Molekulare Analyse der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose und der Therapieresistenz

Inaugural-Dissertation

zur

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

> vorgelegt von Katja Janßen aus Mülheim (Ruhr)

> > April 2008

Aus dem Institut für Molekulare Medizin der Heinrich-Heine-Universität

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

Referent:	Prof. Dr. Heinz Mehlhorn
	Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und
	Parasitologie
	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Koreferent	Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff
	Institut für Molekulare Medizin
	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung:16.06.2008

Meinen Eltern und Großeltern

1. Einleitung	1
1.1 Zelltodmechanismen in Eukaryonten	1
1.2 Apoptose und Apoptosemediatoren	3
1.2.1 Todesrezeptoren	4
1.2.2 Caspasen	5
1.2.3 Die Bcl-2-Familie	7
1.3 Der extrinsische Apoptosesignalweg	8
1.3.1 Signaltransduktion der Todesrezeptoren	8
1.4 Der intrinsische Apoptosesignalweg	10
1.4.1 Signaltransduktion der Mitochondrien-vermittelten Apoptose	10
1.5 Autophagie und Autophagiemodulatoren	12
1.5.1 Autophagie	12
1.5.2 Autophagiemodulatoren	13
1.5.2.1 Beclin-1 und Phosphatidylinositol 3-Kinase	13
1.5.2.2 Der mTor Signalweg und die Bildung von Autophagosomen durch Atg-	
Proteine	13
1.6 Organell-spezifische Induktion von Zelltod	14
1.6.1 ER-Stress und Apoptoseinduktion	15
1.6.2 ER-Stress und Autophagie-Induktion	18
1.6.3 ER-Stress induzierende Agenzien	19
1.7 Chemotherapeutika	21
1.7.1 Taxol und Apoptoseinduktion	22
2. Zielsetzung	27
2.1 Mechanismus der Taxol-induzierten Apoptose	27
2.2 Induktion von Zelltod nach ER-Stress	28
3.1 Material	30
3.1.1 Chemikalien	30
3.1.2 Eukaryontische Zellen	30
3.1.3 Bakterienstämme	31
3.1.4 Primäre Antikörper	32
3.1.5 Sekundäre Antikörper (Meerrettich-Peroxidase-konjugiert)	32
3.1.6 Sekundäre Antikörper (Fluoreszenz-markiert)	33
3.1.7 Größenstandards	33
3.2 Methoden	34
3.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen	34
3.2.2 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen	34

3.2.3 Herstellung und Lagerung von Zellpellets	34
3.2.4 Fluoreszenzmikroskopie	34
3.2.5 Elektronenmikroskopie	35
3.2.6 Zytotoxizitäts-Tests	35
3.2.7 Durchflusszytometrie	36
3.2.7.1 Nachweis von Zelltod durch Propidiumiodid-Ausschluss	36
3.2.7.2 Nachweis von Apoptose nach Nicoletti	36
3.2.7.3 Nachweis von Apoptose durch Annexin V-Bindung	36
3.2.7.4 Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi$ m)	37
3.2.7.5 Durchflusszytometrischer Nachweis der Cytochrom c-Freisetzung	37
3.2.7.6 Acridinorange-Färbung	
3.2.8 Klonogenitäts-Tests	
3.2.9 Seneszenz-assoziierte ß-Galaktosidase-Färbung	
3.2.10 Herstellung zytoplasmatischer Lysate	
3.2.11 Herstellung von Gesamtzellextrakten	40
3.2.12 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	40
3.2.13 Konzentrationsbestimmung von Proteinen durch Bicinchoninsäure (BCA)	41
3.2.14 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
3.2.15 Western Blot	42
3.2.16 Aufreinigung rekombinanter Caspasen	43
3.2.16.1 Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie	43
3.2.16.2 Aufreinigung von Proteinen aus Einschlusskörpern	44
3.2.17 Nachweis aktiver Caspasen durch Biotin-Markierung	44
3.2.18 Nachweis der Caspase-Aktivität	45
4. Ergebnisse	47
4.1 Mechanismus des Taxol-induzierten Zelltodes	47
4.1.1 Synthetische Tetrapeptide, die auf der Konsensussequenz AEVD basiere	n, sind
nicht Caspase-10-spezifisch	47
4.1.2 Embryonale Mausfibroblasten sind sensitiv gegenüber Taxol-induzierter A	poptose
4.1.3 In humanen Zellen ist Taxol-induzierte Apoptose unabhängig von Rezepto	49 Dr-
assoziierten Initiatorcaspasen	51
4.1.4 Die Rekonstitution mit Caspase-10 bewirkt keine erhöhte Taxol-Sensitivitä	ät52
4.1.5 Das Todesrezeptor-assoziierte Adapterprotein FADD hat keinen Einfluss	auf
Taxol-induzierte Apoptose	54
4.1.6 Taxol-induzierte Apoptose wird durch Apaf-1 und Caspase-9 vermittelt	56
4.1.7 Die Rolle der Bcl-2-Familie während Taxol-induzierter Apoptose	62

