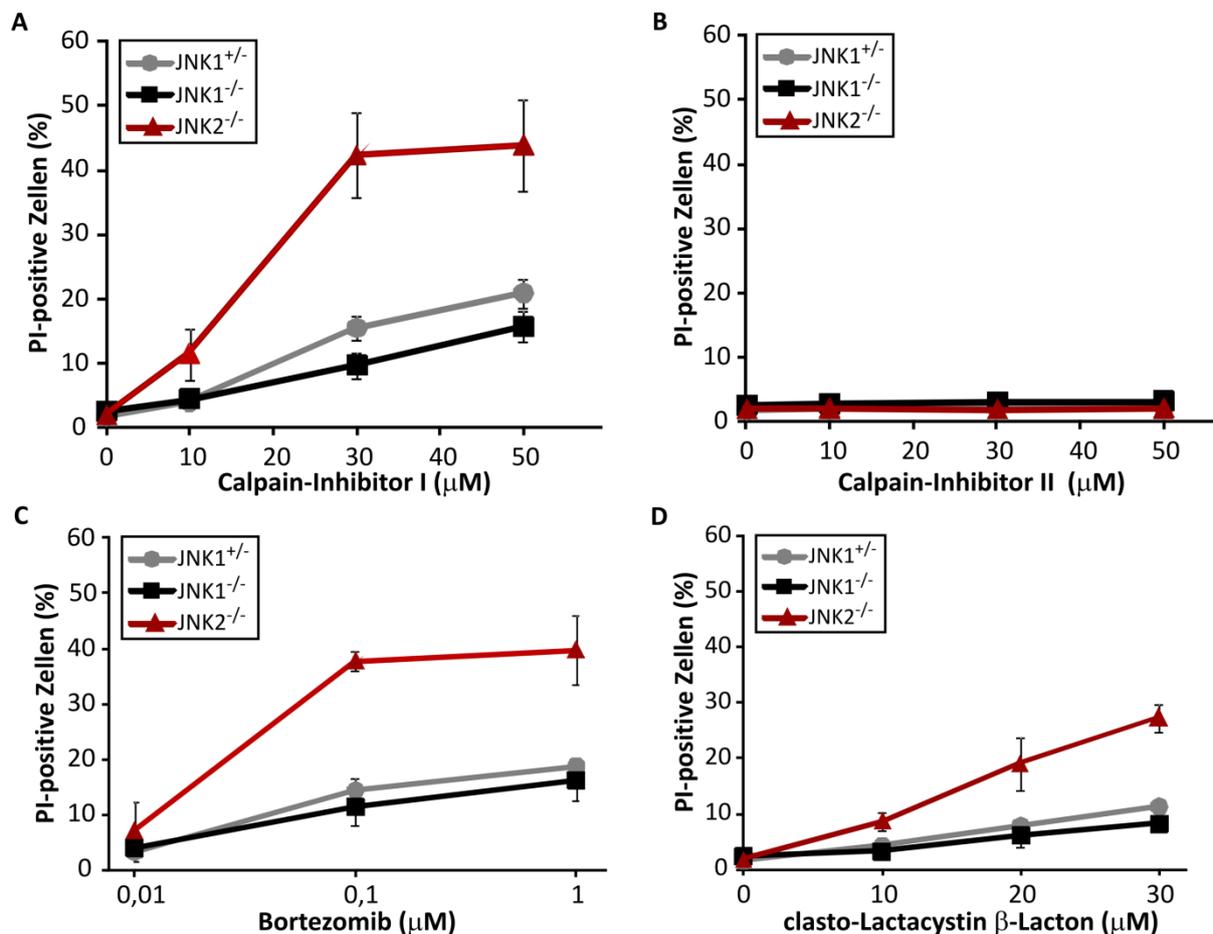
Des Weiteren konnte analog zu den oben gezeigten Ergebnissen die Hemmung der Transkription durch Actinomycin D (ActD) in JNK2<sup>-/-</sup> MEFs (Abb. 14C) (Bose, Gothoskar et al. 1967) und die Translationsinhibition mittels Cycloheximid (Chx) (Abb. 14B, C) in allen untersuchten Zelllinien vor MG-132-vermittelter Caspase-3-Aktivierung schützen. Somit wurde mit einer weiteren Analyse die Abhängigkeit des MG-132-induzierten Zelltodes von *de novo* Proteinsynthese verifiziert.

Neben der enzymatischen Caspasenaktivität wurde auch die Aktivierung der Caspasen untersucht. Caspasen liegen in der Zelle als inaktive Proenzyme (Zymogene) vor, aus denen nach apoptotischem Stimulus durch proteolytische Spaltung enzymatisch aktive Fragmente erzeugt werden (Molineaux, Casano et al. 1993). Die dabei entstehenden Neoepitope der Caspase-Fragmente konnten in einer Immunoblot-Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 14D) und somit die Ergebnisse des Caspase-3-Enzymaktivitätstest bestätigen. Während aktive Caspase-3-Spaltprodukte in JNK2<sup>-/-</sup> MEFs bereits nach 8 Stunden MG-132-Behandlung detektiert werden konnten, wurden sie in JNK1<sup>+/-</sup> und JNK1<sup>-/-</sup> MEF-Zellen zu diesem Zeitpunkt nur in geringem Maße oder gar nicht beobachtet. So traten die Fragmente in beiden letztgenannten Zelllinien erst deutlich verzögert nach 16 Stunden MG-132-Stimulation auf. Wie die ausbleibende Caspase-3-Aktivierung im Enzymaktivitätstest bereits vermuten ließ, wurde bei Vorbehandlung mit Cycloheximid (Chx) wiederum das Auftreten von Caspase-3-Spaltprodukten vollständig in allen drei MEF-Linien verhindert.

Die proteasomale Inhibition führt folglich zu einer frühen JNK1-abhängigen Caspase-3-Aktivierung.

### 3.3 Die Apoptose-Sensitivität von JNK2<sup>-/-</sup> MEF ist spezifisch gegenüber proteasomaler Inhibition

Die Zelltodinduktion der untersuchten MEF-Zellen nach Behandlung mit MG-132 beruht möglicherweise nicht ausschließlich auf der Hemmung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms, da auch die Inhibition weiterer Proteasen wie Calpaine und lysosomaler Cathepsine beschrieben worden ist (Lee and Goldberg 1998). Folglich wurde die Sensitivität der MEF-Linien gegenüber anderen proteasomalen Inhibitoren untersucht. Hierzu zählen das Peptidaldehyd ALLN (mit dem irreführenden Namen Calpain-Inhibitor I), der zyklische Hydroxycarboxylsäureester clasto-Lactacystin  $\beta$ -Lacton und das in der Krebstherapie eingesetzte Peptidboronat Bortezomib (Velcade™). Als Kontrolle diente ALLM (Calpain-Inhibitor II), das als spezifischer Calpain-Inhibitor mit geringer hemmender Wirkung auf das Proteasom bekannt ist (Rock, Gramm et al. 1994).



**Abb. 15 Zelltodanalyse nach Behandlung mit verschiedenen proteasomalen Inhibitoren**

Die drei angegebenen MEF-Zelllinien wurden für 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von (A) Calpain-Inhibitor I (ALLN), (B) Calpain-Inhibitor II (ALLM), (C) Bortezomib und (D) clasto-Lactacystin  $\beta$ -Lacton inkubiert und die Zelltodrate durchflusszytometrisch über die Messung der Zellmembranintegrität mittels PI-Aufnahme quantifiziert. Die Liniendiagramme zeigen den Anteil PI-positiver Zellen in % als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n=3.

Nach Inkubation mit den spezifischen proteasomalen Inhibitoren – Bortezomib, clasto-Lactacystin  $\beta$ -Lacton und Calpain-Inhibitor I – konnte lediglich in JNK2<sup>-/-</sup> MEFs eine starke konzentrationsabhängige Zelltodinduktion festgestellt werden (Abb. 15A, C, D). Im Gegensatz dazu löste diese Behandlung in den JNK1<sup>+/-</sup> bzw. JNK1<sup>-/-</sup> MEFs nur in geringem bzw. sehr geringem Maße Apoptose aus. Erwartungsgemäß induzierte der schwache Proteasom-Inhibitor Calpain-Inhibitor II keinen Zelltod in den drei MEF-Linien (Abb. 15B). Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass die beobachtete starke Apoptoseinduktion in den JNK2<sup>-/-</sup> MEFs nach Inkubation mit den vier verschiedenen pharmakologischen Inhibitoren in der Tat ausschließlich auf der Hemmung des Proteasoms beruht.

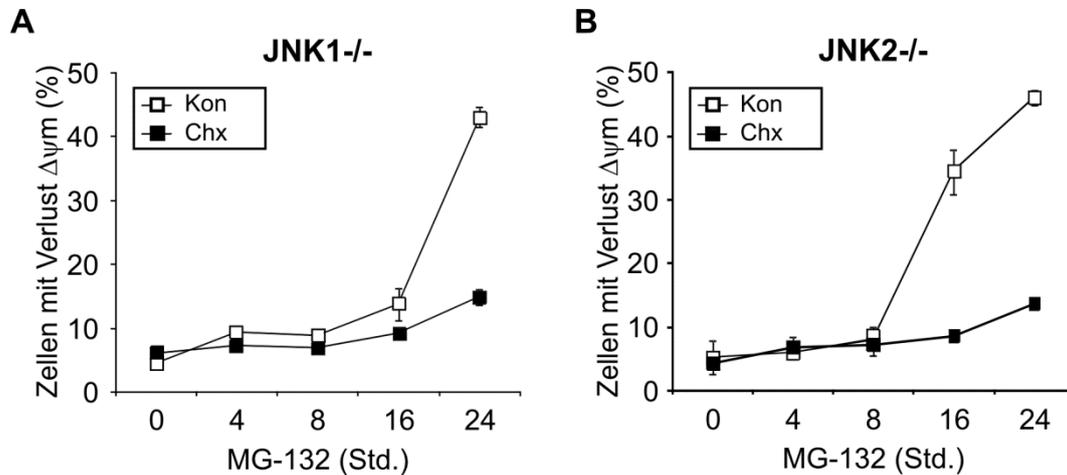
Außerdem wurde in Übereinstimmung mit den oben genannten Ergebnissen (Abb. 13, 14) wiederum durch Koinkubation mit Cycloheximid die Zelltodinduktion in allen untersuchten MEF-Linien vollständig verhindert (Daten nicht gezeigt). Die Notwendigkeit der Proteinexpression für JNK1-abhängige Apoptose nach proteasomaler Inhibition ist somit abermals bestätigt worden.

### **3.4 Proteasomale Inhibition führt zu einem beschleunigten Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials in JNK2<sup>-/-</sup> MEFs**

Proteasomale Inhibitoren lösen über die Aktivierung von JNK den intrinsischen Apoptose-Signalweg aus (Roccaro, Hideshima et al. 2006). Die zentralen Ereignisse sind hierbei die Freisetzung von Cytochrom c sowie die nachfolgende Aktivierung des Apoptosoms und der Caspasenkaskade (Martinou and Youle 2011). Der damit einhergehende Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials ( $\Delta\Psi_m$ ) zeitgleich mit der Bildung von Cytochrom c-freisetzenden Poren in der äußeren Mitochondrienmembran stellt ein weiteres typisches Apoptosemerkmal dar (Ly, Grubb et al. 2003). Dieses Ereignis wurde in einer durchflusszytometrischen Messung mit dem Potenzial-abhängigen Farbstoff Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) nach MG-132-Behandlung von JNK1<sup>-/-</sup> und JNK2<sup>-/-</sup> MEF analysiert (Abb. 16) (Galluzzi, Zamzami et al. 2007). In Übereinstimmung mit den oben gezeigten Daten wiesen die JNK2<sup>-/-</sup> MEFs bereits nach 16 Stunden Behandlung einen markanten Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials auf, während dies in JNK1<sup>-/-</sup> Zellen deutlich zeitverzögert erst nach 24 Stunden eintrat. Des Weiteren konnte in den beiden untersuchten MEF-Linien kein TMRE-Verlust nach Behandlung mit MG-132 und Cycloheximid festgestellt werden

(Abb. 16), wodurch erneut die Abhängigkeit MG-132-induzierter Apoptose von *de novo* Proteinsynthese gezeigt wurde.

Demnach findet in JNK2<sup>-/-</sup> MEF im Vergleich zu JNK1<sup>-/-</sup> MEFs ein beschleunigter Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials nach proteasomaler Inhibition statt.



**Abb. 16 Analyse des MG-132-abhängigen Verlusts des mitochondrialen Membranpotenzials**

(A) JNK1<sup>-/-</sup> und (B) JNK2<sup>-/-</sup> MEF-Zellen wurden mit MG-132 (10 μM) in Ab- oder Anwesenheit von Cycloheximid (Chx, 10 μg/ml) für die Dauer der angegebenen Zeiträume inkubiert und durchflusszytometrisch der Anteil der Zellen, die einen Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials ( $\Delta\Psi_m$  in %) aufweisen mittels einer Tetramethylrhodaminethylester (TMRE)-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. (n=2, Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung)

### 3.5 MG-132 löst in Abhängigkeit von JNK1 die Akkumulation von Noxa aus

Die Inhibition des Proteasoms induziert Apoptose über Auslösung des intrinsischen Signalweges, welcher über das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Familienproteinen kontrolliert wird (Ola, Nawaz et al. 2011). Die Regulation einiger dieser Proteine erfolgt durch transkriptionelle Prozesse (z. B. über p53-abhängige Induktion der Puma-Expression nach  $\gamma$ -Bestrahlung) oder posttranslationale Modifikationen (z. B. die Phosphorylierung von Bim durch verschiedene Kinasen) (Nakano and Vousden 2001; Lei and Davis 2003; Hubner, Barrett et al. 2008; Shamas-Din, Brahmhatt et al. 2010). Eine Expressionsanalyse der Bcl-2-Familienproteine erfolgte in den drei MEF-Linien nach MG-132-Behandlung mittels Western Blot (Abb. 17A) und zeigte, dass die Menge der pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine Bax und Bak in allen drei untersuchten MEF-Linien unabhängig von der Behandlung mit MG-132 und Cycloheximid unverändert blieb. Auch bei den anti-apoptotischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> ließ sich keine veränderte Expression durch MG-132 feststellen. Interessanterweise korrelierte die Anzahl der JNK1-Allele mit der Expression von Noxa. So konnte in JNK2<sup>-/-</sup> MEFs in Analogie zu deren erhöhter MG-132-Sensitivität bereits

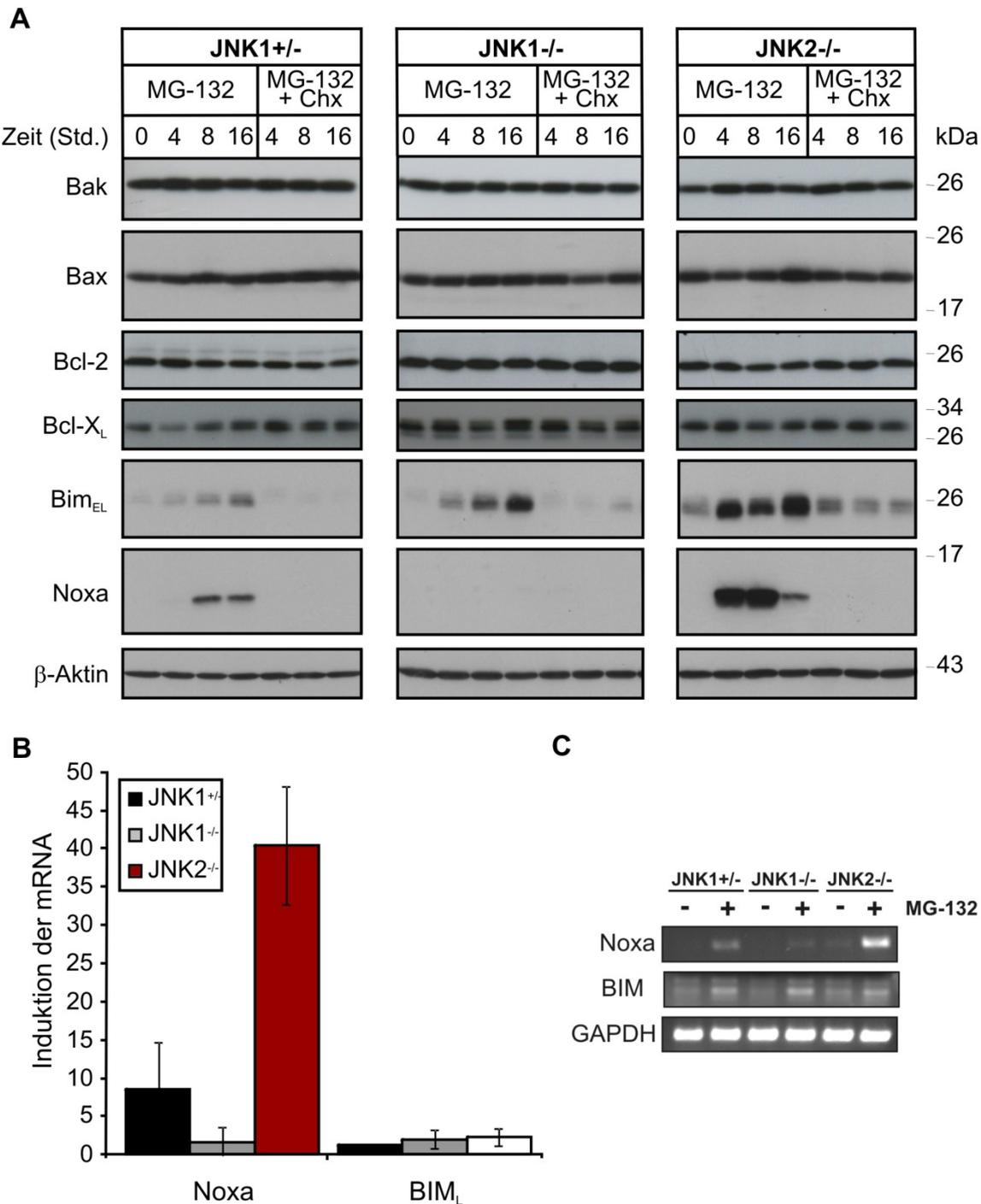
nach vier Stunden eine maximale Noxa-Expression beobachtet werden, während JNK1<sup>+/-</sup> bzw. JNK1<sup>-/-</sup> MEF erst nach achtstündiger Inkubation mit MG-132 eine weitaus schwächere bzw. keine Noxa-Induktion zeigten. Im Gegensatz hierzu wurde für die Bim-Expression keine Korrelation mit dem JNK1-Genotyp festgestellt, da der geringste Anstieg des Bim-Levels in den JNK1<sup>+/-</sup> MEFs stattfand. Da darüber hinaus Cycloheximid die MG-132-induzierte Noxa-Expression vollständig inhibierte, die Expression von Bim aber nur auf Kontrollniveau reprimierte, implizieren diese Daten, dass Noxa, aber nicht Bim, als Vermittler JNK1-abhängiger Apoptose nach MG-132-Stimulation fungiert.

Die beobachtete Erhöhung der Proteinmengen von Bim und Noxa kann auf verstärkter Genexpression oder auf eine Verhinderung des Proteinabbaus beruhen. Um diesen Sachverhalt näher zu analysieren, wurden die drei Zelllinien mit MG-132 inkubiert und die Induktion von Noxa- und Bim-mRNA mittels semi-quantitativer PCR bestimmt (Abb. 17B). Besonders markant war hierbei die JNK1-abhängige Hochregulierung der Noxa-mRNA, die mit einer 40-fachen Induktion insbesondere in den JNK2<sup>-/-</sup> Zellen zu beobachten war. Dieser Effekt war in den JNK1<sup>+/-</sup> MEFs in Anwesenheit nur eines *JNK1*-Allels mit einer achtfachen Verstärkung der mRNA-Menge deutlich schwächer ausgeprägt. In starkem Gegensatz hierzu war bei Verlust beider *JNK1*-Allele die transkriptionelle zweifache Induktion von Noxa-mRNA in JNK1<sup>-/-</sup> MEFs sehr gering. Insgesamt korrelierte die unterschiedliche mRNA-Induktion von Noxa nach MG-132-Behandlung in den untersuchten MEF-Linien mit der Noxa-Proteinmenge. Zusammen mit der Beobachtung einer transkriptionsabhängigen Akkumulation von Noxa kann bei Hemmung des Proteasoms auf eine starke Regulierung dieses *BH3-only* Proteins durch JNK1-abhängige Genexpression in den MEF-Linien geschlossen werden.