4.2 ER-Stress-induzierte Apoptose ist abhängig von Caspase-9 und ihrer Aktivierung ir	n
Apoptosom	65
4.2.1 Caspase-9 ist essentiell für die Apoptose-Induktion nach ER-Stress	65
4.2.2 Caspase-2 ist an einer postmitochondrialen Amplifizierung des apoptotischen	
Signals beteiligt	70
4.2.3 Induktion von Autophagie in Apoptose-inkompetenten Zellen	75
4.3 Bei fehlender Expression der Bcl-2-Proteine Bak und Bax führt Thapsigargin-	
Behandlung zu nekrotischem Zelltod	77
4.3.1 Bak/Bax ^{-/-} embryonale Mausfibroblasten sind sensitiv gegenüber Thapsigargin	77
4.3.2 Thapsigargin-induzierter Zelltod führt zur Aktivierung von Caspasen	79
4.3.3 Thapsigargin-Behandlung bedingt die Induktion von Nekrose in Bak/Bax-/Zelle	en
	83
5. Diskussion	87
5.1 Mechanismus des Taxol-induzierten Zelltodes	87
5.2 ER-Stress-induzierte Apoptose ist abhängig von Caspase-9 und ihrer Aktivierung ir	n
Apoptosom	93
5.3 Bei fehlender Expression der Bcl-2-Proteine Bak und Bax führt Thapsigargin-	
Behandlung zu nekrotischem Zelltod	97
6. Zusammenfassung	103
6.1 Mechanismus des Taxol-induzierten Zelltodes	103
6.2 ER-Stress-induzierte Apoptose ist abhängig von Caspase-9 und ihrer Aktivierung ir	n
Apoptosom	105
6.3 Bei fehlender Expression der Bcl-2-Proteine Bak und Bax führt Thapsigargin-	
Behandlung zu nekrotischem Zelltod	107
7. Summary	110
7.1 Mechanisms of taxol-induced cell death	110
7.2 ER stress-induced apoptosis depends on caspase-9 and its activation by the	
apoptosome	111
7.3 Loss of the proapoptotic Bcl-2 proteins Bak and Bax alters the ER stress-induced	
mode of cell death from apoptosis to necrosis	112
8. Literaturverzeichnis	116
9. Abkürzungen	131
10. Anhang	136



1. Einleitung

1.1 Zelltodmechanismen in Eukaryonten

Zelltod spielt in einem mehrzelligen, eukaryontischen Organismus eine essentielle Rolle, da er unabdingbar für die Aufrechterhaltung der Homöostase der Gewebe, die embryonale Entwicklung und die Eliminierung entarteter oder Virus-infizierter Zellen ist. Die verschiedenen Mechanismen, die zum Tod der Zelle führen, lassen sich durch morphologische und biochemische Charakteristika voneinander abgrenzen. Man unterscheidet zwischen Typ 1- (apoptotisch), Typ 2- (autophagisch) und Typ 3-Zelltod (nekrotisch) (Abb. 1) (Clarke, 1990).

Die Apoptose ist der am besten charakterisierte Zelltodmechanismus. 1972 wurde sie von Kerr *et al.* beschrieben und erstmals als genetisch programmierter "Selbstmord" bezeichnet. Apoptose ist histologisch unauffällig, aber bei multizellulären Organismen ein weit verbreiteter Vorgang, welcher an verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt ist. So spielt sie eine maßgebliche Rolle in der embryonalen Morphogenese, der Eliminierung potentiell schädlicher Zellen (z.B. Tumorzellen, Virus-infizierte Zellen) und der klonalen Deletion autoreaktiver Thymozyten (Kerr *et al.*, 1972; Searle *et al.*, 1982). Vor allem wegen ihrer Funktion in der Eliminierung entarteter und potentiell schädlicher Zellen hat die Erforschung der Apoptose und ihrer Regulation für therapeutische Anwendungen in den letzten Jahren große Bedeutung gewonnen (Fischer *et al.*, 2007).