Im Gegensatz hierzu wurde eine geringe (1,3- bis 2,3-fache) mRNA-Induktion von Bim nach MG-132-Inkubation festgestellt, die in den JNK1<sup>-/-</sup> und JNK2<sup>-/-</sup> MEFs in gleichem Maße stattfand, jedoch in den JNK1<sup>+/-</sup> Zellen leicht reduziert war. Folglich akkumulierte Bim trotz der geringen transkriptionellen Hochregulierung seiner mRNA in Abhängigkeit der Behandlungsdauer mit MG-132. Hieraus ist zu schließen, dass die Bim-Akkumulation überwiegend auf verringerten Abbau bei Hemmung des Proteasoms zurückzuführen ist.

Demnach wurde von den untersuchten Bcl-2 Familienproteinen lediglich für das proapoptische *BH3-only* Protein Noxa die starke transkriptionelle Hochregulierung nach proteasomaler Inhibition festgestellt. Die vorliegenden Daten implizieren eine JNK1-

abhängige Noxa-Induktion, welche aus diesem Grund in den MG-132-sensitiven JNK1-profizienten JNK2<sup>-/-</sup> MEFs besonders ausgeprägt ist.

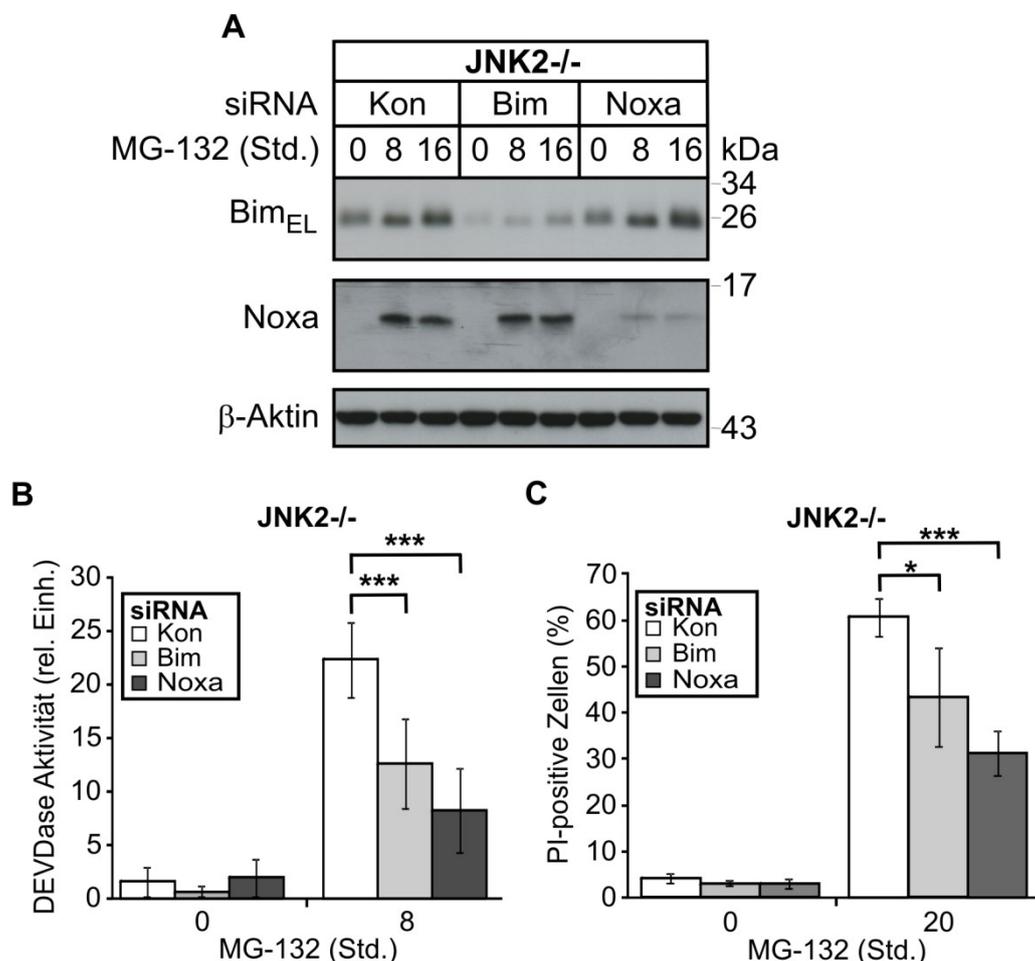


**Abb. 17 Expression von Bcl-2 Familienproteinen nach MG-132-Behandlung**

(A) Die drei angegebenen MEF-Linien wurden mit MG-132 (10  $\mu$ M) in An- oder Abwesenheit von Cycloheximid (Chx, 10  $\mu$ g/ml) für die Dauer der angegebenen Zeiträume inkubiert. Anschließend wurden Gesamtzelllysate hergestellt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf die Expression der bezeichneten Proteine untersucht.  $\beta$ -Aktin diene als Ladekontrolle. Die gezeigten Western Blots sind repräsentativ für drei durchgeführte Experimente. (B) Nach vierstündiger Inkubation mit MG-132 (10  $\mu$ M) wurde in den drei MEF-Linien mittels semi-quantitativer PCR die Induktion der Bim- und Noxa-mRNA im Vergleich zu Kontroll-Zellen bestimmt. Zur Normalisierung diente GAPDH-mRNA. Das Balkendiagramm zeigt die Induktion der mRNA im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (n=3, Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung). Das Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Dennis Sohn durchgeführt. (C) Das Bild zeigt ein repräsentatives Agarosebild zu B.

### 3.6 Noxa wird für MG-132-induzierte Apoptose in JNK2<sup>-/-</sup> MEF benötigt

Um den funktionalen Einfluss von Bim oder Noxa für die Apoptoseinduktion nach proteasomaler Inhibition durch MG-132 zu überprüfen, wurde ein siRNA-vermittelter *Knockdown* der beiden *BH3-only* Proteine in JNK2<sup>-/-</sup> MEF durchgeführt. Während die Effizienz dieser *Knockdowns* mittels Immunoblot-Analysen auf Proteinebene überprüft wurde (Abb. 18A), wurde deren Einfluss auf die Apoptoseinduktion sowohl fluorometrisch im Caspase-3-Aktivitätstest (Abb. 18B) als auch durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 18C). Als Kontrolle diente die Transfektion von unspezifischer siRNA (Kontrolle), welche keine bekannten Zielsequenzen im Mausgenom besitzt.



**Abb. 18 Einfluss einer siRNA-vermittelten Bim- und Noxa-Suppression auf die MG-132-induzierte Apoptose von JNK2<sup>-/-</sup> MEFs**

(A) JNK2<sup>-/-</sup> MEFs wurden mit siRNAs gegen Bim oder Noxa bzw. unspezifischer Kontroll-siRNA (Kon) transfiziert und nach 72 Stunden für die Dauer der angegebenen Zeiträume mit MG-132 (10  $\mu$ M) inkubiert. Mittels Immunoblot-Analysen wurde die Proteinlevel von Bim und Noxa bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Western Blots aus fünf unabhängigen Experimenten.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Bim<sub>EL</sub> = Bim<sub>ExtraLong</sub>. (B) JNK2<sup>-/-</sup> MEFs wurden behandelt wie in A beschrieben und anschließend im Fluoreszenz-basierten Enzymtest auf Caspase-3-Aktivitäten (n=5, Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung) bzw. (C) durchflusszytometrisch auf Zellmembranintegritätsverlust mittels PI-Aufnahme (n=4, Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung) analysiert. Das Balkendiagramm in B zeigt die Caspase-3-Aktivität in relativen Einheiten, während das Balkendiagramm in C den Anteil PI-positiver Zellen in % darstellt. Die Werte wurden mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Gleichverteilung und mittels des einseitigen Student'schen t-Test auf Signifikanz untersucht. \* p<0,05; \*\*\* p<0,005

Der *Knockdown* von Bim war erfolgreich, wie die deutliche Reduktion der Proteinmenge im Vergleich zu Kontroll-Zellen zeigt. Die durchflusszytometrische Messung der Zelltodrate wies nach 20-stündiger MG-132-Stimulation eine Reduktion des Anteils PI-positiver Zellen durch Bim-*Knockdown* um ca. 30% im Vergleich zur Kontrolle auf. Dieser Effekt war im Caspase-3-Aktivitätstest noch stärker ausgeprägt, da hier durch den Bim-*Knockdown* eine Halbierung der MG-132-induzierten DEVDase-Aktivität erreicht wurde. Diese Daten verdeutlichen, dass Bim eine signifikante pro-apoptotische Rolle bei MG-132-induzierter Apoptose in JNK2<sup>-/-</sup> MEF spielt.

Auch die Transfektion mit der Noxa-siRNA führte zu einem dramatischen Verlust der Noxa-Proteinexpression (Abb. 18A). Die Bestimmung der DEVDase-Aktivität und der Zelltodrate zeigen, dass die Reduktion von Noxa die JNK2<sup>-/-</sup> Zellen wesentlich effizienter vor Apoptose schützte als der *Knockdown* von Bim (Abb. 18B, C). So war hier die Zelltodrate nach siRNA-vermittelter Reduktion von Noxa im Vergleich zur Kontrolle nach MG-132-Stimulation signifikant um die Hälfte reduziert, während die Caspase-3-Aktivität sogar um 63% verringert wurde.

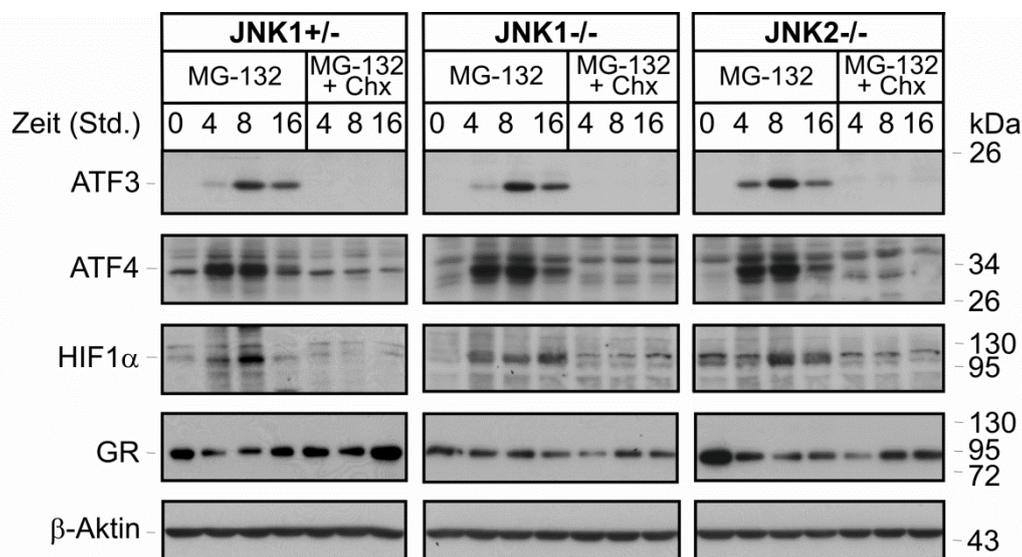
Mit Hilfe siRNA-vermittelter Proteinreduktion konnten demnach Bim und Noxa als Effektorproteine des MG-132-induzierten Zelltodes in JNK2<sup>-/-</sup> MEF identifiziert werden, allerdings scheint die JNK1-abhängige Induktion von Noxa hierbei die entscheidende Komponente darzustellen.

### **3.7 Einfluss von MG-132 auf die Noxa-regulierenden Transkriptionsfaktoren ATF3, ATF4, HIF1 $\alpha$ und den Glucocorticoidrezeptor (GR)**

Das *BH3-only* Protein Noxa reguliert in JNK2<sup>-/-</sup> MEF in entscheidendem Maße Apoptose nach proteasomaler Inhibition, indem es JNK1-abhängig exprimiert wird (s. Abschnitte 3.5 und 3.6). Es ist jedoch unbekannt, welcher Transkriptionsfaktor Noxa nach Hemmung des Proteasoms JNK1-abhängig reguliert. Mit Hilfe der Genomatix Software Suite ([www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)) ließen sich 85 Proteine identifizieren, die mit der Transkription des murinen Noxa-Gens *PMAIP1* assoziiert sind. Hierzu gehören die Transkriptionsfaktoren ATF3, ATF4, HIF1 $\alpha$  und der Glucocorticoidrezeptor (GR), die allesamt durch proteasomale Aktivität reguliert werden und Ziele des JNK-Signalweges sind (Hai, Wolfgang et al. 1999; Wallace and Cidlowski 2001; Deroo, Rentsch et al. 2002; Comerford, Cummins et al. 2004; Bogoyevitch and Kobe 2006; Shringarpure, Catley et al. 2006; Veschini, Belloni et al. 2007; Weidemann and Johnson 2008; Matsuguchi, Chiba et

al. 2009) Zunächst wurde die Expression dieser Proteine in den drei MEF-Linien nach MG-132-Inkubation in An- oder Abwesenheit von Cycloheximid im Western Blot analysiert (Abb. 19). Es konnte in allen drei untersuchten MEF-Linien eine zeitabhängige Akkumulation von ATF3, ATF4 und HIF1 $\alpha$  nach proteasomaler Inhibition beobachtet werden, die durch Cycloheximid verhindert wurde. Zwischen den drei MEF-Linien konnten nur marginale Differenzen in der Expressionsstärke der einzelnen Proteine festgestellt werden. Aus unbekanntem Gründen reduzierte sich die Proteinmenge des Glucocorticoidrezeptors nach MG-132-Stimulation zeitabhängig.

Demnach ergeben sich anhand des Expressionsmusters der vier Transkriptionsfaktoren keine Hinweise auf ihre differenzielle Regulation in den drei untersuchten MEF-Linien.

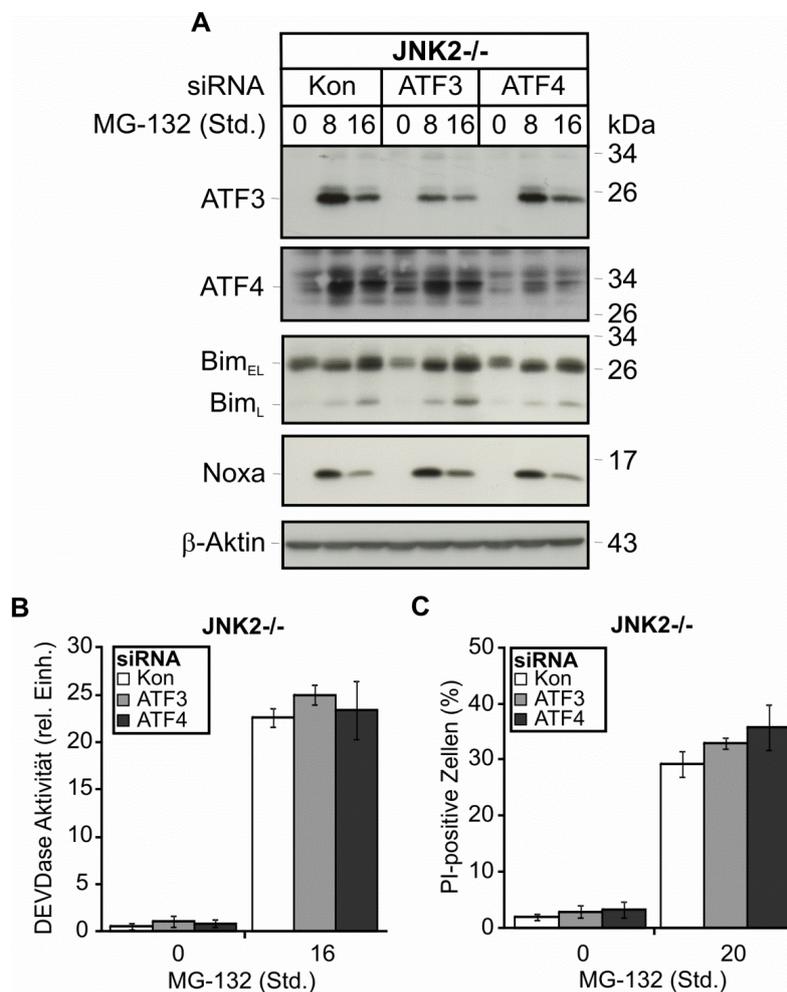


**Abb. 19 Expression von Noxa-regulierenden Transkriptionsfaktoren nach MG-132-Behandlung**  
JNK1<sup>+/-</sup>, JNK1<sup>-/-</sup> und JNK2<sup>-/-</sup> MEFs wurden mit MG-132 (10  $\mu$ M) in An- oder Abwesenheit von Cycloheximid (Chx, 10  $\mu$ g/ml) für die Dauer der angegebenen Zeiträume inkubiert. In Gesamtzelllysaten wurde mittels Western Blot die Expression der bezeichneten Proteine analysiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Die gezeigten Western Blots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

### 3.8 Die Transkriptionsfaktoren ATF3 und ATF4 nehmen weder Einfluss auf die MG-132-induzierte Apoptose noch auf die damit einhergehende Induktion von Noxa und Bim

*Activating Transcription Factor* (ATF) 3 und 4 gehören zur Gruppe der *basic Region Leucin Zipper* (bZIP) Transkriptionsfaktoren, die nach Stress-Signalen aktiviert werden und dazu in der Lage sind, Transkription sowohl zu induzieren als auch zu reprimieren (Hai and Hartman 2001). Hierzu bilden sie mit anderen bZIP-Familienproteinen wie AP-1-, C/EBP- oder Maf-Mitgliedern Heterodimere (Thompson, Xu et al. 2009). Zu den Signalen, die ATF3 und ATF4 aktivieren, gehören neben vielen anderen auch der JNK-

Signalweg und proteasomale Inhibition (Hai, Wolfgang et al. 1999; Zimmermann, Erdmann et al. 2000; Hai and Hartman 2001; Lassot, Segeral et al. 2001). Interessanterweise wurde neben einer überlebensfördernden Rolle auch eine proapoptotische Funktion von ATF3 und ATF4 identifiziert, da beide Transkriptionsfaktoren Apoptose über Noxa-Expression etwa nach Endoplasmatischem Retikulum-Stress (ER-Stress) bei Stimulation mit BH3-Mimetics, Bortezomib oder dem ER-assoziierten Proteindegradation (ERAD)-Inhibitor Eeyarestatin I (EerI) auslösen (Armstrong, Flockhart et al. 2009; Wang, Mora-Jensen et al. 2009; Albershardt, Salerni et al. 2011).



**Abb. 20 Keine Beeinträchtigung des MG-132-induzierten Zelltodes oder der Expression von Bim und Noxa durch den Knockdown von ATF3 oder ATF4 in JNK2<sup>-/-</sup> MEFs**

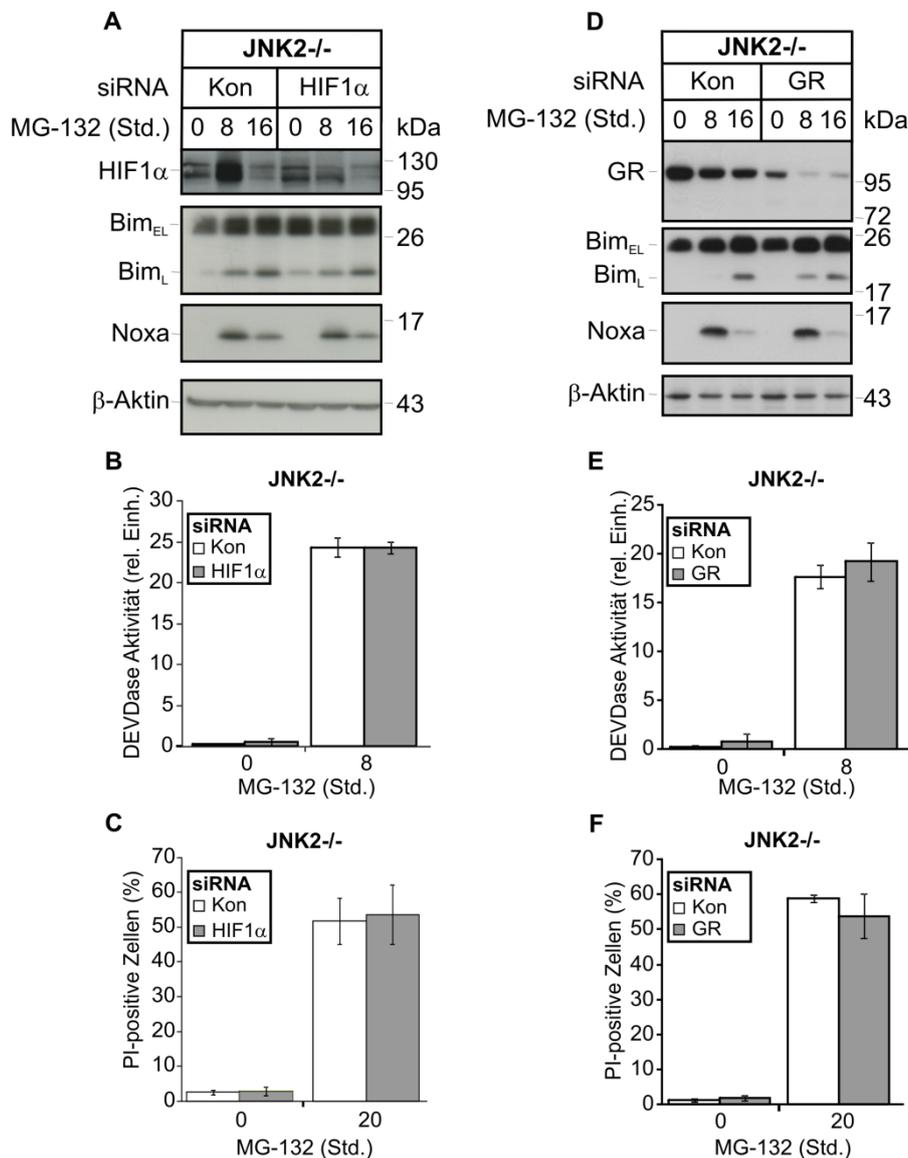
(A) JNK2<sup>-/-</sup> MEF wurden mit unspezifischer Kontroll-siRNA (Kon) oder mit siRNAs gegen ATF3 oder ATF4 transfiziert und nach 72 Stunden für die Dauer der angegebenen Zeiträume mit MG-132 (10 μM) inkubiert. Mittels Immunoblot-Analysen wurden die Proteinlevel der bezeichneten Proteine bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Western Blots aus drei unabhängigen Experimenten. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Bim<sub>EL</sub>=Bim<sub>ExtraLong</sub>, Bim<sub>L</sub>=Bim<sub>Long</sub>. (B) JNK2<sup>-/-</sup> MEFs wurden behandelt wie in A beschreiben und anschließend in einem fluorometrischen Enzymtest auf Caspase-3-Aktivitäten (n=3, Mittelwerte ± Standardabweichung) bzw. (C) durchflusszytometrisch auf Zellmembranintegritätsverlust mittels PI-Aufnahme untersucht (n=3, Mittelwerte ± Standardabweichung.). Das Balkendiagramm in B zeigt die Caspase-3-Aktivität in relativen Einheiten, während das Balkendiagramm in C den Anteil PI-positiver Zellen in % darstellt.

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit ein regulierender Einfluss beider Transkriptionsfaktoren auf die MG-132-induzierte Apoptose sowie Bim- und Noxa-Expression in JNK2<sup>-/-</sup> MEFs mittels siRNA-vermittelter Reduktion untersucht (Abb. 20). In der nachfolgenden Analyse der Proteinmenge mittels Western Blot war zwar ein deutlicher RNAi-vermittelter *Knockdown* sowohl von ATF3 als auch ATF4 festzustellen (Abb. 20A), dennoch fand im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen hierdurch keine Modulation der MG-132-induzierten Zelltodrate oder der enzymatischen Caspasenaktivität statt (Abb. 20B, C). Ebenso blieb die MG-132-vermittelte Akkumulation von Bim bzw. Noxa nach *Knockdown* von ATF3 oder ATF4 unverändert. Es ergeben sich somit aus den vorliegenden siRNA-Daten keine Hinweise auf eine regulatorische Rolle von ATF3 und ATF4 bei MG-132-induziertem Zelltod in JNK2-defizienten MEFs.

### **3.9 Die *Knockdowns* von HIF1 $\alpha$ oder des Glucocorticoidrezeptors (GR) nehmen in JNK2<sup>-/-</sup> MEFs weder Einfluss auf MG-132-induzierte Apoptose noch auf die damit auftretende Induktion von Bim und Noxa**

Es ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor *Hypoxia-inducible Factor 1  $\alpha$*  (HIF1 $\alpha$ ) nicht nur bei Sauerstoffmangel (Hypoxie), sondern auch nach proteasomaler Inhibition unter normoxischen Bedingungen aktiviert wird (Veschini, Belloni et al. 2007; Weidemann and Johnson 2008). Obwohl HIF1 $\alpha$  als Förderer von Angiogenese einen Überlebensvorteil von Tumoren darstellt, kann es auch Apoptose durch Noxa-Expression bei Sauerstoffmangel oder UV-Bestrahlung einleiten (Kim, Ahn et al. 2004; Nys, Van Laethem et al. 2010). Erste Studien mit Inhibitoren konnten zeigen, dass HIF1 $\alpha$ -vermittelte Genexpression der Regulation durch den JNK-Signalweg unterliegt (Comerford, Cummins et al. 2004; Yun, Lee et al. 2009; Shin, Choi et al. 2010). Auch der nukleäre Glucocorticoidrezeptor (GR) stellt ein bekanntes JNK-Substrat dar und ist als Transkriptionsfaktor von Bim und Noxa beschrieben (Rogatsky, Logan et al. 1998; Itoh, Adachi et al. 2002; Wang, Malone et al. 2003; Abrams, Robertson et al. 2004; Lynch, Rajendran et al. 2010). Interessanterweise wird Dexamethason, ein GR-Agonist, in kombinatorischer Krebstherapie des Multiplen Myeloms mit Bortezomib (Velcade<sup>TM</sup>) zur Verstärkung des Zelltodes eingesetzt (Moehler and Goldschmidt 2011). Zusammen mit dem Ergebnis der oben genannten Genomatix-Analyse liegen Hinweise vor, dass HIF1 $\alpha$  oder GR die Transkription von Noxa oder Bim nach proteasomaler Inhibition

induzieren können. Zur weiteren Untersuchung dieses Sachverhalts wurde ein siRNA-vermittelter *Knockdown* von HIF1 $\alpha$  bzw. GR durchgeführt und ihre Effizienz mittels Immunoblot auf Proteinebene bestätigt (Abb. 21 A, D). Anschließend wurde die MG-132-induzierte Apoptose durch durchflusszytometrische Messung der Zellmembranintegrität und Bestimmung der enzymatischen Caspasenaktivität nach proteasomaler Inhibition bestimmt (Abb. 21 B, C, E, F).



**Abb. 21 Kein Einfluss einer siRNA-vermittelten HIF1 $\alpha$ - oder GR-Suppression auf die MG-132-induzierte Apoptose bzw. Bim- oder Noxa-Expression in JNK2<sup>-/-</sup> MEFs**

(A, D) JNK2<sup>-/-</sup> MEF wurden mit unspezifischer Kontroll-siRNA (Kon) oder mit siRNAs gegen HIF1 $\alpha$  oder GR transfiziert und nach 72 Stunden für die Dauer der angegebenen Zeiträume mit MG-132 (10  $\mu$ M) inkubiert. Mittels Immunoblot-Analysen wurden die Proteinlevel der bezeichneten Proteine bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Western Blots aus drei unabhängigen Experimenten.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Bim<sub>EL</sub>=Bim<sub>ExtraLong</sub>, Bim<sub>L</sub>=Bim<sub>Long</sub>. (B, E) JNK2<sup>-/-</sup> MEFs wurden behandelt wie in A und D beschreiben und anschließend in einem fluorometrischen Enzymtest auf Caspase-3-Aktivitäten (n=3, Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung) bzw. (C, F) durchflusszytometrisch auf Zellmembranintegritätsverlust mittels PI-Aufnahme untersucht (n=3, Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung). Die Balkendiagramme in B und E stellen die Caspase-3-Aktivität in relativen Einheiten dar, während die Balkendiagramme in C und F den Anteil PI-positiver Zellen in % zeigen.

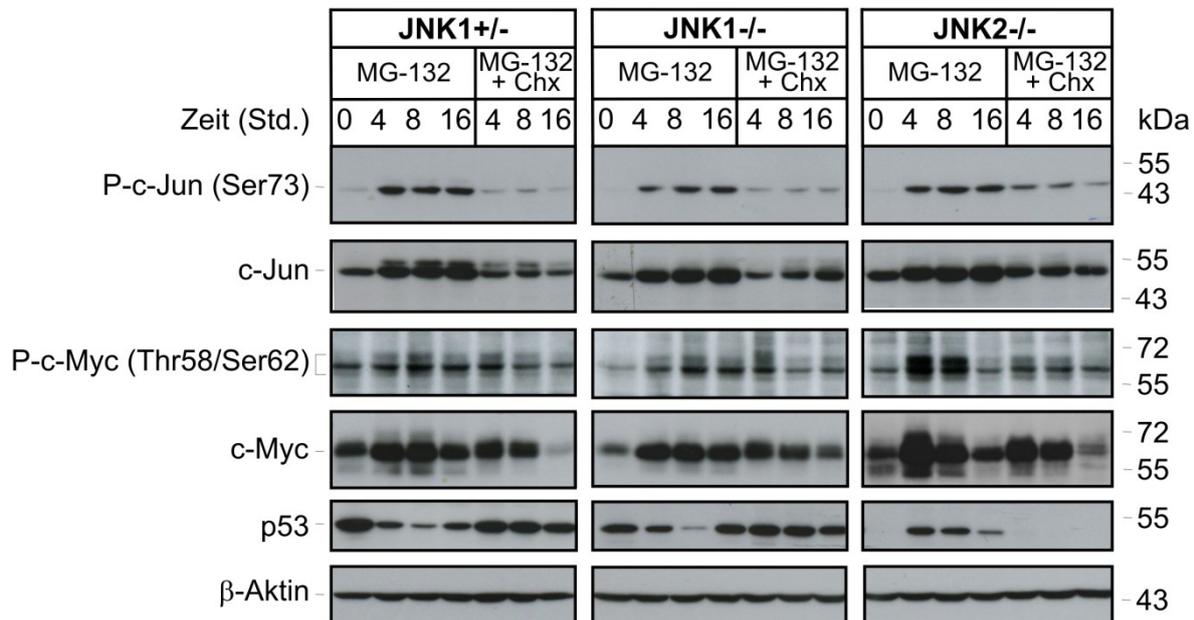
Trotz des erfolgreichen *Knockdowns* von sowohl HIF1 $\alpha$  als auch GR fand keine Modulation MG-132-induzierten Zelltodes im Vergleich zu Kontrollzellen statt und ebenso blieben die Expression von Bim und Noxa unverändert.

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass weder HIF1 $\alpha$  noch der Glucocorticoidrezeptor an der MG-132-induzierten Apoptose noch der damit einhergehende Noxa- und Bim-Expression beteiligt sind.

### **3.10 Einfluss von MG-132 auf die Noxa-regulierenden Transkriptionsfaktoren c-Jun, c-Myc und p53**

Aus den bisherigen Daten ergaben sich keine Hinweise auf eine MG-132-vermittelte Expression von Noxa unter der Kontrolle von ATF3, ATF4, HIF1 $\alpha$  oder GR. Als nächstes wurden c-Jun, p53 und c-Myc untersucht, da sie ebenfalls als mögliche Noxa-regulierende Transkriptionsfaktoren von der Genomatix Software Suite aufgeführt wurden. Zunächst wurde die Aktivierung dieser Proteine in den drei MEF-Linien nach MG-132-Inkubation in An- oder Abwesenheit von Cycloheximid im Western Blot analysiert (Abb. 22). Es konnte in allen drei untersuchten MEF-Linien eine gleichmäßige, zeitabhängige Akkumulation von c-Jun und c-Myc nach proteasomaler Inhibition beobachtet werden, die durch Cycloheximid verhindert wurde. Entgegen den Erwartungen akkumulierte p53 nur in MG-132-behandelten JNK2 $^{-/-}$  MEFs, nicht aber in JNK1 $^{+/-}$  und JNK1 $^{-/-}$  MEFs, in denen bereits in Abwesenheit des proteasomalen Inhibitors maximale Proteinmengen dieses Transkriptionsfaktors vorlagen. Dies deutet darauf hin, dass nur JNK2 $^{-/-}$  MEFs ein p53-Wildtypprotein exprimieren, während es in den beiden anderen Zelllinien in mutierter Form vorliegt (Blagosklonny 2000). Unterstützend hierzu zeigte sich auch, dass MG-132 die Expression des p53-Zielgens p21 nur in JNK2 $^{-/-}$  Zellen, nicht aber in JNK1 $^{+/-}$  oder JNK1 $^{-/-}$  MEFs verstärkt induzierte (Daten nicht gezeigt)(el-Deiry, Tokino et al. 1993). Somit wäre p53 ein möglicher Kandidat für die beobachtete MG-132-induzierte Noxa-Expression in JNK2 $^{-/-}$  MEFs. Eine Rolle des Transkriptionsfaktors c-Jun hingegen konnte in diesem Zusammenhang ausgeschlossen werden, da dessen JNK-vermittelte Phosphorylierung an Serin 73 nach MG-132-Behandlung in allen drei untersuchten Zelllinien in vergleichbarer Stärke festzustellen war (Pulverer, Kyriakis et al. 1991). Dahingegen war nur in JNK2 $^{-/-}$  MEFs eine besonders starke, aktivierende Phosphorylierung von c-Myc an Threonin 58 und der JNK-spezifischen Stelle Serin 62 zu beobachten (Noguchi, Kitanaka et al. 1999). Neben p53

weisen diese Ergebnisse auch auf c-Myc als entscheidenden Transkriptionsfaktor für die JNK1-abhängige Regulation von Noxa hin.



**Abb. 22 Akkumulation und Phosphorylierung von Noxa-regulierenden Transkriptionsfaktoren nach MG-132-Behandlung**

JNK1<sup>+/-</sup>, JNK1<sup>-/-</sup> und JNK2<sup>-/-</sup> MEF wurden mit MG-132 (10 µM) in An- oder Abwesenheit von Cycloheximid (Chx, 10 µg/ml) für die Dauer der angegebenen Zeiträume inkubiert. In Gesamtzelllysaten wurde mittels Western Blot die Expression der bezeichneten Proteine analysiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Gezeigt sind repräsentative Western Blots aus drei unabhängigen Experimenten.

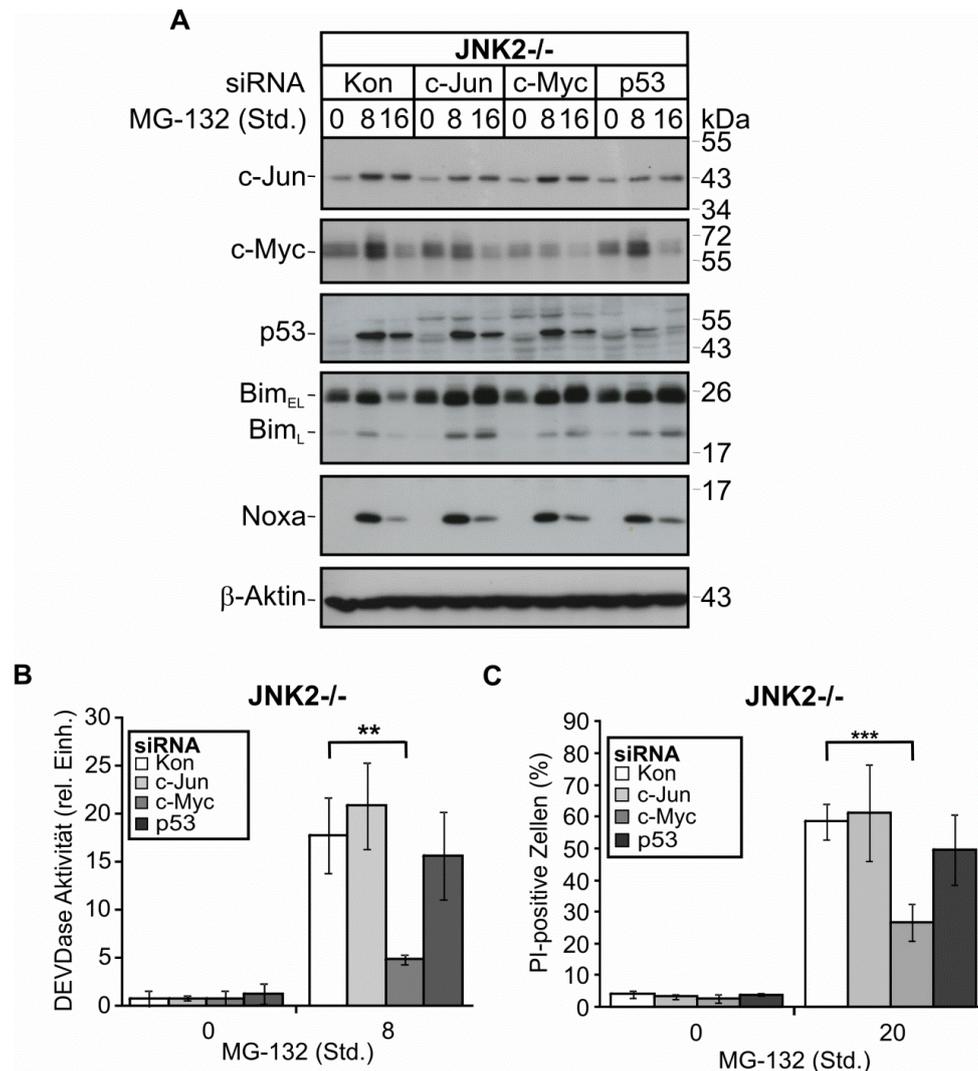
### 3.11 c-Myc, nicht p53 oder c-Jun, steuert die MG-132-induzierte Apoptose, nimmt aber keinen Einfluss auf die Expression von Bim oder Noxa

c-Jun ist ein Mitglied der AP-1 Proteinfamilie, welche als heterodimere Transkriptionsfaktoren Einfluss auf verschiedene zelluläre Prozesse, darunter auch Apoptose nehmen (Shaulian and Karin 2002; Hess, Angel et al. 2004). Hierbei unterliegen die Transkriptionsfaktoren einer intensiven posttranslationalen Kontrolle, welche ihr transkriptionales Potenzial erhöhen, und werden dabei auch von JNK phosphoryliert (Pulverer, Kyriakis et al. 1991). Die pro-apoptotische Rolle von c-Jun wird nach proteasomaler Inhibition durch die erhöhte Expression der Todesrezeptorliganden FasL und TNFα sowie des *BH3-only* Proteins Bim vermittelt (Hess, Angel et al. 2004; Lauricella, Emanuele et al. 2006). Der Transkriptionsfaktor p53 dagegen wird durch einen permanenten Abbau über das Proteasom reguliert und folglich nach Inhibition des Proteasoms stabilisiert und aktiviert (Haupt, Maya et al. 1997). Hierbei unterliegt er der Phosphorylierung von JNK an Serin 15, welche seine Stabilisierung und transkriptionelle Aktivität fördert (Shieh, Ikeda et al. 1997; Dumaz

and Meek 1999; Hideshima, Mitsiades et al. 2003). Unter diesen Bedingungen induziert p53 über Noxa-Expression Apoptose (Perez-Galan, Roue et al. 2006; Yu, Carroll et al. 2007). Das Proto-Onkogen c-Myc dagegen aktiviert eine große Gruppe von Genen als Teil eines heterodimeren Komplexes mit seinem Partnerprotein Max (Pelengaris, Khan et al. 2002). Einem ständigen Abbau unterlegen, besitzt das Protein nur eine kurze Halbwertszeit und wird durch proteasomale Inhibitoren nicht nur stabilisiert, sondern auch aktiviert und kann beispielsweise über die Induktion von Noxa Apoptose auslösen (Gregory and Hann 2000; Nikiforov, Riblett et al. 2007). Zur Aktivierung wird c-Myc neben anderen Kinasen auch durch JNK an Serin 62 und 71 phosphoryliert und dadurch sowohl stabilisiert als auch in seiner pro-apoptotischen transkriptionellen Aktivität gefördert (Noguchi, Kitanaka et al. 1999; Hann 2006).