Als Reaktion auf eine Vielzahl verschiedener Stimuli, darunter z.B. UV- oder γ-Strahlung, Entzug von Wachstumsfaktoren, Chemotherapeutika oder Aktivierung von Todesrezeptoren, wird in Zellen Apoptose induziert. Sie lässt sich anhand morphologischer und biochemischer Merkmale charakterisieren und von anderen Zelltodmechanismen differenzieren (Kerr *et al.*, 1972). Während der Apoptose zerfallen die Zellen, wobei kleinere, membranumhüllte Vesikel, die man als apoptotische Körper (*apoptotic bodies*) bezeichnet, abgeschnürt werden. Die Bildung dieser Vesikel ist ein typisches, makroskopisch sichtbares Merkmal der Apoptose und wird auch als *"membrane blebbing"* bezeichnet. Die apoptotischen Vesikel werden von Makrophagen und anderen phagozytierenden Zellen erkannt und aufgenommen (Krammer, 2000; Lauber *et al.*, 2003). Intrazelluläre Bestandteile gelangen somit nicht in die extrazelluläre Umgebung, wodurch eine Entzündungsreaktion vermieden wird (Abb. 1A).

Ferner kommt es in apoptotischen Zellen zu einer Kondensation des Chromatins. Die DNA wird in oligonukleosomale Fragmente von 180 bp und Vielfachen davon gespalten. Nach elektrophoretischer Auftrennung kann die Spaltung der DNA durch Entstehung eines charakteristischen Musters (*DNA-Laddering*) nachgewiesen werden. Apoptose wird weiterhin begleitet von der Externalisierung von Phosphatidylserin, dem Zusammenbruch des



mitochondrialen Transmembranpotentials sowie einer Kondensation des Zytoplasmas (Zeiose) (Majno und Joris, 1995).

Abbildung 1: Schematische Gegenüberstellung der verschiedenen Zelltodmechanismen.

(A) Apoptotische Zellen (Zelltod Typ-1) weisen zunächst eine charakteristische Kondensation des Zytoplasmas und des Chromatins auf. Anschließend erfolgt die Abschnürung apoptotischer Körper, die dann von Makrophagen und anderen phagozytierenden Zellen internalisiert und abgebaut werden können. (B) Autophagie (Zelltod Typ-2) beginnt mit der Bildung intrazellulärer Vesikel (Autophagosomen), die von einer Doppelmembran (phagophore Membran) umgeben sind und Teile des Zytoplasmas einschließen. Nach Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen enstehen Autophagolysosomen, in denen die eingeschlossenen Bestandteile zunächst proteolytisch abgebaut und anschließend der Energiegewinnung oder der Proteinbiosynthese zugeführt werden. Dadurch können Zellen Nährstoffmangelbedingungen überdauern. Können die physiologischen Bedingungen nicht wiederhergestellt werden oder überschreitet das Ausmaß an Autophagie einen Schwellenwert, so wird Zelltod induziert. (C) Während der Nekrose (Zelltod Typ-3) schwellen die Zellen, durch äußere Einflüsse bedingt, stark an und platzen schließlich, wodurch intrazelluläre Bestandteile freigesetzt werden, die zu einer Entzündung im Organismus führen können.

Ähnlich wie die Apoptose ist auch die Autophagie ein genetisch programmierter und evolutionär konservierter Mechanismus (Abb. 1B). Sie spielt eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung, der Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen sowie bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen (Shintani und Klionsky, 2004). Autophagie wird z.B. durch Nährstoffmangel induziert und dient zunächst dazu, dass Überleben von Zellen unter

diesen suboptimalen Bedingungen zu gewährleisten (Gonzalez-Polo *et al.*, 2005). Deshalb ist Autophagie im eigentlichen Sinne kein Zelltodmechanismus, kann allerdings, nach langanhaltenden Mangelbedingungen, zur Induktion von Zelltod führen (Kroemer *et al.*, 2005). Der molekulare Mechanismus des autophagischen Zelltodes ist noch nicht bekannt.

Morphologisch wird Autophagie durch die Bildung intrazellulärer Vesikel (Autophagosomen) charakterisiert, die von einer Doppelmembran umhüllt sind und Teile des Zytoplasmas oder der Zellorganellen proteolytisch abbauen (Abb. 1B) (Hazan *et al.*, 2004). Biochemisch wird zur Klassifizierung auch das Markerprotein LC3 verwendet, dass nach Induktion von Autophagie in den Autophagosomen lokalisiert ist (Sugawara *et al.*, 2004).

Im Vergleich zur Apoptose und Autophagie gehen Zellen bei der Nekrose durch schwere Schädigungen, die durch äußere Einflüsse entstehen, zugrunde (Abb. 1C). Beispiele für solche schädigenden Einflüsse sind Hypoxie, Hyperthermie, lytische virale Infektionen und Toxine. Morphologisch lassen sich nekrotische Zellen durch eine Schwellung des Zytoplasmas und der Zellorganellen (z.B. der Mitochondrien) identifizieren. Die Schwellung wird durch Schädigungen der Plasmamembran verursacht, wodurch Elektrolyte in die Zelle eindringen, die wiederum den Einstrom von Wasser bedingen. Als Folge platzt die Zelle und intrazelluläre Proteine werden freigesetzt. Durch sie werden Phagozyten angelockt, die durch Ausschüttung verschiedener Zytokine eine lokale Entzündungsreaktion hervorrufen (Wyllie, 1997).

Mittlerweile sind weitere Zelltodmechanismen beschrieben, die entweder Spezialfälle (z.B. Anoikis: Apoptose durch Verlust der Zelladhäsion oder mitotische Katastrophe: Apoptose durch abberante Mitose) der bekannten Zelltodarten oder Übergänge zwischen Apoptose, Nekrose und Autophagie darstellen.

1.2 Apoptose und Apoptosemediatoren

Apoptose ist nicht nur der am besten charakterisierte, sondern auch der physiologisch relevanteste Zelltodmechanismus. Abgesehen von ihrer Rolle als Gegenspieler der Proliferation während der embryonalen Entwicklung und der Aufrechterhaltung der Homöostase, ist vor allem die Fehlregulation der Apoptose bei der Entstehung verschiedener Erkrankungen von enormem medizinischem Interesse.

Vermehrte Apoptose kann Ursache akuter Symptome wie z.B. Schlaganfall, Herzinfarkt oder Leberversagen sein, ist über längere Zeiträume allerdings auch für die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer und Parkinson verantwortlich. Dagegen kann eine verminderte Apoptoserate das Überleben und die Akkumulation entarteter Zellen und somit die Entstehung von Tumoren und Autoimmunerkrankungen begünstigen. Auch Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika werden häufig durch Defekte in apoptotischen Signalwegen bedingt (Fischer und Schulze-Osthoff, 2005). Die Komponenten die an der apoptotischen Signaltransduktion beteiligt sind sowie ihr Zusammenspiel und ihre Regulation sind daher von großem, therapeutischem Interesse. Im Folgenden werden die klassischen Signalwege sowie die zentralen Mediatoren der Apoptose im Detail erläutert.

1.2.1 Todesrezeptoren

Todesrezeptoren (*death receptors*, DRs) bilden eine Subfamilie, die zu der TNF/NGF (*tumor necrosis factor/nerve growth factor*)-Rezeptor-Superfamilie gehört (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998). Mitglieder dieser Familie üben, in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Art des Signals, pleiotrope Funktionen aus. Die meisten Rezeptoren sind in die Induktion der Proliferation, der Differenzierung, der Regulation der Immunantwort und der Genexpression involviert. Einige können jedoch in Zellen Apoptose induzieren.



Abbildung 2: Schematische Darstellung der Todesrezeptoren und ihrer spezifischen Liganden (modfiziert nach Schulze-Osthoff *et al.*, 1998).

Die Todes-Rezeptoren, die eine Untergruppe der TNF/NGF-Rezeptor-Superfamilie bilden, sind durch eine intrazelluläre Todesdomäne (grün) und cysteinreiche Domänen (violett) im extrazellulären Teil charakterisiert.

Zu dieser Todes-Rezeptor-Subfamilie (Abb. 2) gehört u.a. TNF-R1 (*tumor necrosis factor-receptor 1*), CD95 (*cluster of differentiation 95*)/Apo1/Fas, TRAIL-R1 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor/*DR4 (*death receptor 4*), TRAIL-R2/DR5) oder DR3. Charakteristisch für diese Familie sind cysteinreiche, extrazelluläre Domänen, in denen homologe Grundeinheiten von etwa 40 Aminosäuren mehrfach wiederholt vorliegen. Die

Todesrezeptoren zeichnen sich des Weiteren durch den Besitz einer intrazellulären Todesdomäne (*death domain*, DD) aus, die essentiell für die Transduktion des apoptotischen Signals ist (Itoh und Nagata, 1993). Ähnlich wie ihre Rezeptoren besitzen auch die jeweiligen spezifischen Liganden der Todesrezeptoren (TNF α , CD95, TRAIL und Apo3L) untereinander eine strukturelle Homologie. Ferner aktivieren alle Liganden ihre Rezeptoren durch Oligomerisierung (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998; Strasser *et al.*, 2000).

1.2.2 Caspasen

Caspasen (*cysteine-dependent aspartate-directed proteases*) gehören zur Familie der Cystein-Proteasen und sind an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt. Am besten untersucht ist ihre zentrale Effektorfunktion in Signaltransduktionswegen, die zur Apoptose führen. Zusätzlich spielen einige Caspasen auch eine wichtige Rolle in anderen, nichtapoptotischen Signalwegen und manche dieser Proteasen fungieren hauptsächlich als Mediatoren inflammatorischer Prozesse.