Somit liegen Hinweise vor, dass c-Myc und p53 nach proteasomaler Inhibition JNK-abhängig aktiviert werden können, um durch Expression von Bim und/oder Noxa Apoptose zu induzieren. Zudem wurden ebenfalls weitere Analysen mit c-Jun, dem bedeutendsten JNK-Substrat, durchgeführt. Um den Einfluss dieser drei Transkriptionsfaktoren sowohl auf Apoptose-Induktion als auch auf Bim- oder Noxa-Regulation in JNK2<sup>-/-</sup> Zellen zu untersuchen, wurde ein siRNA-vermittelter *Knockdown* dieser Proteine durchgeführt. Anschließend wurde mittels Western Blot die Proteinmenge (Abb. 23A), die Caspase-3-Aktivität im enzymatischen Substrattest sowie die Zelltodrate mit Hilfe von PI-Aufnahme nach MG-132-Stimulation bestimmt (Abb. 23B, C). So ließ sich die Expression von c-Jun durch die siRNA zwar nur unvollständig supprimieren, dennoch hatte diese partielle Reduktion keinen Einfluss auf die MG-132-induzierte Apoptose und Caspase-3-Aktivität. Auch die Induktion der *BH3-only* Proteine Bim oder Noxa wurde durch die siRNA-vermittelte Verringerung von c-Jun nicht moduliert. Ein ähnliches Bild ergab sich nach erfolgreicher Reduktion von p53 in JNK2<sup>-/-</sup> MEF. Auch diese Maßnahme hatte weder einen Einfluss auf die MG-132-induzierte Apoptose, noch auf die damit einhergehende Hochregulation von Bim und Noxa. Eine signifikante Protektion vor MG-132-induzierter Apoptose wurde hingegen nach siRNA-vermittelter Reduktion von c-Myc beobachtet. So wurde hierbei der Anteil von PI-positiven Zellen nach 20 Stunden proteasomaler Inhibition halbiert und die Caspase-3-Aktivitätswerte sogar auf ein Drittel reduziert. Der protektive Effekt des c-Myc-*Knockdowns* auf MG-132-induzierten Zelltod in JNK2<sup>-/-</sup> MEF-Zellen ist somit in seiner Stärke mit dem schützenden Effekt durch den *Knockdown* von Noxa (s. Abschnitt 3.6) vergleichbar. Da c-Myc als

Transkriptionsfaktor von Noxa nach proteasomaler Inhibition in Melanomzellen beschrieben wurde und zudem eine JNK1-abhängige Aktivierung von c-Myc bekannt ist (Noguchi, Kitanaka et al. 1999; Nikiforov, Riblett et al. 2007), konnte über eine JNK1-c-Myc-Noxa-Signalkaskade spekuliert werden. Jedoch wurde diese in dem hier untersuchten System nicht bestätigt, da trotz des starken JNK1-abhängigen Effekts von c-Myc auf Apoptose keine veränderte Induktion von Bim oder Noxa nach MG-132-Behandlung festzustellen war.



**Abb. 23 Einfluss von c-Jun, c-Myc und p53 auf MG-132-induzierte Apoptose und Bim- und Noxa-Expression**

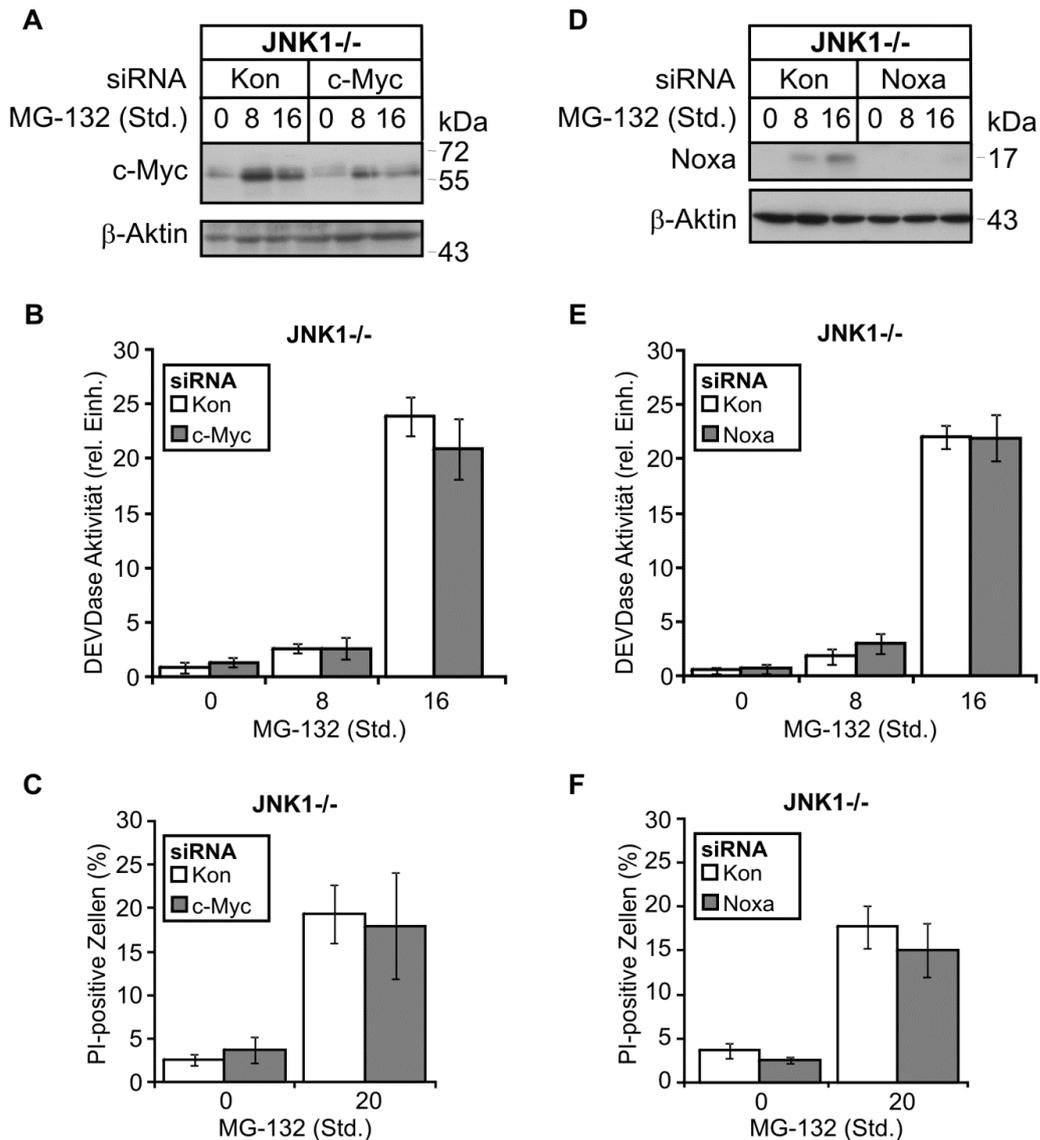
(A) JNK2<sup>-/-</sup> MEF wurden mit unspezifischer Kontroll-siRNA (Kon) oder mit siRNAs gegen c-Jun, c-Myc oder p53 transfiziert und nach 72 Stunden für die Dauer der angegebenen Zeiträume mit MG-132 (10 μM) inkubiert. Mittels Immunoblot-Analysen wurden die Proteinlevel der bezeichneten Proteine bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Western Blots aus drei bis sechs unabhängigen Experimenten. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Bim<sub>EL</sub>=Bim<sub>ExtraLong</sub>, Bim<sub>L</sub>=Bim<sub>Long</sub>. (B) JNK2<sup>-/-</sup> MEFs wurden behandelt wie in A beschreiben und anschließend in einem fluorometrischen Enzymtest auf Caspase-3-Aktivitäten (n=4, Mittelwerte ± Standardabweichung) bzw. (C) durchflusszytometrisch auf Zellmembranintegritätsverlust mittels PI-Aufnahme untersucht (n=4, Mittelwerte ± Standardabweichung). Das Balkendiagramm in B zeigt die Caspase-3-Aktivität in relativen Einheiten, während das Balkendiagramm in C den Anteil PI-positiver Zellen in % darstellt. Die Werte wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Gleichverteilung und einseitigem Student'schen t-Test auf Signifikanz untersucht. \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,005

Folglich konnte c-Myc, jedoch nicht c-Jun oder p53, als wichtiger Vermittler MG-132-induzierten Zelltodes identifiziert werden, der jedoch einen Bim- und Noxa-unabhängigen Einfluss auf den Apoptose-Signalweg nimmt. Der Transkriptionsfaktor, der nach proteasomaler Inhibition JNK1-abhängig aktiviert wird und Noxa steuert, bleibt somit weiterhin unbekannt.

### **3.12 c-Myc übt keinen Einfluss auf die MG-132-induzierte JNK1-unabhängige Apoptose von JNK1<sup>-/-</sup> Zellen aus**

Die bisherigen Daten zeigen, dass die MG-132 induzierte Apoptose von JNK2-defizienten MEFs in Abhängigkeit von JNK1 über die Effektorproteine c-Myc und Noxa vermittelt wird. Um hierbei zweifelsfrei die JNK1-Abhängigkeit zu demonstrieren, wurde anhand von RNA-Interferenzstudien der Einfluss von c-Myc und Noxa auf die zeitverzögerte MG-132-induzierte Apoptose von JNK1<sup>-/-</sup> MEFs analysiert (Abb. 24). Anschließend wurden die Proteinlevel mittels Immunoblot (Abb. 24 A, D) und die DEVDase-Aktivität sowie die Zelltodrate mit Hilfe von PI-Aufnahme nach MG-132-Stimulation bestimmt (Abb. 24 B, C, E, F).

Die Western Blots verdeutlichen die erfolgreiche siRNA-vermittelte Suppression der c-Myc- bzw. Noxa-Expression. Letzteres akkumuliert in JNK1<sup>-/-</sup> MEFs bei proteasomaler Inhibition nur in sehr geringem Maße (s. Abschnitt 3.5). Im Gegensatz zur deutlichen Protektion vor beschleunigter MG-132-induzierter Apoptose in JNK2<sup>-/-</sup> MEFs, fand nach Reduktion von Noxa oder c-Myc in JNK1-defizienten Zellen weder eine Verringerung des Zelltodes noch der Caspasenaktivierung im Vergleich zu Kontroll-Zellen statt. Demnach können die beiden Proteine ohne aktivierende JNK1-Aktivität ihre pro-apoptotische Rolle nicht ausführen. Diese RNAi-Daten schließen somit nicht nur unspezifische Seiteneffekte dieser siRNAs auf MG-132-induzierten Zelltod in JNK2<sup>-/-</sup> MEFs aus, sondern verdeutlichen darüber hinaus, dass sowohl Noxa als auch c-Myc spezifische Regulatoren der JNK1-abhängigen MG-132-induzierten Apoptose darstellen.



**Abb. 24 Keine Beeinträchtigung des JNK1-unabhängigen MG-132-induzierten Zelltodes durch den Knockdown von c-Myc oder Noxa**

(A, D) JNK1<sup>-/-</sup> MEFs wurden mit unspezifischer Kontroll-siRNA (Kon) oder mit siRNAs gegen c-Myc bzw. Noxa transfiziert und nach 72 Stunden für die Dauer der angegebenen Zeiträume mit MG-132 (10 μM) inkubiert. Mittels Western Blot-Analysen wurden die Proteinlevel der bezeichneten Proteine bestimmt. Die Detektion von Noxa war erst nach langer Exposition möglich. Gezeigt sind repräsentative Western Blots aus drei unabhängigen Experimenten. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Bim<sub>EL</sub>=Bim<sub>ExtraLong</sub>, Bim<sub>L</sub>=Bim<sub>Long</sub>. (B, E) Die Zellen wurden behandelt wie in A und D beschreiben und anschließend im einem fluorometrischen Enzymtest auf Caspase-3-Aktivitäten (n=3, Mittelwerte ± Standardabweichung) bzw. (C, F) durchflusszytometrisch auf Zellmembranintegritätsverlust mittels PI-Aufnahme (n=3, Mittelwerte ± Standardabweichung) untersucht. Während die Balkendiagramme in B und E die enzymatische Caspase-3-Aktivität in relativen Einheiten zeigen, stellen die Balkendiagramme in C und F den Anteil PI-positiver Zellen in % dar.

# ***4. Diskussion***

---

Inhibitoren des Proteasoms haben mit Bortezomib 2003 Einzug in die chemotherapeutische Krebsbehandlung genommen. In ihrer zytotoxischen Spezifität lösen sie gezielt Apoptose nur in Krebs-, jedoch nicht in gesunden Gewebezellen aus (Adams, Palombella et al. 1999). Hierbei vermittelt JNK pro-apoptotische Signale, jedoch sind sowohl die exakten molekularen Mechanismen der JNK-abhängigen Zelltodinduktion nach Proteasominhibition als auch die Rolle der Isoformen JNK1 und JNK2 unvollständig aufgeklärt (Dai, Rahmani et al. 2003; Yang, Ikezoe et al. 2004; Goranov and Goranova-Marinova 2005; Roccaro, Hideshima et al. 2006). Diesbezüglich wurden im Rahmen dieser Arbeit neue Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen der Proteasominhibition-induzierten Apoptose gewonnen, deren Effektivität eng mit der Aktivierung der JNK1-Isoform assoziiert ist.

#### **4.1 MG-132 induziert über JNK1-abhängige Noxa-Expression Apoptose**

Bisherige Untersuchungen zur Apoptoseinduktion durch proteasomale Inhibition konnten zeigen, dass hierfür neben der Aktivierung des JNK-Signalweges auch die Induktion des pro-apoptotischen *BH3-only* Proteins Noxa essenziell ist (Hideshima, Mitsiades et al. 2003; Fennell, Chacko et al. 2008). Bisher wurde der Zusammenhang zwischen JNK und Noxa erst in einer einzigen Studie, jedoch mit einem anderen Zelltodstimulus aufgezeigt. So wurde der Nachweis erbracht, dass das Vitamin-E-Analogon *α-Tocopherol Ether-linked Acetic Acid Analog* ( $\alpha$ -TEA) in humanen Brustkrebszellen Apoptose über die JNK-p73-Noxa-Achse auslöst, allerdings ohne den Einfluss der einzelnen JNK-Isoformen genauer zu untersuchen (Wang, Yu et al. 2008).

Unter Einbeziehung von JNK1- und JNK2-defizienten Fibroblasten konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass durch proteasomale Inhibition Apoptose über die JNK1-abhängige Expression von Noxa induziert wird. Während in JNK1-defizienten MEFs nahezu keine MG-132-induzierte Noxa-Expression stattfand, konnte dosisabhängig in JNK1<sup>+/-</sup> MEFs eine leichte, und in JNK1-profizienten JNK2<sup>-/-</sup> MEFs eine starke Induktion von Noxa auf mRNA- und Proteinebene festgestellt werden. Während die beiden erstgenannten Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber MG-132 aufwiesen, korrelierten die erhöhten Noxa-Proteinlevel mit der starken Induktion von Apoptose in den JNK2-defizienten MEFs. Diese wurde mit dem Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials, einer deutlichen Caspase-3-Aktivierung und -Prozessierung sowie der MG-132-abhängigen Zunahme der DNA-Fragmentierung bestätigt. Durch

Einbeziehung der Transkriptions- bzw. Translationsinhibitoren Actinomycin D und Cycloheximid wurde sowohl die Expression von Noxa als auch der MG-132-vermittelte Zelltod vollständig unterdrückt. Die erhöhte Sensitivität der JNK2<sup>-/-</sup> MEFs gegenüber drei weiteren proteasomalen Inhibitoren – Bortezomib, clasto-Lactacystin  $\beta$ -Lacton und Calpain-Inhibitor I – konnte in analogen Untersuchungen ebenfalls beobachtet und somit die Zelltodinduktion spezifisch auf die proteasomale Inhibition und nicht auf Nebeneffekte der Substanzen zurückgeführt werden. Des Weiteren wurde durch Einbeziehung der Transkriptions- bzw. Translations-Inhibitoren Actinomycin D und Cycloheximid sowohl die Expression von Noxa als auch der MG-132-vermittelte Zelltod vollständig unterdrückt. Die funktionale Rolle von Noxa in diesem Signalweg konnte ebenfalls durch siRNA-vermittelte Repression bestätigt werden, die in JNK2-defizienten, jedoch nicht in JNK1-defizienten MEFs die MG-132-induzierte Apoptose stark reduzierte. In der vorliegenden Arbeit wurde durch eine vergleichende Analyse somit erstmals nach proteasomaler Inhibition eine Regulation der Noxa-Expression durch die Isoform JNK1 aufgezeigt.

#### **4.2 MG-132 löst auf einem zweiten Weg über die Bim-Aktivierung Apoptose aus**

Trotz der signifikanten pro-apoptotischen Rolle von Noxa kann nach siRNA-vermittelter Reduktion nur eine partielle Verringerung MG-132-induzierter Apoptose um 50% festgestellt werden. Analoge Beobachtungen wurden auch in Melanom- und Jurkat-Zellen gemacht (Fernandez, Verhaegen et al. 2005; Perez-Galan, Roue et al. 2006). Dies deutet, genauso wie die Noxa-unabhängige zeitverzögerte Zelltodinduktion in JNK1-defizienten MEFs, darauf hin, dass ein zusätzlicher pro-apoptotischer Signalweg durch proteasomale Inhibition induziert wird. Die MG-132-induzierte Akkumulation des *BH3-only* Proteins Bim sowie der protektive Effekt durch seine siRNA-vermittelte Reduktion sind klare Indizien dafür, dass Bim in der Tat neben Noxa als zweites Zelltod-förderndes Effektorprotein fungiert. Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Studien, die Bim ebenfalls in einer pro-apoptotischen Rolle in MG-132-induzierter Apoptose identifizieren konnten (Fennell, Chacko et al. 2008). Bim akkumuliert allerdings JNK1-unabhängig nach MG-132-Behandlung in allen drei Zelllinien und dies scheint, im Gegensatz zur starken transkriptionellen Regulation von Noxa, nur auf einen posttranslationalen Stabilisierungseffekt zurückzuführen sein. Hierauf deutet hin, dass die MG-132-induzierte Zunahme des Bim-Proteinlevels nur mit einer äußerst geringen

mRNA-Induktion einhergeht und zudem, wenn auch im schwachen Ausmaß, selbst in Anwesenheit des Translationsinhibitors Cycloheximid stattfindet. Da die Bim-Aktivität einer Regulation durch zahlreiche posttranslationale Modifikationen unterliegt und Bim ein bekanntes JNK-Substrat darstellt, kann über eine Aktivierung dieses *BH3-only* Proteins durch JNK2 oder beide JNK-Isoformen spekuliert werden (Hubner, Barrett et al. 2008). So ist es möglich, dass eine aktivierende Phosphorylierung von Bim durch JNK-Proteine zu einer verspäteten Zelltodinduktion beiträgt, welche auch in JNK1<sup>-/-</sup> MEFs beobachtet wurde. Somit kann Bim in diesen Zellen pro-apoptotisch wirken und auch in Abwesenheit einer JNK1-abhängigen Noxa-Expression als ein „*Back-up*“-Mechanismus fungieren.

Interessanterweise wird nach dem direkten Aktivierungs-Neutralisierungs-Modell für die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran ein Bax- und Bak-aktivierendes *BH3-only* Protein benötigt (Lomonosova and Chinnadurai 2008). Während Bim zu diesen gezählt wird und zudem alle anti-apoptotischen Bcl-2 Familienproteine neutralisieren kann, gilt Noxa als ein Sensitivierer, welcher nicht in der Lage ist, die Bax-/Bak-Aktivierung alleine zu vermitteln (Kim, Rafiuddin-Shah et al. 2006). Stattdessen ist Noxa dafür bekannt, spezifisch Mcl-1 (und A1) zu neutralisieren (Lomonosova and Chinnadurai 2008). Durch proteasomale Inhibition kommt es neben Bim und Noxa zu einer ausgeprägten Stabilisierung eben dieses anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 (Nencioni, Hua et al. 2005), doch konnte seine Expression in Ermangelung eines geeigneten Antikörpers in dieser Arbeit nicht untersucht werden. Obwohl es durchaus plausibel erscheint, dass die beobachtete massive Noxa-Induktion zur Neutralisierung von Mcl-1 völlig ausreichend ist, kann eine Beteiligung von Bim auch in diesem Signalweg nicht vollständig ausgeschlossen werden.

#### **4.3 Ein unbekannter JNK1-regulierter Transkriptionsfaktor induziert Noxa-Expression nach proteasomaler Inhibition**

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass JNK1 durch die gesteigerte Expression von Noxa MG-132-induzierte Apoptose reguliert, unklar bleibt jedoch der beteiligte Transkriptionsfaktor. Zwar ist bekannt, dass p53 seine pro-apoptotische Funktion unter anderem über die Induktion von Noxa ausführt und darüber hinaus sowohl von JNK als auch von dem Proteasom reguliert wird, jedoch konnte sein Einfluss durch RNA-Interferenzstudien in diesem System nicht bestätigt werden (Oda, Ohki et al.

2000; Lavin and Gueven 2006). Andere bekannte Noxa-induzierende Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls unter der Kontrolle des JNK-Signalweges und/oder des Proteasoms stehen, sind ATF3, ATF4, c-Jun, c-Myc, HIF1 $\alpha$  und der Glucocorticoidrezeptor (Hai, Wolfgang et al. 1999; Wallace and Cidlowski 2001; Deroo, Rentsch et al. 2002; Mitsiades, Mitsiades et al. 2002; Comerford, Cummins et al. 2004; Bogoyevitch and Kobe 2006; Shringarpure, Catley et al. 2006; Veschini, Belloni et al. 2007; Weidemann and Johnson 2008; Matsuguchi, Chiba et al. 2009; Chen, Blank et al. 2010). Jedoch zeigte sich bei der jeweiligen siRNA-vermittelten Repression der insgesamt sieben Proteine weder ein Einfluss auf MG-132-induzierte Bim- oder Noxa-Expression noch auf Apoptose (mit Ausnahme von c-Myc). Weitere Noxa-regulierende Transkriptionsfaktoren (p73, E2F1, FoxO1 und FoxO3a) konnten aufgrund fehlender zuverlässiger Antikörper im murinen System nicht analysiert werden (Hershko and Ginsberg 2004; Flinterman, Guelen et al. 2005; Obexer, Geiger et al. 2007; Wang, Yu et al. 2008).