1992 wurde die erste Caspase (Caspase-1) identifiziert und auf Grund ihrer Fähigkeit Interleukin-1β zu spalten und damit zu aktivieren, als Interleukin-1β-konvertierendes Enzym (*Interleukin-1β-converting enzym*, ICE) bezeichnet (Cerretti *et al.*, 1992; Thornberry *et al.*, 1992). Seit dem wurden insgesamt 17 verschiedene Säugercaspasen charakterisiert, von denen 13 im Menschen exprimiert werden (Abb. 3A).

Alle Caspasen sind strukturell ähnlich aufgebaut. Auf eine N-terminale Prodomäne folgen eine große und eine kleine katalytische Untereinheit. Da einige Caspasen zentrale Apoptosemediatoren sind, werden sie als inaktive Zymogene synthetisiert, die nur eine geringe katalytische Aktivität besitzen (Yamin *et al.*, 1996). Während der Reifung werden die große und kleine Untereinheit der Zymogene durch Spaltung getrennt. Durch anschließende Dimerisierung bilden sich aktive Enzyme, bestehend aus zwei prozessierten Procaspasen. Die entstehende tetramere Protease enthält zwei aktive Zentren an den entgegengesetzten Enden des Moleküls (Abb. 3B, C). Alle reifen Caspasen hydrolysieren Peptidbindungen auf der Carboxylseite von Aspartatresten.

Caspasen, die an apoptotischen Signalwegen beteiligt sind, werden anhand ihrer Prodomäne in zwei Gruppen unterteilt. Solche mit langen Prodomänen vermitteln die Induktion der apoptotischen Antwort und werden als Initiatorcaspasen bezeichnet. Sie enthalten in ihrer Prodomäne Todeseffektordomänen (*death effector domains*, DEDs) oder eine Caspase-Rekrutierungsdomäne (*caspase recruitment domain*, CARD). DEDs kommen in der Prodomäne von Caspasen-8 und -10 vor. Die Caspase-Rekrutierungsdomäne findet man in den Caspasen-1, -2, -4 und -9.



Abbildung 3: Struktur und Aktivierung humaner Caspasen.

(A) Auflistung humaner Caspasen und deren Klassifizierung als Effektor bzw. Initiator während apoptotischer Prozesse oder als Entzündungsmediatoren. (B) Strukturmodell der Konformation eines aktiven Caspase-Dimers. (C) Spaltungen, die zur Aktivierung von Effektorcaspasen notwendig sind. (CARD: *caspase recruitment domain*; DED: *death effector domain*; p20: große Untereinheit; p10: kleine Untereinheit; Asp: Aspartat)

Apoptotische Initiatorcaspasen werden, einem älteren Modell zufolge, durch einen Mechanismus aktiviert, den man als Gerüst-vermittelte Aktivierung (*scaffold-mediated activation*) bezeichnet. Dieser Prozess beinhaltet die Bildung einer molekularen Plattform als Antwort auf "Todes-Stimuli" (z.B. die Bindung von Todesrezeptorliganden). Daraufhin folgt die Rekrutierung von Procaspasen. Das Resultat ist ein Anstieg der lokalen Konzentration und/oder eine Konformationsänderung der Initiatorcaspasen. Dadurch wird eine Mikroumgebung geschaffen in der die intrinsisch bereits schwach aktiven Zymogene sich effizient gegenseitig prozessieren können, um vollständig aktive Caspasen zu erhalten. Heute weiß man allerdings, dass allein die Dimerisierung von Initiatorcaspasen ausreichend ist, um die Zymogene zu aktivieren und eine gegenseitige Prozessierung zu ermöglichen.

Initiatorcaspasen aktivieren dann durch Spaltung sogenannte Effektorcaspasen, wie Caspase-3, -6, -7, welche durch den Besitz einer kurzen Prodomäne charakterisiert sind. Effektorcaspasen spalten zahlreiche zelluläre Proteinsubstrate, wodurch letztendlich der Tod der Zelle bedingt wird.

1.2.3 Die Bcl-2-Familie

Die Bcl-2-Familie umfasst eine Gruppe strukturell verwandter Proteine, die alle als Apoptosemodulatoren fungieren. Charakteristisch für diese Proteine ist der Besitz von bis zu vier konservierten Bcl-2-Homologie-Domänen (BH1-BH4), die eine α -helikale Struktur aufweisen (Tsujimoto und Shimizu, 2000).

1985 wurde Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) als erstes und namensgebendes Mitglied dieser Familie beschrieben (Tsujimoto *et al.*, 1985). Durch Untersuchungen von Sequenzhomologien oder auf Grund von Wechselwirkungen mit Bcl-2 wurden weitere Mitglieder der Bcl-2-Familie identifiziert, die sowohl pro- als auch antiapoptotische Eigenschaften besitzen (Abb. 4).

Auf Grund struktureller und funktioneller Unterschiede kann man die Bcl-2-Familie in drei Gruppen unterteilen. Zu Gruppe 1 gehören antiapoptotische Proteine wie z.B. Bcl-2 und Bcl x_L , welche durch den Besitz von vier BH-Domänen und einer Transmembrandomäne (TM) charakterisiert sind. Die proapoptotischen Proteine werden dagegen auf Grund struktureller Merkmale in zwei Gruppen aufgeteilt. Proapoptotische Proteine, wie Bax und Bak, gehören zur Gruppe 2. Sie gleichen ihrer Struktur nach den Gruppe 1-Proteinen, ihnen fehlt allerdings die BH-4-Domäne. Gruppe 3 umfasst eine große Anzahl proapoptotischer Proteine, wie z.B. Bid, Bad oder Noxa, die nur die BH3-Domäne besitzen und daher auch als *"BH3-only Proteine"* bezeichnet werden. Lediglich die BH3-Domäne, die potentiell als "Todesdomäne" fungiert, scheint demnach ein notwendiger Bestandteil aller proapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie zu sein (Cory *et al.*, 2003).

Bcl-2-Familienmitglieder sind wichtige Mediatoren des intrinsischen Apoptosesignalweges. Sie regulieren, nach apoptotischen Stimuli, die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Unter physiologischen Bedingungen werden die proapoptotischen Proteine Bak und Bax vermutlich durch Bindung an antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie inaktiviert, wodurch die Freisetzung von Cytochrom c verhindert wird. Werden Bak und Bax aus dieser Bindung freigesetzt, können sie den Ausstrom von Cytochrom c und somit den intrinsischen Apoptosesignalweg induzieren.

Die proapoptotischen *BH3-only Proteine* spielen bei der Aktivierung von Bak und Bax eine essentielle Rolle. Der zu Grunde liegende Mechanismus ist nicht vollständig geklärt. Es existieren zwei mögliche Modelle, die die Wirkungsweise der *BH3-only Proteine* beschreiben. Eines geht davon aus, dass diese Proteine ausschließlich durch Bindung an antiapoptotische Bcl-2-Proteine zur Freisetzung von Bak und Bax beitragen (Willis *et al.*, 2007). Dagegen geht das zweite Modell davon aus, dass einige *BH3-only Proteine*, wie Bim, Bid und PUMA, nach Apoptoseinduktion Bak und Bax auch durch direkte Bindung aktivieren können (Letai *et al.*, 2002).

Obwohl noch nicht geklärt ist, welches Modell die Realität am besten beschreibt, ist doch unumstritten, dass das Zusammenspiel der Bcl-2-Familiemitglieder äußerst komplex ist und dass das Verhältnis von pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen über die Sensitivität gegenüber Todessignalen entscheidet.



Abbildung 4: Schematische Darstellung der BcI-2-Familie.

Ihrer Struktur nach lässt sich die Bcl-2-Familie in drei verschiedene Gruppen unterteilen. Gruppe 1 umfasst die antiapoptotischen Mitglieder, die alle die BH1-BH4-Domäne sowie eine Transmembrandomäne (TM) enthalten. Die Multidomänen-Proteine der Gruppe 2 sind proapoptotisch und abgesehen von der BH4-Domäne, strukturell mit den Gruppe 1-Proteinen identisch. Auch die Mitglieder der Gruppe 3 sind proapoptotisch, besitzen allerdings nur die BH3-Domäne. (TM: Transmembrandomäne; BH3: *Bcl-2 homology domain 3*).

1.3 Der extrinsische Apoptosesignalweg

1.3.1 Signaltransduktion der Todesrezeptoren

Der extrinsische Apoptosesignalweg wird durch Bindungen von spezifischen Liganden an Todesrezeptoren wie z.B. CD95 und TRAIL-R1/R2 initiiert (Abb. 5). Dadurch wird eine Rezeptor-Oligomerisierung induziert, die intrazellulär die Assoziation des Adaptermoleküls FADD (*FAS-associated death domain protein*) erleichtert. FADD besitzt neben der Todesdomäne (*death domain*, DD), mit der das Adapterprotein homotypisch an die DD des

Rezeptors bindet, noch eine Todeseffektordomäne (*death effector domain*, DED). Über diese kann FADD mit der DED von Procaspase-8 interagieren und das Zymogen so zum sogenannten Zelltod-induzierenden Komplex (*death inducing signaling complex*, DISC) rekrutieren. Neben Procaspase-8 kann auch Procaspase-10 in den DISC rekrutiert werden (Kischkel *et al.*, 2001).