An dieser Stelle müssen allerdings zwei Einschränkungen der RNAi-vermittelten Suche nach dem Noxa-regulierenden Transkriptionsfaktor angemerkt werden. Unzweifelhaft ist die Effizienz des siRNA-vermittelten *Knockdowns* von Effektorproteinen und von Komponenten distinkter Signalwege hinreichend, um einen phänotypischen Effekt zu erzielen, wie auch in dieser Arbeit am Beispiel von Bim und Noxa gezeigt wurde. Trotz alledem ist zu beachten, dass auch ein erfolgreicher *Knockdown* die Proteinmenge nicht vollständig reduziert und die Expression des Proteins, wenn auch zu einem sehr geringen Prozentsatz, dennoch stattfindet. Demnach bleibt die Frage offen, ob beispielsweise nach effizienter siRNA-vermittelter Reduktion eines Transkriptionsfaktors in jedem Fall die durch ihn regulierte Genexpression beeinträchtigt wird, oder ob die geringe verbleibende Proteinmenge ausreicht, um die normale Transkription aufrechtzuerhalten. Ebenso darf der Effekt der Kompensation nicht ausgeschlossen werden. Das zelluläre Netzwerk der Signaltransduktion ist mit zahlreichen Verknüpfungen und *Feedback*-Mechanismen ausgestattet, um das Ausfallen von wichtigen Signalwegen durch Aktivierung anderer auszugleichen (Brandman and Meyer 2008). Dies kann nach dem starken pro-apoptotischen Stimulus wie der proteasomalen Inhibition möglicherweise auch für die Regulation der Noxa-Expression zutreffen. Folglich ist nicht auszuschließen, dass die hier gezeigten Ergebnisse der siRNA-Experimente auch falsch-negativ sein könnten. In weiterführenden Untersuchungen

---

sollten in JNK2-defizienten MEFs die aktiven Transkriptionsfaktoren am murinen Noxa-Promotor in einem *DNA-Pulldown* sowie einer anschließenden Massenspektrometrie umfassend analysiert werden.

#### **4.4 Der Transkriptionsfaktor c-Myc steuert MG-132-induzierte Apoptose**

Als weiterer möglicherweise an der JNK1-vermittelten Noxa-Regulation beteiligter Transkriptionsfaktor wurde c-Myc untersucht. Diese Arbeit zeigte in Immunoblot-Analysen eine weitestgehend gleichmäßige MG-132-vermittelte Induktion von c-Myc in allen drei untersuchten MEF-Zelllinien. Interessanterweise konnte aber eine verstärkte Phosphorylierung von c-Myc an Threonin 58 und/oder Serin 62 nur in den JNK2<sup>-/-</sup> MEFs festgestellt und als Hinweis für die Aktivierung seiner pro-apoptotischen Funktion gedeutet werden. Der mögliche Einwand, dass aufgrund der gleichmäßigen Akkumulation von c-Myc in den drei Zelllinien kein Indiz für eine JNK1-spezifische Aktivierung von c-Myc in den JNK2-defizienten MEFs vorliegt, kann widerlegt werden. Die proliferative Aktivität des Transkriptionsfaktors c-Myc wird unbestreitbar über seine Expression gesteuert, denn wie zahlreiche Studien zeigten, reicht der alleinige Expressionsanstieg dieses Protoonkogens in Anwesenheit von Überlebensfaktoren aus, um auch ruhende Zellen in den Zellzyklus zu leiten (Amati, Alevizopoulos et al. 1998). Nichtsdestotrotz wurden in den letzten Jahren jedoch auch zahlreiche posttranslationale Regulationsmechanismen dieses Transkriptionsfaktors aufgedeckt und die Phosphorylierung von c-Myc durch JNK an den Serinen 62 und 71 mit der Aktivierung seiner Apoptose-fördernden Genexpression korreliert (Vervoorts, Luscher-Firzloff et al. 2006). So ist c-Myc dafür bekannt, den intrinsischen Apoptose-Signalweg beispielsweise durch die Expression von Bim, Bid und Noxa zu aktivieren (Hoffman and Liebermann 2008). Ein verstärktes Signal des phosphorylierungsspezifischen Antikörpers durch Akkumulation des totalen c-Myc-Proteins oder durch die JNK-unspezifische Phosphorylierung von Threonin 58 in den JNK1<sup>+/-</sup> und JNK1<sup>-/-</sup> MEFs, beispielsweise durch GSK3 $\alpha/\beta$ , kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (Gregory, Qi et al. 2003). Der Unterschied im Phosphorylierungsmuster ist zwischen den Zelllinien jedoch zu deutlich, um nur auf ein schwankendes Hintergrundsignal zurückzuführen zu sein. Die Vermutung, dass diese verstärkte posttranslationale Modifikation in den JNK2<sup>-/-</sup> MEFs die pro-apoptotische Funktion von c-Myc aktiviert, wurde mit der siRNA-vermittelten Repression von c-Myc bestätigt. In der Tat wurden JNK2-defiziente MEFs signifikant vor

MG-132-induzierte Apoptose protektiert. Allerdings konnte durch *Knockdown* von c-Myc die späte Apoptose in JNK1-defizienten MEFs nicht reduziert werden und demonstriert somit die fehlende Aktivierung von c-Myc in Abwesenheit von JNK1. Zusammen mit der verstärkten aktivierenden Phosphorylierung von c-Myc in JNK2<sup>-/-</sup> MEFs liegen somit klare Indizien für die pro-apoptotische Rolle von c-Myc in Abhängigkeit von JNK1 bei MG-132-Behandlung vor. Da die RNAi-vermittelte Repression von c-Myc jedoch nicht mit einer verringerten Expression von Bim oder Noxa einherging, scheint die c-Myc-abhängige Apoptoseinduktion über ein weiteres, hier nicht identifiziertes Effektorprotein zu erfolgen. Alternativ kann es sich hierbei um einen kompensatorischen Effekt handeln und somit die Möglichkeit bestehen, dass die reduzierte transkriptionelle Aktivität von c-Myc am Noxa-Promotor durch einen anderen Transkriptionsfaktor ausgeglichen wurde. Das Ergebnis des siRNA-Experimentes war insofern unerwartet, als nach Bortezomib-Behandlung eine c-Myc-abhängige Induktion von Noxa und daraus resultierendem Zelltod in Melanom-, Cervixkarzinom- und Brustkrebszellen festgestellt und zudem JNK als aktivierende Kinase von c-Myc in mehreren Zelllinien (Cervixkarzinom, immortalisierten Fibroblasten und embryonalen Nierenzellen) identifiziert wurde (Noguchi, Kitanaka et al. 1999; Nikiforov, Riblett et al. 2007). Diese Daten stellen starke Hinweise für eine Bortezomib-vermittelte Apoptoseinduktion über die JNK-c-Myc-Noxa-Achse dar. Leider konnte diese Hypothese mit siRNA-Experimenten in murinen Fibroblasten in der hier vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Möglicherweise besteht eine zelltypspezifische Regulation des Signalweges, welche in weiterführenden Experimenten in den genannten Krebszelllinien näher analysiert werden sollte.

Welches weitere Effektormolekül vermittelt neben Noxa und Bim Apoptose nach proteasomaler Inhibition in Abhängigkeit von c-Myc? Einige Studien schildern die Induktion des Fas-Liganden nach Bortezomib-Behandlung von c-Myc oder JNK und AP-1 (Tani, Kitagawa et al. 2001; Lauricella, Emanuele et al. 2006). Der Ligand wird daraufhin sekretiert und verstärkt in den Krebszellen durch autokrine Aktivierung des Todesrezeptors die Apoptoseinduktion. In ersten, vorläufigen Experimenten ergaben sich jedoch in dem hier untersuchten System keine Hinweise für eine Sekretion des Fas-Liganden oder eine autokrine Apoptoseinduktion.

#### 4.5 Der Einfluss von JNK1 und JNK2 auf MG-132-vermittelte Apoptose

Während eine transiente JNK-Aktivierung mit überlebensfördernden Signalen in Verbindung gebracht wird, begünstigt anhaltende und starke JNK-Aktivität Apoptose. Auch nach proteasomaler Inhibition ist JNK ein wichtiger pro-apoptotischer Vermittler (Nakata, Hayakawa et al. 2011). In den letzten Jahren wurde ein unterschiedlicher Einfluss der einzelnen JNK-Isoformen auf Zelltodinduktion festgestellt. So wurde gezeigt, dass JNK1 für die UV-, Nitritoxid- und  $\beta$ -Amyloid-vermittelte Apoptose von großer Bedeutung ist, während JNK2 eine entscheidende Rolle im Zelltod durch 6-Hydroxydopamin, CD3-Stimulation und Arsenit spielt (Sabapathy, Hu et al. 1999; Tournier, Hess et al. 2000; Eminel, Klettner et al. 2004; Snyder, Shroff et al. 2009; Li, Zhao et al. 2012). Der Einfluss von JNK1 und JNK2 in  $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Zelltodprozessen wird noch kontrovers diskutiert (Dietrich, Thastrup et al. 2004; Chang, Kamata et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals spezifisch in MG-132-induzierter Apoptose die pro-apoptotische Rolle von JNK1, jedoch nicht von JNK2 festgestellt werden. Hierbei deuten die Expression von Noxa in Dosisabhängigkeit von JNK1 sowie die unterschiedlichen Auswirkungen der siRNA-vermittelten Repression von Noxa und c-Myc bei MG-132-induzierter Apoptose in JNK1-exprimierenden gegenüber JNK1-defizienten MEFs deutlich auf eine Regulation durch JNK1 hin. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass hierbei zusätzlich ein inhibierender Einfluss von JNK2 vorliegt und die Expression von Noxa oder die Aktivierung von c-Myc hemmt. Auch die geringe Phosphorylierung von c-Myc in JNK1<sup>+/-</sup> MEFs liefert einen Hinweis auf solch eine mögliche inhibierende Funktion von JNK2. Um diesen Sachverhalt vollständig aufzuklären, müsste die Expression von Noxa in Wildtyp-MEFs analysiert werden, die sowohl profizient für JNK1 als auch JNK2 sind. Wäre ausschließlich der aktivierende Einfluss von JNK1 von Bedeutung, sollten Wildtyp-Zellen in gleichem Maße MG-132-induzierte Noxa-Expression und c-Myc-Aktivierung sowie vergleichbare Apoptoseraten zeigen wie JNK1<sup>+/+</sup> JNK2<sup>-/-</sup> MEFs. Würde aber gleichzeitig von JNK2 eine inhibierende Funktion ausgehen, so wäre in den Wildtyp-Zellen ein intermediärer Phänotyp zwischen dem von JNK2<sup>-/-</sup> und jenem von JNK1<sup>+/-</sup> MEFs hinsichtlich der Apoptoseinduktion durch c-Myc und Noxa zu erwarten. Dieser Sachverhalt sollte durch Überexpression der individuellen JNK-Isoformen in JNK1<sup>-/-</sup>JNK2<sup>-/-</sup> MEFs eingehend analysiert werden. Darüber hinaus sollte in weiterführenden Analysen der eventuell dosisabhängige Apoptose-fördernde oder -hemmende Einfluss der einzelnen JNK-Isoformen

---

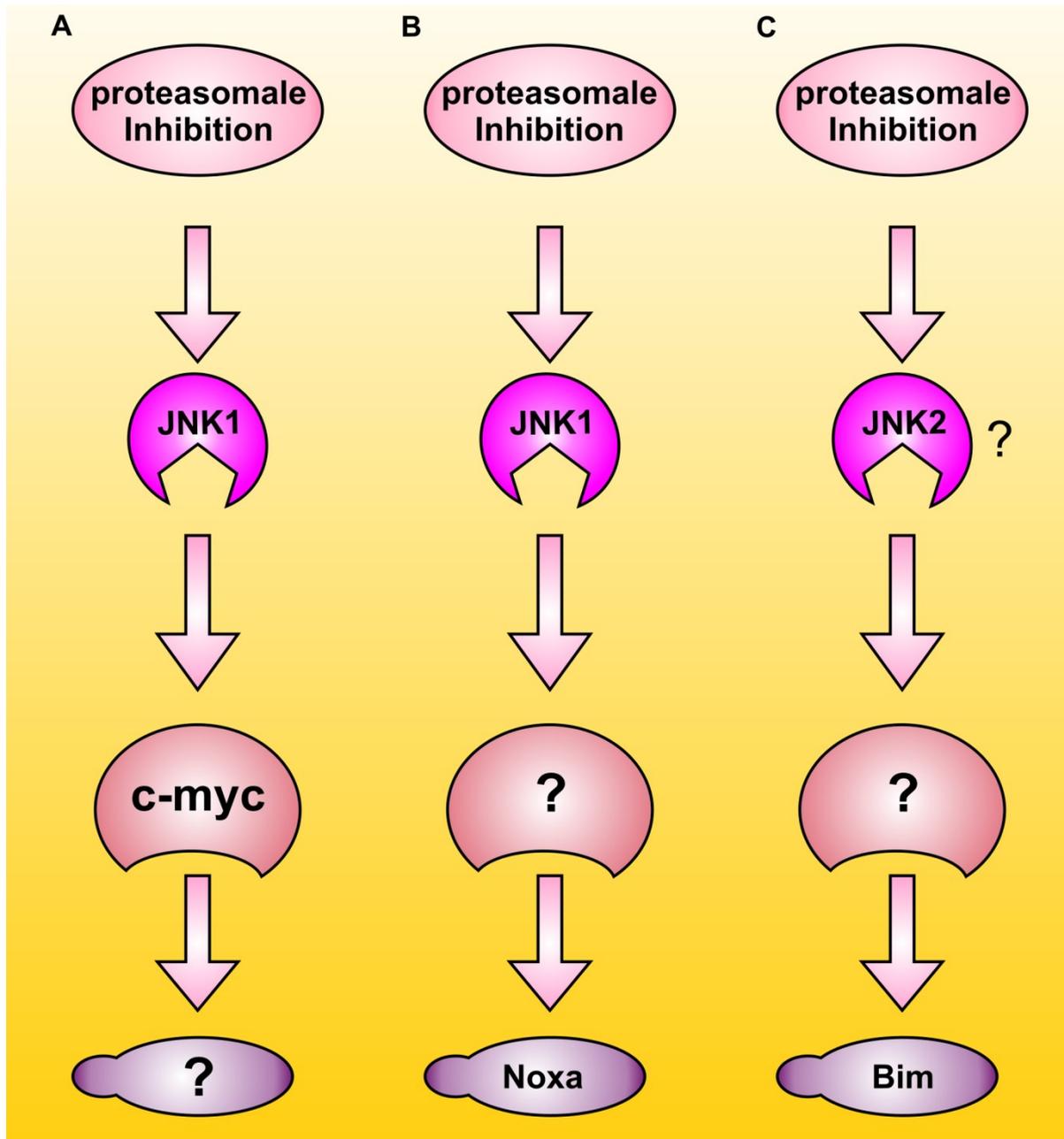
systematisch anhand von siRNA-vermittelter Repression auch in anderen Zellsystemen untersucht werden.

Ein weiterer Aspekt, der bei der Bewertung dieser Ergebnisse beachtet werden muss, sind die möglichen phänotypischen Veränderungen, die durch den Immortalisierungsprozess der Fibroblasten entstehen können. In den hier verwendeten MEFs wurde die sogenannte 3T3-Methode angewandt, bei der die primären Fibroblasten in einer Dichte von  $3 \times 10^5$  auf  $20 \text{ cm}^2$  ausgesät und jeden dritten Tag wieder auf diese Konzentration verdünnt werden, bis sie in nach Durchlaufen einer „Krise“ immortalisiert sind (Todaro and Green 1963; Sabapathy, Hochedlinger et al. 2004). Nach 10-20 Zellgenerationen setzt eine sogenannte „Krise“ ein, innerhalb derer viele Zellen in die Seneszenz eintreten (Duncan and Reddel 1997). Jedoch finden bei einigen wenigen Zellen Mutationen statt, die eine Immortalisierung und somit unlimitiertes Proliferationspotenzial hervorrufen. Diese Mutationen sind rein zufällig und können somit in jeder Zelllinie verschieden sein (Denhardt, Edwards et al. 1991). Der unterschiedliche Status von p53 in den drei MEF-Linien gibt einen Hinweis darauf, dass auch in den hier untersuchten Zelllinien unterschiedliche Mutationsereignisse zur Immortalisierung beigetragen haben. Zwar konnte mit Hilfe von siRNA-Experimenten der Einfluss von p53 auf Apoptose in JNK2-defizienten MEFs und somit auch der Status des p53-Proteins als Grund für die erhöhte MG-132-Sensitivität ausgeschlossen werden, nichtsdestotrotz können verschiedene wichtige regulatorische Proteine in den Zellen mutiert sein und zu dem unterschiedlichen Phänotyp der MEF-Linien gegenüber proteasomaler Inhibition beitragen. Um den Einfluss dieses Immortalisierungsprozesses auf MG-132-induzierte Apoptose auszuschließen, sollten die hier gezeigten Ergebnisse in primären Zellen, vorzugsweise Fibroblasten, überprüft werden.

#### **4.6 MG-132 induziert Apoptose über drei verschiedene Signalwege**

Die hier gezeigten Ergebnisse bilden die Grundlage für ein Modell, nach dem MG-132-vermittelte Apoptose über drei unabhängige Signalwege verläuft (Abb. 25). So werden nach proteasomaler Inhibition zwei unterschiedliche JNK1-abhängige Apoptose-Signalwege und zusätzlich ein JNK1-unabhängiges Zelltod-induzierendes Signal initiiert. Zum einen konnte die JNK1-abhängige signifikante pro-apoptotische Wirkung von c-Myc über ein unbekanntes Effektorprotein festgestellt werden (Abb. 25A). Des Weiteren wird Noxa dosisabhängig von JNK1 nach proteasomaler Inhibition über einen

unbekannten Transkriptionsfaktor reguliert (Abb. 25B). Schließlich wurde in diesem System auch Bim als drittes pro-apoptotisches Effektorprotein identifiziert, welches in einem weiteren Signalweg, eventuell nach aktivierender Phosphorylierung durch JNK2, zur Apoptose nach proteasomaler Inhibition beiträgt (Abb. 25C).



**Abb. 25 Modell JNK-abhängiger Apoptoseinduktion nach proteasomaler Inhibition**

(A) In den untersuchten MEF-Linien führt die JNK1-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Myc nach proteasomaler Inhibition durch Induktion eines nicht identifizierten Effektorproteins zur Apoptoseinduktion. (B) Alternativ induziert JNK1 über einen unbekannten Transkriptionsfaktor Noxa-Expression und somit Apoptose nach MG-132-Inkubation. (C) Proteasomale Inhibition löst Apoptose unabhängig von JNK1 über das Effektorprotein Bim aus, möglich ist hier der Einfluss von JNK2.

#### 4.7 Implikationen für die Krebstherapie

In der vorliegenden Arbeit wurde die JNK1-spezifische Regulation von Noxa und c-Myc nach proteasomaler Inhibition durch MG-132 sowie durch Bortezomib festgestellt. Letzteres ist bereits für die Behandlung des Multiplen Myeloms und des Mantelzelllymphoms zugelassen, des Weiteren wird in klinischen Studien auch die Behandlung von soliden Tumoren in alleiniger oder in Kombinationstherapie mit Bortezomib untersucht (Russo, Bronte et al. 2010). Gleichzeitig kann in vielen Krebsformen eine modulierte Aktivität von JNK festgestellt werden. Welche Implikationen ergeben sich nun aus den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit für die Anwendung proteasomaler Inhibitoren in der Krebstherapie?

Interessanterweise besitzen JNK-Isoformen gewebespezifisch entweder eine Tumorsupprimierende oder eine Tumor-fördernde Funktion. So wurde festgestellt, dass eine JNK1-Defizienz die Bildung von Hauttumoren in DMBA/PMA-induzierten Mausmodellen begünstigt (She, Chen et al. 2002). In Anbetracht der Tatsache, dass sowohl JNK als auch Noxa, ebenfalls bekannt als *PMA-inducible Protein 1* (PMAIP1), durch PMA aktiviert werden, könnte JNK1 seine tumorsupprimierende Funktion über die Expression von Noxa ausüben (Hijikata, Kato et al. 1990; Zhou, Lin et al. 2000; Ito, Mishra et al. 2001). Zur Untersuchung dieser These sollte in zukünftigen Studien eine vergleichende Analyse des Noxa-Proteinlevels in DMBA/PMA-behandelten Wildtyp- und JNK1-defizienten Mäusen durchgeführt werden.