Nach Dimerisierung weisen Procaspase-8/-10 schon eine geringe intrinsische Aktivität auf, dennoch erfolgt eine effiziente Caspase-8/-10-Aktivierung erst nach Autoproteolyse. Caspase-8/-10 initiieren dann eine Kaskade von Caspase-Aktivierungen durch direktes Schneiden von Effektorcaspasen (z.B. Caspase-3) und anderen Substraten (Peter und Krammer, 2003).





Abbildung 5: Schematische Darstellung der CD95/TRAIL-R1/2-Signaltransduktion.

Nach Bindung des spezifischen Liganden an seinen Rezeptor kommt es zur Rezeptor-Trimerisierung, wodurch das Adaptermolekül FADD angelagert wird. FADD rekrutiert Procaspase-8/-10 zum Zelltodinduzierenden Komplex (*death inducing signaling complex*, DISC), die dort aktiviert werden können. Aktive Caspase-8/-10 können dann Effektorcaspasen wie Caspase-3, -6 und -7 aktivieren, wodurch die Effektorphase der Apoptose induziert wird.

Die Aktivierung von Caspase-8/-10 durch Todesrezeptoren kann ausreichen, um Apoptose, durch anschließende Prozessierung von Effektorcaspasen, auszulösen (Scaffidi *et al.*, 1998). In den meisten Fällen ist für die effiziente Apoptoseinduktion jedoch eine Verstärkung des

Signals über den mitochondrialen Signalweg erforderlich. Die Beteiligung von Caspase-10 an der Todesrezeptor-vermittelten Induktion von Apoptose ist im humanen System beschrieben. Sowohl Mäusen als auch Ratten fehlt hingegen das *Caspase-10*-Gen (Reed *et al.*, 2003).

Die Signaltransduktion nach Aktivierung des TNF-Rezeptors unterscheidet sich von der der anderen Todesrezeptoren und kann sowohl das Überleben als auch den Tod von Zellen bedingen. Im Unterschied zum CD95- oder TRAIL-R1/R2-DISC wird nach Aktivierung des TNF-Rezeptors durch TNFα zunächst der membranständige Komplex I gebildet. Dieser besteht neben dem Rezeptor aus dem Adaptermolekül TRADD (TNF-R1 associated death domain protein), der RIP1-Kinase (receptor interacting protein 1) und TRAF2 (TNF-receptor associated factor 2) und induziert NF-kB (nuclear factor kappa B)-vermittelte Signaltransduktionswege, die ein Überleben der Zelle begünstigen. lst das "Überlebenssignal" zu schwach, so dissoziiert Komplex 1 vom Rezeptor, wodurch im Zytoplasma ein zweiter Komplex (Komplex II) ohne den Rezeptor gebildet wird. Dieser enthält zusätzlich FADD sowie die Procaspasen-8 und -10 und induziert Apoptose.

1.4 Der intrinsische Apoptosesignalweg

1.4.1 Signaltransduktion der Mitochondrien-vermittelten Apoptose

Die Signaltransduktion, die zur Mitochondrien-vermittelten Apoptose führt, wird durch Signale aus dem Zellinneren, wie z.B. Schädigung der DNA, induziert. Sie kann allerdings auch der Verstärkung des extrinsischen Signalweges dienen. Das kritische Ereignis ist in beiden Fällen die Freisetzung von Cytochrom c, welches zur Aktivierung der Initiatorcaspase-9 benötigt wird.

In Zellen, in denen die Menge an aktiven Caspasen nicht ausreicht um Apoptose über den extrinsischen Signalweg zu induzieren, wird das Signal durch Caspase-8 und Bid (*BH3-interacting death agonist*), welches zu den proapoptotischen Bcl-2-Mitgliedern der Gruppe 3 gehört, auf die Mitochondrien übertragen. Bid ist ein zytosolisches Protein, das nach Aktivierung von Todesrezeptoren durch aktive Caspase-8 gespalten wird. Durch diese Spaltung wird ein neuer N-Terminus generiert, der posttranslational N-myristoyliert werden kann (Zha *et al.*, 2000). Dies erleichtert vermutlich die Translokation von trunkiertem Bid (tBid) aus dem Zytosol an die Mitochondrien, wo es transient mit Bax (*Bcl-2 associated protein X*) oder Bak (*Bcl-2 antagonist killer*) interagiert (Gross *et al.*, 1999).