Des Weiteren bietet es sich an, die Mechanismen der onkogenen Transformation für die gezielte Behandlung von Krebs zu nutzen und Apoptose gezielt über diese mutierten Signalwege zu fördern (Johnstone, Ruefli et al. 2002). So ist die Hyperaktivierung des potenten Onkogens c-Myc in zahlreichen Krebsarten, darunter auch im Multiplen Myelom zu finden (Dang 2012). Ebenso wurde in einer Vielzahl von Tumoren eine Isoform-spezifische konstitutive Aktivierung der JNKs festgestellt, beispielsweise jener von JNK1 im hepatozellulären Karzinom und in Prostatakrebs (Vivanco, Palaskas et al. 2007; Hui, Zatloukal et al. 2008). Zwar konnten in ersten Studien für diese beiden Krebsarten noch keine Erfolge bei der alleinigen Behandlung mit Bortezomib erzielt werden, allerdings kann aufgrund der hier vorliegenden Daten spekuliert werden, dass sich eine Hyperaktivierung von JNK1 oder c-Myc positiv auf die Behandlungserfolge mit proteasomalen Inhibitoren auswirken könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte eine mögliche Korrelation zwischen der Aktivität von c-Myc und verschiedener JNK-

Isoformen und der Sensitivität von Krebszelllinien oder humanen Tumoren gegenüber proteasomaler Inhibition analysiert werden. Auf diese Weise bestünde die Möglichkeit, mit den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen verbesserte Strategien zur Anwendung proteasomaler Inhibitoren in der Krebstherapie zu entwickeln.

**5.**

***Zusammen-  
fassung/  
Abstract***

---

## Zusammenfassung

Proteasomale Inhibitoren besitzen ein besonderes zytotoxisches Profil, da sie in hohem Maße Apoptose in entarteten Krebs-, jedoch nicht in gesunden Gewebezellen induzieren. Somit stellen sie ein vielversprechendes Mittel für die Krebstherapie dar. In der Tat wurde mit Bortezomib (Velcade™) im Jahr 2003 der erste proteasomale Inhibitor für die Behandlung von Patienten mit einer Erkrankung am Mantelzelllymphom oder Multiplen Myelom zugelassen.

An der Induktion von Apoptose bei proteasomaler Inhibition sind eine Vielzahl von Effektormolekülen und Signalwegen beteiligt, die genauen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch nur unzureichend aufgeklärt. So wurden zwar in einer Vielzahl von Krebszelllinien sowohl die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) als auch die Induktion des pro-apoptotischen *BH3-only* Proteins Noxa als essenzielle Ereignisse der Proteasominhibitor-vermittelten Apoptose identifiziert, eine Verbindung zwischen beiden Signalwegen oder der Einfluss einzelner JNK-Isoformen auf die Noxa-Expression oder Apoptose wurde hierbei allerdings nicht analysiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von Untersuchungen in JNK1- und JNK2-defizienten embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) erstmals eine Verbindung beider Signalwege durch eine JNK1-abhängige Expression von Noxa festgestellt, welche für die Induktion von Zelltod durch Inhibitoren des Proteasoms verantwortlich ist. So konnte anhand von Messungen der Zellmembranintegrität, der DNA-Fragmentierung, des mitochondrialen Membranpotenzials sowie der Caspase-3-Aktivierung eine rasche Apoptoseinduktion nach proteasomaler Inhibition nur in JNK1-exprimierenden JNK2-defizienten MEFs beobachtet werden. Dagegen traten diese Apoptosemerkmale in Abwesenheit eines oder beider *JNK1*-Allele stark verzögert und deutlich verringert auf. In Übereinstimmung hiermit wurde eine massive Induktion von Noxa auf mRNA- und Proteinebene nach proteasomaler Inhibition nur in JNK2<sup>-/-</sup> MEFs beobachtet, nicht aber in JNK1<sup>+/-</sup> und JNK1<sup>-/-</sup> MEFs, in denen Noxa deutlich schwächer bzw. nicht induziert wurde. Da im Rahmen dieser Arbeit in RNA-Interferenzstudien nachgewiesen wurde, dass ein *Knockdown* von Noxa den Proteasominhibitor-vermittelten Zelltod ausschließlich in JNK2-, nicht aber in JNK1-defizienten MEFs signifikant reduzierte, verdeutlichen diese Daten eine JNK1-abhängige Regulation der zugrunde liegenden Zelltodprozesse.

Weitere Untersuchungen demonstrierten die Abhängigkeit der Proteasominhibitor-vermittelten Apoptose von *de novo* Proteinsynthese, weswegen die Existenz eines Transkriptionsfaktors postuliert wurde, der JNK1-abhängig die Expression von Noxa steuert. Obwohl zahlreiche für diese Aufgabe infrage kommende Transkriptionsfaktoren inklusive p53, c-Jun, c-Myc, ATF3, ATF4 und HIF1 $\alpha$  durch proteasomale Inhibition hochreguliert wurden, konnte einzig die siRNA-vermittelte Reduktion des Onkogens c-Myc eine Protektion JNK2-defizienter MEFs vor der Proteasominhibitor-induzierten Apoptose bewirken. Zusammen mit den Beobachtungen, dass durch diese Maßnahme JNK1-defiziente Zellen nicht vor später Apoptose geschützt werden konnten und die aktivierende Phosphorylierung von c-Myc nach proteasomaler Inhibition fast ausschließlich in JNK2<sup>-/-</sup> MEFs stattfand, ließen diese Ergebnisse auf eine mögliche JNK1-c-Myc-Noxa-Achse schließen. Da aber der *Knockdown* von c-Myc keinen Einfluss auf die Noxa-Expression hatte, zeigen diese Ergebnisse, dass die Apoptoseinduktion nach proteasomaler Inhibition zwar JNK1-abhängig sowohl über c-Myc als auch über Noxa vermittelt wird, aber auch, dass beide Signalwege unabhängig voneinander agieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit erstmals die bedeutende Rolle der JNK-Isoform JNK1 in Apoptose nach proteasomaler Inhibition näher charakterisiert werden. Hierbei zeigte es sich, dass Inhibitoren des Proteasoms zwei separate JNK1-abhängige Signalwege induzieren, welche Apoptose entweder über den Transkriptionsfaktor c-Myc oder über das *BH3-only* Protein Noxa vermitteln. Diese Ergebnisse können dazu beitragen, sowohl das Verständnis der Apoptoseinduktion in Krebszellen nach Behandlung mit proteasomalen Inhibitoren als auch die zukünftige Entwicklung darauf basierender Krebstherapien zu verbessern.

**Abstract**

Inhibitors of the proteasomal system (IPSs) show a unique cytotoxic profile, as they exert potent apoptosis inducing capabilities in tumor cells, but leave normal tissue cells unharmed. Hence, their usage as drugs for cancer therapy is promising. Indeed, in 2003 the first proteasomal inhibitor Bortezomib (Velcade™) was approved to treat patients suffering from multiple myeloma or mantle cell lymphoma.

Multiple signaling pathways and effector molecules contribute to IPS-induced apoptosis, but the underlying molecular mechanisms are still incompletely deciphered. Activation of the c-Jun N-terminal kinases (JNK) and induction of the pro-apoptotic BH3-only protein Noxa have been identified as essential events in IPS-induced apoptosis of many cancer cell lines. However, the interplay of these two pathways or the contribution of individual JNK isoforms to Noxa expression and apoptosis have not been addressed before.

Analyzing JNK1- and JNK2-deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs), it was demonstrated here for the first time, that the two pathways are indeed connected and that JNK1-induced expression of Noxa is required for IPS-induced apoptosis. Only JNK1-expressing JNK2-deficient MEFs showed a rapid IPS-mediated apoptosis induction as demonstrated by measuring cell membrane integrity, DNA fragmentation, loss of mitochondrial membrane potential and caspase-3 activation. In contrast, the appearance of these hallmarks of apoptosis was strongly delayed and reduced in the absence of one or both *JNK1* alleles. In accordance with this, a massive induction of Noxa was detected at the mRNA and protein level only in IPS-treated JNK2<sup>-/-</sup> MEFs, while its expression was strongly reduced or even completely impaired in similar treated JNK1<sup>+/-</sup> and JNK1<sup>-/-</sup> MEFs, respectively. Consistently, RNA-interference studies showed that knockdown of Noxa significantly reduced IPS-mediated cell death exclusively in JNK2<sup>-/-</sup>, but not in JNK1-deficient MEFs. Together, these data strongly implicate a JNK1-dependent regulation of Noxa that controls the underlying cell death processes.

Further studies demonstrated that IPS-induced apoptosis strongly depends on *de novo* protein synthesis, suggesting the existence of a transcription factor that controls the expression of Noxa in a JNK1-dependent manner. Although several potential transcription factors including p53, c-Jun, c-Myc, ATF3, ATF4 and HIF1 $\alpha$  were shown here to be induced by IPSs, only siRNA-mediated repression of c-Myc caused a reduction of IPS-induced apoptosis in JNK2-deficient MEFs. As this knockdown could not protect

JNK1-deficient MEFs from the delayed JNK1-independent induction of apoptosis and because activating phosphorylations of c-Myc were almost exclusively observed only in JNK2<sup>-/-</sup> MEFs, the existence of a JNK1-c-Myc-Noxa axis was postulated. However, as knockdown of c-Myc had no influence on Noxa expression, these results indicate that although IPS-induced apoptosis critically depends on both, c-Myc and Noxa, they most likely function independently of each other despite both being activated in a JNK1-dependent manner. In summary, the present work characterizes for the first time a most eminent role of the JNK-isoform JNK1 in IPS-mediated apoptosis. It was shown that IPS-induced apoptosis critically depends on JNK1 that induces two distinct signaling pathways that either rely on the transcription factor c-Myc or the BH3-only protein Noxa. Thereby, these results greatly contribute to our understanding of IPS-induced apoptosis signaling and may thus help to improve future IPS-based anti-cancer therapies.

# *6. Literatur- verzeichnis*

---

- Abrams, M. T., N. M. Robertson, et al. (2004). "Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by targeting the major splice variants of BIM mRNA with small interfering RNA and short hairpin RNA." *J Biol Chem* **279**(53): 55809-17.
- Adams, J. (2004). "The proteasome: a suitable antineoplastic target." *Nat Rev Cancer* **4**(5): 349-60.
- Adams, J., V. J. Palombella, et al. (1999). "Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents." *Cancer Res* **59**(11): 2615-22.
- Adams, K. W. and G. M. Cooper (2007). "Rapid turnover of mcl-1 couples translation to cell survival and apoptosis." *J Biol Chem* **282**(9): 6192-200.
- Adler, V., A. Polotskaya, et al. (1992). "Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity." *J Biol Chem* **267**(24): 17001-5.
- Aghajanian, C., D. S. Dizon, et al. (2005). "Phase I trial of bortezomib and carboplatin in recurrent ovarian or primary peritoneal cancer." *J Clin Oncol* **23**(25): 5943-9.
- Albershardt, T. C., B. L. Salerni, et al. (2011). "Multiple BH3 mimetics antagonize antiapoptotic MCL1 protein by inducing the endoplasmic reticulum stress response and up-regulating BH3-only protein NOXA." *J Biol Chem* **286**(28): 24882-95.
- Amati, B., K. Alevizopoulos, et al. (1998). "Myc and the cell cycle." *Front Biosci* **3**: d250-68.
- Anderson, K. C. (2012). "The 39th David A. Karnofsky Lecture: bench-to-bedside translation of targeted therapies in multiple myeloma." *J Clin Oncol* **30**(4): 445-52.
- Angel, P., A. Szabowski, et al. (2001). "Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology." *Oncogene* **20**(19): 2413-23.
- Armstrong, J. L., R. Flockhart, et al. (2009). "Regulation of endoplasmic reticulum stress-induced cell death by ATF4 in neuroectodermal tumor cells." *J Biol Chem* **285**(9): 6091-100.
- Bagowski, C. P., J. Besser, et al. (2003). "The JNK cascade as a biochemical switch in mammalian cells: ultrasensitive and all-or-none responses." *Curr Biol* **13**(4): 315-20.
- Baines, C. P., R. A. Kaiser, et al. (2007). "Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death." *Nat Cell Biol* **9**(5): 550-5.
- Barr, R. K. and M. A. Bogoyevitch (2001). "The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs)." *Int J Biochem Cell Biol* **33**(11): 1047-63.
- Bedford, L., J. Lowe, et al. (2011). "Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets." *Nat Rev Drug Discov* **10**(1): 29-46.
- Benaroudj, N., P. Zwickl, et al. (2003). "ATP hydrolysis by the proteasome regulatory complex PAN serves multiple functions in protein degradation." *Mol Cell* **11**(1): 69-78.
- Bergsbaken, T., S. L. Fink, et al. (2009). "Pyroptosis: host cell death and inflammation." *Nat Rev Microbiol* **7**(2): 99-109.
- Blagosklonny, M. V. (2000). "p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect." *Faseb J* **14**(13): 1901-7.
- Bode, A. M. and Z. Dong (2007). "The functional contrariety of JNK." *Mol Carcinog* **46**(8): 591-8.
- Bogoyevitch, M. A. (2006). "The isoform-specific functions of the c-Jun N-terminal Kinases (JNKs): differences revealed by gene targeting." *Bioessays* **28**(9): 923-34.

- Bogoyevitch, M. A. and B. Kobe (2006). "Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases." *Microbiol Mol Biol Rev* **70**(4): 1061-95.
- Bose, S., B. P. Gothoskar, et al. (1967). "Differential sensitivity of protein synthesis in human cell lines to actinomycin D." *Exp Cell Res* **46**(3): 599-603.
- Brancolini, C. (2008). "Inhibitors of the Ubiquitin-Proteasome System and the cell death machinery: How many pathways are activated?" *Curr Mol Pharmacol* **1**(1): 24-37.
- Brandman, O. and T. Meyer (2008). "Feedback loops shape cellular signals in space and time." *Science* **322**(5900): 390-5.
- Brooks, P., G. Fuertes, et al. (2000). "Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells." *Biochem J* **346 Pt 1**: 155-61.
- Brozovic, A. and M. Osmak (2007). "Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance." *Cancer Lett* **251**(1): 1-16.
- Bruick, R. K. (2000). "Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16): 9082-7.
- Cargnello, M. and P. P. Roux (2011). "Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases." *Microbiol Mol Biol Rev* **75**(1): 50-83.
- Caserta, T. M., A. N. Smith, et al. (2003). "Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties." *Apoptosis* **8**(4): 345-52.
- Cerretti, D. P., C. J. Kozlosky, et al. (1992). "Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme." *Science* **256**(5053): 97-100.
- Chang, L., H. Kamata, et al. (2006). "The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover." *Cell* **124**(3): 601-13.
- Chauhan, D., T. Hideshima, et al. (2005). "Proteasome inhibition in multiple myeloma: therapeutic implication." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 465-76.
- Chen, L., S. N. Willis, et al. (2005). "Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function." *Mol Cell* **17**(3): 393-403.
- Chen, N., M. Nomura, et al. (2001). "Suppression of skin tumorigenesis in c-Jun NH(2)-terminal kinase-2-deficient mice." *Cancer Res* **61**(10): 3908-12.
- Chen, S., J. L. Blank, et al. (2010). "Genome-wide siRNA screen for modulators of cell death induced by proteasome inhibitor bortezomib." *Cancer Res* **70**(11): 4318-26.
- Chen, Y. R., X. Wang, et al. (1996). "The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation." *J Biol Chem* **271**(50): 31929-36.
- Cheng, Y. (2009). "Toward an atomic model of the 26S proteasome." *Curr Opin Struct Biol* **19**(2): 203-8.
- Codogno, P., M. Mehrpour, et al. (2011). "Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating?" *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(1): 7-12.
- Comerford, K. M., E. P. Cummins, et al. (2004). "c-Jun NH2-terminal kinase activation contributes to hypoxia-inducible factor 1alpha-dependent P-glycoprotein expression in hypoxia." *Cancer Res* **64**(24): 9057-61.
- Cryns, V. and J. Yuan (1998). "Proteases to die for." *Genes Dev* **12**(11): 1551-70.
- Dai, Y., M. Rahmani, et al. (2003). "Proteasome inhibitors potentiate leukemic cell apoptosis induced by the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol through a SAPK/JNK- and NF-kappaB-dependent process." *Oncogene* **22**(46): 7108-22.
- Dang, C. V. (2012). "MYC on the path to cancer." *Cell* **149**(1): 22-35.

- Davis, N. B., D. A. Taber, et al. (2004). "Phase II trial of PS-341 in patients with renal cell cancer: a University of Chicago phase II consortium study." J Clin Oncol **22**(1): 115-9.
- Davis, R. J. (2000). "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases." Cell **103**(2): 239-52.
- Degterev, A., M. Boyce, et al. (2003). "A decade of caspases." Oncogene **22**(53): 8543-67.
- Degterev, A., J. Hitomi, et al. (2008). "Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins." Nat Chem Biol **4**(5): 313-21.
- Degterev, A. and J. Yuan (2008). "Expansion and evolution of cell death programmes." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(5): 378-90.
- DeMartino, G. N. and C. A. Slaughter (1999). "The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms." J Biol Chem **274**(32): 22123-6.
- Denecker, G., P. Ovaere, et al. (2008). "Caspase-14 reveals its secrets." J Cell Biol **180**(3): 451-8.
- Denhardt, D. T., D. R. Edwards, et al. (1991). "Spontaneous immortalization of mouse embryo cells: strain differences and changes in gene expression with particular reference to retroviral gag-pol genes." Exp Cell Res **192**(1): 128-36.
- Derijard, B., M. Hibi, et al. (1994). "JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain." Cell **76**(6): 1025-37.
- Deroo, B. J., C. Rentsch, et al. (2002). "Proteasomal inhibition enhances glucocorticoid receptor transactivation and alters its subnuclear trafficking." Mol Cell Biol **22**(12): 4113-23.
- Deshaies, R. J. and C. A. Joazeiro (2009). "RING domain E3 ubiquitin ligases." Annu Rev Biochem **78**: 399-434.
- Deshmukh, M., K. Kuida, et al. (2000). "Caspase inhibition extends the commitment to neuronal death beyond cytochrome c release to the point of mitochondrial depolarization." J Cell Biol **150**(1): 131-43.
- Deveraux, Q. L., R. Takahashi, et al. (1997). "X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases." Nature **388**(6639): 300-4.
- Dhanasekaran, D. N. and E. P. Reddy (2008). "JNK signaling in apoptosis." Oncogene **27**(48): 6245-51.
- Dietrich, N., J. Thastrup, et al. (2004). "JNK2 mediates TNF-induced cell death in mouse embryonic fibroblasts via regulation of both caspase and cathepsin protease pathways." Cell Death Differ **11**(3): 301-13.
- Ding, W. X., H. M. Ni, et al. (2007). "A coordinated action of Bax, PUMA, and p53 promotes MG132-induced mitochondria activation and apoptosis in colon cancer cells." Mol Cancer Ther **6**(3): 1062-9.
- Dong, C., D. D. Yang, et al. (1998). "Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1." Science **282**(5396): 2092-5.
- Dumaz, N. and D. W. Meek (1999). "Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2." Embo J **18**(24): 7002-10.
- Duncan, E. L. and R. R. Reddel (1997). "Genetic changes associated with immortalization. A review." Biochemistry (Mosc) **62**(11): 1263-74.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, et al. (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." Cell **75**(4): 817-25.
- Eminel, S., A. Klettner, et al. (2004). "JNK2 translocates to the mitochondria and mediates cytochrome c release in PC12 cells in response to 6-hydroxydopamine." J Biol Chem **279**(53): 55385-92.

- Engstrom, W., A. Ward, et al. (2010). "The role of scaffold proteins in JNK signalling." *Cell Prolif* **43**(1): 56-66.
- Fennell, D. A., A. Chacko, et al. (2008). "BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib." *Oncogene* **27**(9): 1189-97.
- Fernandez, Y., M. Verhaegen, et al. (2005). "Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications." *Cancer Res* **65**(14): 6294-304.
- Fischer, H., U. Koenig, et al. (2002). "Human caspase 12 has acquired deleterious mutations." *Biochem Biophys Res Commun* **293**(2): 722-6.
- Fischer, U., R. U. Janicke, et al. (2003). "Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates." *Cell Death Differ* **10**(1): 76-100.
- Fischer, U. and K. Schulze-Osthoff (2005). "New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease." *Pharmacol Rev* **57**(2): 187-215.
- Flinterman, M., L. Guelen, et al. (2005). "E1A activates transcription of p73 and Noxa to induce apoptosis." *J Biol Chem* **280**(7): 5945-59.
- Fuchs, S. Y., B. Xie, et al. (1997). "c-Jun NH2-terminal kinases target the ubiquitination of their associated transcription factors." *J Biol Chem* **272**(51): 32163-8.
- Galluzzi, L., M. C. Maiuri, et al. (2007). "Cell death modalities: classification and pathophysiological implications." *Cell Death Differ* **14**(7): 1237-43.
- Galluzzi, L., N. Zamzami, et al. (2007). "Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis." *Apoptosis* **12**(5): 803-13.
- Gao, M. and M. Karin (2005). "Regulating the regulators: control of protein ubiquitination and ubiquitin-like modifications by extracellular stimuli." *Mol Cell* **19**(5): 581-93.
- Ghobrial, I. M., T. E. Witzig, et al. (2005). "Targeting apoptosis pathways in cancer therapy." *CA Cancer J Clin* **55**(3): 178-94.
- Giam, M., D. C. Huang, et al. (2009). "BH3-only proteins and their roles in programmed cell death." *Oncogene* **27** S128-36.
- Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction." *Physiol Rev* **82**(2): 373-428.
- Glickman, M. H., D. M. Rubin, et al. (1998). "A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3." *Cell* **94**(5): 615-23.
- Goldberg, A. L. (2003). "Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins." *Nature* **426**(6968): 895-9.
- Goldberg, A. L. (2005). "Nobel committee tags ubiquitin for distinction." *Neuron* **45**(3): 339-44.
- Goranov, S. E. and V. S. Goranova-Marinova (2005). "Bortezomib (Velcade)--a new therapeutic strategy for patients with refractory multiple myeloma." *Folia Med (Plovdiv)* **47**(3-4): 11-9.
- Gregory, M. A. and S. R. Hann (2000). "c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells." *Mol Cell Biol* **20**(7): 2423-35.
- Gregory, M. A., Y. Qi, et al. (2003). "Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization." *J Biol Chem* **278**(51): 51606-12.
- Gupta, S., T. Barrett, et al. (1996). "Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors." *Embo J* **15**(11): 2760-70.
- Gyrd-Hansen, M. and P. Meier (2010). "IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer." *Nat Rev Cancer* **10**(8): 561-74.

- Haglund, K. and I. Dikic (2005). "Ubiquitylation and cell signaling." *Embo J* **24**(19): 3353-9.
- Hai, T. and M. G. Hartman (2001). "The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis." *Gene* **273**(1): 1-11.
- Hai, T., C. D. Wolfgang, et al. (1999). "ATF3 and stress responses." *Gene Expr* **7**(4-6): 321-35.
- Hamilton, A. L., J. P. Eder, et al. (2005). "Proteasome inhibition with bortezomib (PS-341): a phase I study with pharmacodynamic end points using a day 1 and day 4 schedule in a 14-day cycle." *J Clin Oncol* **23**(25): 6107-16.
- Hann, S. R. (2006). "Role of post-translational modifications in regulating c-Myc proteolysis, transcriptional activity and biological function." *Semin Cancer Biol* **16**(4): 288-302.
- Haupt, Y., R. Maya, et al. (1997). "Mdm2 promotes the rapid degradation of p53." *Nature* **387**(6630): 296-9.
- Heasley, L. E. and S. Y. Han (2006). "JNK regulation of oncogenesis." *Mol Cells* **21**(2): 167-73.
- Hershko, T. and D. Ginsberg (2004). "Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis." *J Biol Chem* **279**(10): 8627-34.
- Hess, J., P. Angel, et al. (2004). "AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings." *J Cell Sci* **117**(Pt 25): 5965-73.
- Hetz, C. (2012). "The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond." *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(2): 89-102.
- Hibi, M., A. Lin, et al. (1993). "Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain." *Genes Dev* **7**(11): 2135-48.
- Hideshima, T., C. Mitsiades, et al. (2003). "Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341." *Blood* **101**(4): 1530-4.
- Hijikata, M., N. Kato, et al. (1990). "Molecular cloning and characterization of a cDNA for a novel phorbol-12-myristate-13-acetate-responsive gene that is highly expressed in an adult T-cell leukemia cell line." *J Virol* **64**(10): 4632-9.
- Hillengass, J., T. Moehler, et al. (2011). "Monoclonal gammopathy and smoldering multiple myeloma: diagnosis, staging, prognosis, management." *Recent Results Cancer Res* **183**: 113-31.
- Hitomi, J., T. Katayama, et al. (2004). "Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death." *J Cell Biol* **165**(3): 347-56.
- Hoffman, B. and D. A. Liebermann (2008). "Apoptotic signaling by c-MYC." *Oncogene* **27**(50): 6462-72.
- Hubner, A., T. Barrett, et al. (2008). "Multisite phosphorylation regulates Bim stability and apoptotic activity." *Mol Cell* **30**(4): 415-25.
- Hui, L., K. Zatloukal, et al. (2008). "Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation." *J Clin Invest* **118**(12): 3943-53.
- Ikeda, F. and I. Dikic (2008). "Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series." *EMBO Rep* **9**(6): 536-42.
- Irmeler, M., M. Thome, et al. (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." *Nature* **388**(6638): 190-5.

- Ito, Y., N. C. Mishra, et al. (2001). "Mitochondrial targeting of JNK/SAPK in the phorbol ester response of myeloid leukemia cells." *Cell Death Differ* **8**(8): 794-800.
- Itoh, M., M. Adachi, et al. (2002). "Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation." *Mol Endocrinol* **16**(10): 2382-92.
- Jariel-Encontre, I., G. Bossis, et al. (2008). "Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome." *Biochim Biophys Acta* **1786**(2): 153-77.
- Jeremias, I., C. Kupatt, et al. (1998). "Inhibition of nuclear factor kappaB activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells." *Blood* **91**(12): 4624-31.
- Johnson, G. L. and K. Nakamura (2007). "The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease." *Biochim Biophys Acta* **1773**(8): 1341-8.
- Johnstone, R. W., A. A. Ruefli, et al. (2002). "Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy." *Cell* **108**(2): 153-64.
- Jung, C. H., S. H. Ro, et al. (2010). "mTOR regulation of autophagy." *FEBS Lett* **584**(7): 1287-95.
- Kamada, Y., T. Funakoshi, et al. (2000). "Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex." *J Cell Biol* **150**(6): 1507-13.
- Karin, M. and Y. Ben-Neriah (2000). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity." *Annu Rev Immunol* **18**: 621-63.
- Karin, M. and E. Gallagher (2005). "From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance." *IUBMB Life* **57**(4-5): 283-95.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* **26**(4): 239-57.
- Kim, H., M. Rafiuddin-Shah, et al. (2006). "Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies." *Nat Cell Biol* **8**(12): 1348-58.
- Kim, J. Y., H. J. Ahn, et al. (2004). "BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha." *J Exp Med* **199**(1): 113-24.
- King, R. W., R. J. Deshaies, et al. (1996). "How proteolysis drives the cell cycle." *Science* **274**(5293): 1652-9.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, et al. (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." *Embo J* **14**(22): 5579-88.
- Kisselev, A. F., W. A. van der Linden, et al. (2012). "Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target." *Chem Biol* **19**(1): 99-115.
- Komander, D., M. J. Clague, et al. (2009). "Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(8): 550-63.
- Kondagunta, G. V., B. Drucker, et al. (2004). "Phase II trial of bortezomib for patients with advanced renal cell carcinoma." *J Clin Oncol* **22**(18): 3720-5.
- Kroemer, G. and B. Levine (2008). "Autophagic cell death: the story of a misnomer." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(12): 1004-10.
- Kuan, C. Y., D. D. Yang, et al. (1999). "The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development." *Neuron* **22**(4): 667-76.
- Kumar, S. K., S. V. Rajkumar, et al. (2008). "Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies." *Blood* **111**(5): 2516-20.
- Kuwana, T., M. R. Mackey, et al. (2002). "Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane." *Cell* **111**(3): 331-42.

- Lara, P. N., Jr., K. Chansky, et al. (2006). "Bortezomib (PS-341) in relapsed or refractory extensive stage small cell lung cancer: a Southwest Oncology Group phase II trial (S0327)." *Thorac Oncol* **1**(9): 996-1001.
- Lassot, I., E. Segéral, et al. (2001). "ATF4 degradation relies on a phosphorylation-dependent interaction with the SCF(betaTrCP) ubiquitin ligase." *Mol Cell Biol* **21**(6): 2192-202.
- Lauber, K., S. G. Blumenthal, et al. (2004). "Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses." *Mol Cell* **14**(3): 277-87.
- Lauricella, M., S. Emanuele, et al. (2006). "JNK and AP-1 mediate apoptosis induced by bortezomib in HepG2 cells via FasL/caspase-8 and mitochondria-dependent pathways." *Apoptosis* **11**(4): 607-25.
- Lavin, M. F. and N. Gueven (2006). "The complexity of p53 stabilization and activation." *Cell Death Differ* **13**(6): 941-50.
- Lawler, S., Y. Fleming, et al. (1998). "Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro." *Curr Biol* **8**(25): 1387-90.
- Lee, D. H. and A. L. Goldberg (1998). "Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists." *Trends Cell Biol* **8**(10): 397-403.
- Lei, K. and R. J. Davis (2003). "JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2432-7.
- Leibowitz, B. and J. Yu (2010). "Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family." *Cancer Biol Ther* **9**(6): 417-22.
- Levine, B. and D. J. Klionsky (2004). "Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy." *Dev Cell* **6**(4): 463-77.
- Li, C. C., R. M. Dai, et al. (1995). "Inactivation of NF-kappa B inhibitor I kappa B alpha: ubiquitin-dependent proteolysis and its degradation product." *Biochem Biophys Res Commun* **215**(1): 292-301.
- Li, H., H. Zhu, et al. (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." *Cell* **94**(4): 491-501.
- Li, J. and J. Yuan (2008). "Caspases in apoptosis and beyond." *Oncogene* **27**(48): 6194-206.
- Li, Y., Y. Zhao, et al. (2012). "DNA-PKcs-mediated stabilization of p53 by JNK2 is involved in arsenite-induced DNA damage and apoptosis in human embryo lung fibroblast cells." *Toxicol Lett* **210**(3): 302-10.
- Lin, A., A. Minden, et al. (1995). "Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2." *Science* **268**(5208): 286-90.
- Liu, X., C. N. Kim, et al. (1996). "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." *Cell* **86**(1): 147-57.
- Lomonosova, E. and G. Chinnadurai (2008). "BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview." *Oncogene* **27 Suppl 1**: S2-19.
- Lu, X., S. Nemoto, et al. (1997). "Identification of c-Jun NH2-terminal protein kinase (JNK)-activating kinase 2 as an activator of JNK but not p38." *J Biol Chem* **272**(40): 24751-4.
- Luo, X., I. Budihardjo, et al. (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." *Cell* **94**(4): 481-90.
- Ly, J. D., D. R. Grubb, et al. (2003). "The mitochondrial membrane potential (deltapsi(m)) in apoptosis; an update." *Apoptosis* **8**(2): 115-28.
- Lynch, J. T., R. Rajendran, et al. (2010). "The role of glucocorticoid receptor phosphorylation in Mcl-1 and NOXA gene expression." *Mol Cancer* **9**: 38.

- Maki, R. G., A. S. Kraft, et al. (2005). "A multicenter Phase II study of bortezomib in recurrent or metastatic sarcomas." *Cancer* **103**(7): 1431-8.
- Manning, A. M. and R. J. Davis (2003). "Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold?" *Nat Rev Drug Discov* **2**(7): 554-65.
- Marino, G. and C. Lopez-Otin (2004). "Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology." *Cell Mol Life Sci* **61**(12): 1439-54.
- Martin, J. H., A. A. Mohit, et al. (1996). "Developmental expression in the mouse nervous system of the p493F12 SAP kinase." *Brain Res Mol Brain Res* **35**(1-2): 47-57.
- Martinez-Caballero, S., L. M. Dejean, et al. (2009). "Assembly of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC." *J Biol Chem* **284**(18): 12235-45.
- Martinon, F. and J. Tschopp (2007). "Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation." *Cell Death Differ* **14**(1): 10-22.
- Martinou, J. C. and R. J. Youle (2011). "Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics." *Dev Cell* **21**(1): 92-101.
- Mathai, J. P., M. Germain, et al. (2005). "BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca<sup>2+</sup> from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death." *J Biol Chem* **280**(25): 23829-36.
- Matsuguchi, T., N. Chiba, et al. (2009). "JNK activity is essential for Atf4 expression and late-stage osteoblast differentiation." *J Bone Miner Res* **24**(3): 398-410.
- Matsui, H., H. Asou, et al. (2007). "Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat-shock cognate protein 70." *Mol Cell* **25**(1): 99-112.
- McCommis, K. S. and C. P. Baines (2012). "The role of VDAC in cell death: Friend or foe?" *Biochim Biophys Acta* **1818**(6): 1444-50.
- Miao, E. A., J. V. Rajan, et al. (2011). "Caspase-1-induced pyroptotic cell death." *Immunol Rev* **243**(1): 206-14.
- Mitsiades, N., C. S. Mitsiades, et al. (2002). "Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(22): 14374-9.
- Miyashita, T., S. Krajewski, et al. (1994). "Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo." *Oncogene* **9**(6): 1799-805.
- Mizushima, N. and M. Komatsu (2011). "Autophagy: renovation of cells and tissues." *Cell* **147**(4): 728-41.
- Moehler, T. and H. Goldschmidt (2011). "Therapy of relapsed and refractory multiple myeloma." *Recent Results Cancer Res* **183**: 239-71.
- Molineaux, S. M., F. J. Casano, et al. (1993). "Interleukin 1 beta (IL-1 beta) processing in murine macrophages requires a structurally conserved homologue of human IL-1 beta converting enzyme." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(5): 1809-13.
- Momand, J., H. H. Wu, et al. (2000). "MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein." *Gene* **242**(1-2): 15-29.
- Momoi, T. (2004). "Caspases involved in ER stress-mediated cell death." *J Chem Neuroanat* **28**(1-2): 101-5.
- Mujtaba, T. and Q. P. Dou (2011). "Advances in the understanding of mechanisms and therapeutic use of bortezomib." *Discov Med* **12**(67): 471-80.
- Murray, A. W. (2004). "Recycling the cell cycle: cyclins revisited." *Cell* **116**(2): 221-34.
- Muzio, M., B. R. Stockwell, et al. (1998). "An induced proximity model for caspase-8 activation." *J Biol Chem* **273**(5): 2926-30.
- Nakagawa, T., S. Shimizu, et al. (2005). "Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death." *Nature* **434**(7033): 652-8.
- Nakagawa, T., H. Zhu, et al. (2000). "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta." *Nature* **403**(6765): 98-103.

- Nakano, K. and K. H. Vousden (2001). "PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53." *Mol Cell* **7**(3): 683-94.
- Nakata, W., Y. Hayakawa, et al. (2011). "Anti-tumor activity of the proteasome inhibitor bortezomib in gastric cancer." *Int J Oncol* **39**(6): 1529-36.
- Nechushtan, A., C. L. Smith, et al. (1999). "Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death." *Embo J* **18**(9): 2330-41.
- Neise, D., D. Sohn, et al. (2010). "Evidence for a differential modulation of p53-phosphorylating kinases by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1." *Cell Cycle* **9**(17): 3575-83.
- Nencioni, A., F. Hua, et al. (2005). "Evidence for a protective role of Mcl-1 in proteasome inhibitor-induced apoptosis." *Blood* **105**(8): 3255-62.
- Nicoletti, I., G. Migliorati, et al. (1991). "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." *J Immunol Methods* **139**(2): 271-9.
- Nikiforov, M. A., M. Riblett, et al. (2007). "Tumor cell-selective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome inhibition." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(49): 19488-93.
- Nishina, H., T. Wada, et al. (2004). "Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway." *J Biochem* **136**(2): 123-6.
- Noguchi, K., C. Kitanaka, et al. (1999). "Regulation of c-Myc through phosphorylation at Ser-62 and Ser-71 by c-Jun N-terminal kinase." *J Biol Chem* **274**(46): 32580-7.
- Nys, K., A. Van Laethem, et al. (2010). "A p38(MAPK)/HIF-1 pathway initiated by UVB irradiation is required to induce Noxa and apoptosis of human keratinocytes." *J Invest Dermatol* **130**(9): 2269-76.
- Obeng, E. A., L. M. Carlson, et al. (2006). "Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells." *Blood* **107**(12): 4907-16.
- Obexer, P., K. Geiger, et al. (2007). "FKHRL1-mediated expression of Noxa and Bim induces apoptosis via the mitochondria in neuroblastoma cells." *Cell Death Differ* **14**(3): 534-47.
- Oda, E., R. Ohki, et al. (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." *Science* **288**(5468): 1053-8.
- Ola, M. S., M. Nawaz, et al. (2011). "Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis." *Mol Cell Biochem* **351**(1-2): 41-58.
- Orrenius, S., B. Zhivotovsky, et al. (2003). "Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(7): 552-65.
- Ow, Y. P., D. R. Green, et al. (2008). "Cytochrome c: functions beyond respiration." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(7): 532-42.
- Pelengaris, S., M. Khan, et al. (2002). "c-MYC: more than just a matter of life and death." *Nat Rev Cancer* **2**(10): 764-76.
- Perez-Galan, P., G. Roue, et al. (2006). "The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status." *Blood* **107**(1): 257-64.
- Ping Duo, Q. (2011). "Proteasome inhibition in cancer therapy." *Nat Rev Cancer Poster* **11**(12).
- Pulverer, B. J., J. M. Kyriakis, et al. (1991). "Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases." *Nature* **353**(6345): 670-4.
- Ravichandran, K. S. (2010). "Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums." *J Exp Med* **207**(9): 1807-17.
- Ravichandran, K. S. and U. Lorenz (2007). "Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal." *Nat Rev Immunol* **7**(12): 964-74.

- Ravikumar, B., S. Sarkar, et al. (2010). "Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology." *Physiol Rev* **90**(4): 1383-435.
- Read, M. A., A. S. Neish, et al. (1995). "The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial-leukocyte adhesion molecule expression." *Immunity* **2**(5): 493-506.
- Rechsteiner, M. and S. W. Rogers (1996). "PEST sequences and regulation by proteolysis." *Trends Biochem Sci* **21**(7): 267-71.
- Richardson, P. G., E. Weller, et al. (2010). "Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma." *Blood* **116**(5): 679-86.
- Riedl, S. J. and G. S. Salvesen (2007). "The apoptosome: signalling platform of cell death." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(5): 405-13.
- Riedl, S. J. and Y. Shi (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(11): 897-907.
- Roccaro, A. M., T. Hideshima, et al. (2006). "Bortezomib as an antitumor agent." *Curr Pharm Biotechnol* **7**(6): 441-8.
- Rock, K. L. and A. L. Goldberg (1999). "Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides." *Annu Rev Immunol* **17**: 739-79.
- Rock, K. L., C. Gramm, et al. (1994). "Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules." *Cell* **78**(5): 761-71.
- Rogatsky, I., S. K. Logan, et al. (1998). "Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-terminal kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2050-5.
- Russo, A., G. Bronte, et al. (2010). "Bortezomib: a new pro-apoptotic agent in cancer treatment." *Curr Cancer Drug Targets* **10**(1): 55-67.
- Sabapathy, K., K. Hochedlinger, et al. (2004). "Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation." *Mol Cell* **15**(5): 713-25.
- Sabapathy, K., Y. Hu, et al. (1999). "JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development." *Curr Biol* **9**(3): 116-25.
- Sabapathy, K., W. Jochum, et al. (1999). "Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2." *Mech Dev* **89**(1-2): 115-24.
- Sakurai, T., S. Maeda, et al. (2006). "Loss of hepatic NF-kappa B activity enhances chemical hepatocarcinogenesis through sustained c-Jun N-terminal kinase 1 activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(28): 10544-51.
- Salvesen, G. S. and A. Ashkenazi (2011). "Snapshot: caspases." *Cell* **147**(2): 476-476 e1.
- Salvesen, G. S. and V. M. Dixit (1999). "Caspase activation: the induced-proximity model." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 10964-7.
- Scaffidi, C., S. Fulda, et al. (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." *Embo J* **17**(6): 1675-87.
- Schinzel, A. C., O. Takeuchi, et al. (2005). "Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(34): 12005-10.
- Schroder, M. and R. J. Kaufman (2005). "The mammalian unfolded protein response." *Annu Rev Biochem* **74**: 739-89.
- Schutze, S., V. Tchikov, et al. (2008). "Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(8): 655-62.

- Schwartz, R. and T. Davidson (2004). "Pharmacology, pharmacokinetics, and practical applications of bortezomib." *Oncology (Williston Park)* **18**(14 Suppl 11): 14-21.
- Schweichel, J. U. and H. J. Merker (1973). "The morphology of various types of cell death in prenatal tissues." *Teratology* **7**(3): 253-66.
- Shamas-Din, A., H. Brahmabhatt, et al. (2010). "BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis." *Biochim Biophys Acta* **1813**(4): 508-20.
- Shaulian, E. and M. Karin (2002). "AP-1 as a regulator of cell life and death." *Nat Cell Biol* **4**(5): E131-6.
- She, Q. B., N. Chen, et al. (2002). "Deficiency of c-Jun-NH(2)-terminal kinase-1 in mice enhances skin tumor development by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate." *Cancer Res* **62**(5): 1343-8.
- Shen, H. M. and P. Codogno (2011). "Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species?" *Autophagy* **7**(5): 457-65.
- Shieh, S. Y., M. Ikeda, et al. (1997). "DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2." *Cell* **91**(3): 325-34.
- Shin, H. J., M. S. Choi, et al. (2010). "Manganese-mediated up-regulation of HIF-1alpha protein in Hep2 human laryngeal epithelial cells via activation of the family of MAPKs." *Toxicol In Vitro* **24**(4): 1208-14.
- Shoshan-Barmatz, V., N. Keinan, et al. (2010). "Apoptosis is regulated by the VDAC1 N-terminal region and by VDAC oligomerization: release of cytochrome c, AIF and Smac/Diablo." *Biochim Biophys Acta* **1797**(6-7): 1281-91.
- Shringarpure, R., L. Catley, et al. (2006). "Gene expression analysis of B-lymphoma cells resistant and sensitive to bortezomib." *Br J Haematol* **134**(2): 145-56.
- Siegel, M. R. and H. D. Sisler (1964). "Site of Action of Cycloheximide in Cells of *Saccharomyces Pastorianus*. Ii. the Nature of Inhibition of Protein Synthesis in a Cell-Free System." *Biochim Biophys Acta* **87**: 83-9.
- Snyder, C. M., E. H. Shroff, et al. (2009). "Nitric oxide induces cell death by regulating anti-apoptotic BCL-2 family members." *PLoS One* **4**(9): e7059.
- Sun, Y., T. Yang, et al. (2007). "The JNK pathway and neuronal migration." *J Genet Genomics* **34**(11): 957-65.
- Tabas, I. and D. Ron (2011). "Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress." *Nat Cell Biol* **13**(3): 184-90.
- Tait, S. W. and D. R. Green (2010). "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(9): 621-32.
- Tan, T. T., K. Degenhardt, et al. (2005). "Key roles of BIM-driven apoptosis in epithelial tumors and rational chemotherapy." *Cancer Cell* **7**(3): 227-38.
- Tani, E., H. Kitagawa, et al. (2001). "Proteasome inhibitors induce Fas-mediated apoptosis by c-Myc accumulation and subsequent induction of FasL message in human glioma cells." *FEBS Lett* **504**(1-2): 53-8.
- Tanoue, T., M. Adachi, et al. (2000). "A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators." *Nat Cell Biol* **2**(2): 110-6.
- Tanoue, T. and E. Nishida (2003). "Molecular recognitions in the MAP kinase cascades." *Cell Signal* **15**(5): 455-62.
- Thompson, M. R., D. Xu, et al. (2009). "ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer." *J Mol Med (Berl)* **87**(11): 1053-60.
- Thornberry, N. A. (1997). "The caspase family of cysteine proteases." *Br Med Bull* **53**(3): 478-90.
- Thornberry, N. A., H. G. Bull, et al. (1992). "A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes." *Nature* **356**(6372): 768-74.

- Tinel, A. and J. Tschopp (2004). "The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress." *Science* **304**(5672): 843-6.
- Todaró, G. J. and H. Green (1963). "Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines." *J Cell Biol* **17**: 299-313.
- Tournier, C., P. Hess, et al. (2000). "Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway." *Science* **288**(5467): 870-4.
- Tsujimoto, Y., J. Cossman, et al. (1985). "Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma." *Science* **228**(4706): 1440-3.
- Tsukada, M. and Y. Ohsumi (1993). "Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Lett* **333**(1-2): 169-74.
- Upton, J. P., K. Austgen, et al. (2008). "Caspase-2 cleavage of BID is a critical apoptotic signal downstream of endoplasmic reticulum stress." *Mol Cell Biol* **28**(12): 3943-51.
- Urano, F., X. Wang, et al. (2000). "Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1." *Science* **287**(5453): 664-6.
- Vandenabeele, P., W. Declercq, et al. (2010). "The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis." *Sci Signal* **3**(115): re4.
- Vandenabeele, P., L. Galluzzi, et al. (2010). "Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(10): 700-14.
- Vaux, D. L., S. Cory, et al. (1988). "Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells." *Nature* **335**(6189): 440-2.
- Ventura, J. J., A. Hubner, et al. (2006). "Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK." *Mol Cell* **21**(5): 701-10.
- Verma, S., L. J. Zhao, et al. (2001). "Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis." *J Biol Chem* **276**(7): 4671-6.
- Vervoorts, J., J. Luscher-Firzlaff, et al. (2006). "The ins and outs of MYC regulation by posttranslational mechanisms." *J Biol Chem* **281**(46): 34725-9.
- Veschini, L., D. Belloni, et al. (2007). "Hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha determines sensitivity of endothelial cells to the proteasome inhibitor bortezomib." *Blood* **109**(6): 2565-70.
- Vicent, S., M. Garayoa, et al. (2004). "Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and is an independent predictor of outcome in patients." *Clin Cancer Res* **10**(11): 3639-49.
- Vila, M. and S. Przedborski (2003). "Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases." *Nat Rev Neurosci* **4**(5): 365-75.
- Vivanco, I., N. Palaskas, et al. (2007). "Identification of the JNK signaling pathway as a functional target of the tumor suppressor PTEN." *Cancer Cell* **11**(6): 555-69.
- Voorhees, P. M., E. C. Dees, et al. (2003). "The proteasome as a target for cancer therapy." *Clin Cancer Res* **9**(17): 6316-25.
- Vucic, D., V. M. Dixit, et al. (2011). "Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death." *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(7): 439-52.
- Wagner, E. F. and A. R. Nebreda (2009). "Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development." *Nat Rev Cancer* **9**(8): 537-49.
- Wallace, A. D. and J. A. Cidlowski (2001). "Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids." *J Biol Chem* **276**(46): 42714-21.

- Wang, H. Y., Z. Cheng, et al. (2003). "Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer." *Cancer Lett* **191**(2): 229-37.
- Wang, P., W. Yu, et al. (2008). "Involvement of JNK/p73/NOXA in vitamin E analog-induced apoptosis of human breast cancer cells." *Mol Carcinog* **47**(6): 436-45.
- Wang, Q., H. Mora-Jensen, et al. (2009). "ERAD inhibitors integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(7): 2200-5.
- Wang, T. H., H. S. Wang, et al. (2000). "Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together." *Cancer* **88**(11): 2619-28.
- Wang, Z., M. H. Malone, et al. (2003). "Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis." *J Biol Chem* **278**(26): 23861-7.
- Wei, M. C., W. X. Zong, et al. (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." *Science* **292**(5517): 727-30.
- Weidemann, A. and R. S. Johnson (2008). "Biology of HIF-1alpha." *Cell Death Differ* **15**(4): 621-7.
- Weidenfeld-Baranboim, K., L. Koren, et al. (2011). "Phosphorylation of JDP2 on threonine-148 by the c-Jun N-terminal kinase targets it for proteosomal degradation." *Biochem J* **436**(3): 661-9.
- Weston, C. R., A. Wong, et al. (2004). "The c-Jun NH2-terminal kinase is essential for epidermal growth factor expression during epidermal morphogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(39): 14114-9.
- Whitmarsh, A. J. and R. J. Davis (2007). "Role of mitogen-activated protein kinase kinase 4 in cancer." *Oncogene* **26**(22): 3172-84.
- Willis, S. N., J. I. Fletcher, et al. (2007). "Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak." *Science* **315**(5813): 856-9.
- Wu, G. S. (2007). "Role of mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) in cancer." *Cancer Metastasis Rev* **26**(3-4): 579-85.
- Wu, W. K., C. H. Cho, et al. (2009). "Proteasome inhibition: a new therapeutic strategy to cancer treatment." *Cancer Lett* **293**(1): 15-22.
- Wyllie, A. H., J. F. Kerr, et al. (1980). "Cell death: the significance of apoptosis." *Int Rev Cytol* **68**: 251-306.
- Xie, Y. (2010). "Structure, assembly and homeostatic regulation of the 26S proteasome." *J Mol Cell Biol* **2**(6): 308-17.
- Yang, D. D., D. Conze, et al. (1998). "Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2." *Immunity* **9**(4): 575-85.
- Yang, D. D., C. Y. Kuan, et al. (1997). "Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene." *Nature* **389**(6653): 865-70.
- Yang, Y., T. Ikezoe, et al. (2004). "Proteasome inhibitor PS-341 induces growth arrest and apoptosis of non-small cell lung cancer cells via the JNK/c-Jun/AP-1 signaling." *Cancer Sci* **95**(2): 176-80.
- Yin, D., H. Zhou, et al. (2005). "Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM)." *Oncogene* **24**(3): 344-54.
- Yoshida, S., K. Fukino, et al. (2001). "The c-Jun NH2-terminal kinase3 (JNK3) gene: genomic structure, chromosomal assignment, and loss of expression in brain tumors." *J Hum Genet* **46**(4): 182-7.
- Yu, D., M. Carroll, et al. (2007). "p53 status dictates responses of B lymphomas to monotherapy with proteasome inhibitors." *Blood* **109**(11): 4936-43.

- Yun, S. P., M. Y. Lee, et al. (2009). "Role of HIF-1alpha and VEGF in human mesenchymal stem cell proliferation by 17beta-estradiol: involvement of PKC, PI3K/Akt, and MAPKs." *Am J Physiol Cell Physiol* **296**(2): C317-26.
- Zha, J., H. Harada, et al. (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**(4): 619-28.
- Zhang, H., Z. Zuo, et al. (2012). "MiR-25 regulates apoptosis by targeting Bim in human ovarian cancer." *Oncol Rep* **27**(2): 594-8.
- Zhou, H., A. Lin, et al. (2000). "12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphatase renders immortalized or transformed epithelial cells refractory to TPA-inducible JNK activity." *J Biol Chem* **275**(30): 22868-75.
- Zhou, L. and D. C. Chang (2008). "Dynamics and structure of the Bax-Bak complex responsible for releasing mitochondrial proteins during apoptosis." *J Cell Sci* **121**(Pt 13): 2186-96.
- Zhu, H., L. Zhang, et al. (2005). "Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by bortezomib (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors." *Oncogene* **24**(31): 4993-9.
- Zimmermann, J., D. Erdmann, et al. (2000). "Proteasome inhibitor induced gene expression profiles reveal overexpression of transcriptional regulators ATF3, GADD153 and MAD1." *Oncogene* **19**(25): 2913-20.

**7.**

***Abkürzungs-  
verzeichnis***

---

**Abkürzungsverzeichnis**

3T3	<i>3-Day Transfer, Inoculum 3 x 10<sup>5</sup> cells</i>
Bfl-1/A1	<i>Bcl-2-related Protein A1</i>
Ab-1	<i>Antibody-1</i>
Abb.	Abbildung
Act D	Actinomycin D
ALLM	N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-methional
ALLN	N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic Peptidase Activating Factor 1</i>
APS	<i>Ammoniumperoxodisulfat</i>
ASK	<i>Apoptosis Signal-regulating Kinase</i>
ATF	<i>Activating Transcription Factor</i>
ATG	<i>Autophagy-related Genes</i>
ATP/dATP	Adenosintriphosphat/Desoxyadenosintriphosphat
Bad	<i>Bcl-2-associated Agonist of Cell Death</i>
Bak	<i>Bcl-2 Antagonist/Killer 1</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X Protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
Bcl-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BH-Domäne	Bcl-2 Homologie Domäne
Bik	<i>Bcl-2-interacting killer</i>
Bim EL/L	<i>Bcl-2-interacting Mediator of Cell Death Extralong/Long</i>
Bmf	<i>Bcl-2-modifying Factor</i>
Bnip3	<i>Bcl-2/Adenovirus E1B 19kDa Interacting Protein 3</i>
Bok	<i>Bcl-2-related Ovarian Killer</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bZIP	<i>basic Region Leucine Zipper</i>
C/EBP	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein</i>
CARD	<i>Caspase Recruiting Domain</i>
Casp	Caspase
CD3	<i>Cluster of Differentiation 3</i>

---

CD95	<i>Cluster of Differentiation 95</i>
CD-Domäne	<i>Common Docking Domain</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent Kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cFLIP	<i>cellular FLICE-inhibitory Protein</i>
Chop	<i>C/EBP-homologous Protein</i>
Chx	Cycloheximid
clAP	<i>cellular Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
Cisplatin	cis-Diammindichloroplatin (II)
c-Myc	<i>v-Myc Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog</i>
CREB	<i>cAMP Responsive Element Binding Protein</i>
Cyt c	Cytochrom c
D-Domänen	<i>Docking Domain</i>
DED	<i>Death Effector Domain</i>
DEN	<i>Diethylnitrosamin</i>
DEVD-amc	<i>N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aminomethylcoumarin</i>
DISC	<i>Death Inducing Signaling Complex</i>
DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]anthracen
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	<i>Death Receptor</i>
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
DUB	<i>Deubiquitinating Enzyme</i>
E2F1	<i>E2F Transcription Factor</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FADD	<i>Fas-associating Death Domain-containing Protein</i>
FasL	Fas Ligand
FLICE	<i>FADD-like ICE</i>

---

Fos	<i>FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
FoxO	<i>Forkhead Box O1</i>
g	Gramm
G1/G2	<i>Gap-1/Gap-2</i>
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GR	Glucocorticoidrezeptor
HIF	<i>Hypoxia-inducible Factor</i>
Hrk	Harakiri
hVH5/DUSP8	<i>Homologue of Vaccinia Virus H1 Phosphatase Gene Clone 5/ Dual Specificity Phosphatase 8</i>
ICE	<i>IL-1 Beta-converting Enzyme</i>
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
IPS	<i>Inhibitors of the Proteasomal System</i>
IRE1a	<i>Inositol Requiring Enzyme 1a</i>
Itch	<i>Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase</i>
I $\kappa$ B	<i>Inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B</i>
JIP	<i>JNK-interacting Protein 2</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
JunD	<i>Jun D Proto-Oncogene</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Kon	Kontrolle
M	Molar
MAC	<i>Mitochondrial Apoptosis-induced Channel</i>
Maf	<i>v-Maf Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK/MKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPK-Kinase-Kinase
Mcl-1	<i>Myeloid Cell Leukemia Sequence 1</i>
Mda	<i>MAX Dimerization Protein</i>
MDa	Megadalton
MDM2	<i>Mouse Double Mutant 2</i>

---

MEF	murine embryonale Fibroblasten
MEKK	MAP/ERK-Kinase-Kinase
MHCI	<i>Major Histocompatibility Complex Class I</i>
MKP	<i>Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase</i>
MLK	<i>Mixed Lineage Kinase</i>
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	micro-RNA
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
n	Anzahl
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T-Cells</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-cells</i>
NT	N-Terminus
p	Wahrscheinlichkeit
PA200	<i>Proteasome Activator 200 kDa</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEST	<i>Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T)</i>
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetat
PMAIP1	<i>Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-induced Protein 1</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POSH	<i>Plenty of SH3s</i>
Pro	Prolin
PTPC	<i>Permeability Transition Pore Complexes</i>
Puma	<i>p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QVD	Quinoline-Valin-Aspartat-CH <sub>2</sub> -O-Ph
RIP	<i>Receptor-Interacting Protein</i>
RISC	<i>RNA-induced Silencing Complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>

---

rRNA	ribosomale RNA
s.	siehe
S	Svedberg-Einheit
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
siRNA	<i>small-interfering RNA</i>
Smac/DIABLO	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/ Direct IAP-binding Mitochondrial Protein</i>
S-Phase	Synthese-Phase
Standardabw.	Standardabweichung
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
$\alpha$ -TAE	<i><math>\alpha</math>-Tocopherol Ether-linked Acetic Acid Analog</i>
tBID	<i>truncated BH3-interacting Domain Death Agonist</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T <sub>H</sub> 1/2	T-Helfer-Zelle 1/2
Thr/T	Threonin
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	<i>TNF Receptor-associated Factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related Apoptosis-inducing Ligand</i>
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
tRNA	<i>transfer-RNA</i>
Tyr/Y	Tyrosin
UBA	<i>Ubiquitin-associated Domain-containing Protein</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
UV	Ultraviolett
VDAC	<i>Voltage-dependent Anion-selective Channel Protein</i>
WB	Western Blot
XIAP	<i>X-linked Inhibitor of Apoptosis</i>
$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotenzial

# ***8. Anhang***

---

**Sabine Pietkiewicz**

**07/03/1984** geboren in Hildesheim

**08/1990-06/1994** Besuch der Erich-Kästner-Grundschule, Mönchengladbach

**08/1994-06/2003** Besuch des Hugo-Junkers-Gymnasiums, Mönchengladbach  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

**10/2003-07/2008** Studium der Biologie  
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf  
Abschluss: Diplom  
Note: ausgezeichnet

Diplomarbeit am Institut für Molekulare Medizin  
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Leitung: Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff

Thema: „Die Rolle der Stress-aktivierten Proteinkinase  
(SAPK/JNK) in Todesrezeptor-induzierter Apoptose“  
Note: 1,0

**seit 09/2008** Promotion im Labor für Molekulare Radioonkologie der  
Klinik u. Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie  
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Leitung: Prof. Dr. Reiner U. Jänicke

## **Kongressbeiträge**

**S. Pietkiewicz**, D. Sohn, K. Schulze-Osthoff und R. U. Jänicke

“Differential role of JNK isoforms in TNF $\alpha$ -mediated cell death pathways”

6<sup>th</sup> European Workshop on Cell Death, Juni 2008, Hauenstein, Deutschland

## **Publikationen**

**S. Pietkiewicz**, D. Sohn, K. Sabapathy und R. U. Jänicke

“Proteasome inhibitors require JNK1 to induce two distinct apoptosis pathways that either depend on c-Myc or Noxa”

(in Revision bei PLoS ONE)

**S. Pietkiewicz**, D. Sohn, K. Sabapathy, K. Schulze-Osthoff und R. U. Jänicke

„JNK-Isoforms differentially regulate TNF $\alpha$ -induced cell death modes“

(in Vorbereitung)

## Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Professor Jänicke für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit im Labor für Molekulare Radioonkologie durchzuführen. Ich möchte mich herzlich für die komplexe und interessante Aufgabenstellung, seine stetige Mithilfe und wissenschaftliche Betreuung sowie seine große Geduld bedanken.

Für die freundliche Übernahme des Koreferats und die aufmunternden Worte in der letzten Phase der Doktorarbeit danke ich Herrn Professor Kassack herzlich.

Ein lieber Dank gilt Dennis für die gute Zusammenarbeit, die Einführung in die Wissenschaftsarbeit und seine prompte und motivierte Hilfestellung bei experimentellen Problemen.

So manches Lachen war im Schreibraum und im Labor zu vernehmen – dank Denise, Christine, Stephan, Andrea und Dennis und den sympathischen Kollegen der Molekularen Medizin. Es war eine schöne Zeit mit ihnen und ich danke herzlich für ihre Hilfsbereitschaft, die Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ich freue mich, wenn wir auch weiterhin den einen oder anderen Abend zusammen verbringen werden.

Ein Dank geht auch an J. B. Weitzman für den Leitspruch dieser Doktorarbeit: *„As long as your JNKs are intact, you are prepared for any stressful situation.“*

Ein zentrales Tagesereignis war der Gang in die Mensa, nicht wegen des Essens, sondern wegen der Möglichkeit zu einem guten Pläuschchen mit Denise, Annette, Kim, Florian und Ulf. Danke für die tägliche Auszeit, es wird schwer, dafür einen adäquaten Ersatz zu finden.

*„Das schönste Geschenk, das die Götter den Menschen verliehen, ist die Freundschaft“* (Marcus Tullius Cicero). Die Götter schickten mir Isa, Anna, Jörg, Evelyn, Angela, Markus, Christian, Clara, Volker, Lars, Stefan und Silke. Ich möchte mich für ihren Beistand und ihr Verständnis bedanken, dass ich in den letzten vier Jahren nicht so viel Zeit mit ihnen verbringen konnte, wie ich mir gewünscht habe.

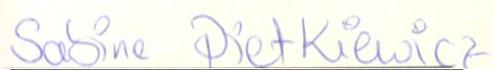
Ich danke Marc für vieles. Die unbedingte Unterstützung in jeder Situation, das Wagnis eine Fernbeziehung einzugehen sowie seine Liebe. Ohne Marc wären die letzten vier Jahre nur halb so schön gewesen. Mindestens.

Ich empfinde meinen Eltern gegenüber eine tiefe Dankbarkeit für ihre Liebe, ihr Interesse und die stete Fürsorge sowie ihre bedingungslose Unterstützung in jeder Lebenslage – deshalb ist ihnen diese Arbeit gewidmet.

**Erklärung**

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der hier vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 29.05.2012



Sabine Pietkiewicz