Wird das Todessignal im Zellinneren generiert, so erfolgt die Übertragung zu den Mitochondrien unabhängig von den Initiatorcaspasen des extrinsischen Signalweges und wird durch eines der anderen *BH3-only Proteine* vermittelt. Unabhängig vom detaillierten

Mechanismus (direkte Aktivierung oder Freisetzung aus der deaktivierenden Bindung an antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie) wird sowohl durch Bid als auch durch andere BH3-only Proteine (z.B. Bim oder PUMA) eine Konformationsänderung von Bak und Bax induziert, der eine Oligomerisierung folgt. In dieser Form sind Bax und Bak in der Lage, Poren in der äußeren Mitochondrienmembran zu bilden (Newmeyer und Ferguson-Miller, 2003). Diese Poren ermöglichen die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum ins Zytoplasma. Ferner kommt es zum Verlust des mitochondrialen pH-Gradienten, was zum Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta \Psi_m$) führt. Es ist noch umstritten, inwiefern dieser Prozess für die Transduktion des apoptotischen Signals essentiell ist. Unumstritten ist dagegen, dass die Freisetzung von Cytochrom c aus den von Bak und Bax gebildeten Poren unerlässlich für die Induktion von Apoptose ist (Desagher et al., 1999). Dementsprechend sind beide Prozesse in Zellen, denen Bak und Bax fehlen, stark eingeschränkt (Lindsten et al., 2000; Wei et al., 2001). Dagegen ist die Freisetzung von Cytochrom c sowie die Induktion von Apoptose nach bestimmten Todesstimuli in Zellen, in denen entweder Bak oder Bax exprimiert werden, noch möglich, was für eine redundante Funktion der beiden Proteine spricht.



Abbildung 6: Schematische Darstellung der Mitochondrien-vermittelten Apoptose.

In den meisten Zellen wird das Signal vom Todesrezeptor über tBid zu den Mitochondrien weitergeleitet. Die Interaktion von tBid oder anderer BH3-only Proteine mit den proapoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern Bak und Bax führt zu einer Konformationsänderung der Proteine, die eine Oligomerisierung ermöglicht. Diese Oligomere bilden eine Pore in der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch Cytochrom c und andere proapoptotische Faktoren aus den Mitochondrien freigesetzt werden. Cytochrom c bildet dann zusammen mit Apaf-1 und Caspase-9 einen Proteinkomplex, der als Apoptosom bezeichnet wird und zur Aktivierung von Caspase-9 führt. Diese ist dann in der Lage Effektorcaspasen, wie Caspase-3, -6 und -7, durch Spaltung zu aktivieren.

Nach Freisetzung aus den Mitochondrien induziert Cytochrom c, welches unter physiologischen Bedingungen eine Komponente der mitochondrialen Elektronentransportkette ist, die Aktivierung von Caspasen (Liu et al., 1996). Das freigesetzte Cytochrom c bindet an Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1), ein zytosolisches Protein, das eine CARD-Domäne und eine Nukleotid-Bindungsstelle aufweist (Zou et al., 1997). Die Bindung von Nukleotiden an den Apaf-1-/Cytochrom c-Komplex fördert seine Oligomerisierung, wodurch das Apoptosom, ein multimerer Apaf-1- und Cytochrom c-enthaltender Komplex, gebildet wird (Abb. 6). Die CARD-Domäne von Apaf-1 wird im Apoptosom zugänglich. Durch homotypische Bindung der CARD-Domänen werden mehrere Procaspase-9-Moleküle zum Komplex rekrutiert und deren Autoaktivierung erleichtert (Li et al., 1997). Nur die an das Apoptosom gebundene und somit aktive Caspase-9 ist in der Lage Effektorcaspasen, wie Caspase-3, effizient durch Spaltung zu aktivieren. Diese ausführenden Caspasen spalten dann viele wichtige, intrazelluläre Substrate, die zu den charakteristischen morphologischen Veränderungen der Apoptose führen (Fischer et al., 2003).

Caspase-9 und das Apoptosom spielen somit eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion des intrinsischen Apoptoseweges. Zellen, denen Apaf-1 oder Caspase-9 fehlt, weisen häufig eine Resistenz gegenüber bestimmten Todessignalen, wie z.B. Etoposid oder UV-Bestrahlung, auf (Kuida *et al.*, 1998; Cecconi *et al.*, 1998).

1.5 Autophagie und Autophagiemodulatoren

1.5.1 Autophagie

Autophagie ist ein evolutionär hoch konservierter Prozess, der den Abbau von Proteinen und die Beseitigung beschädigter Zellorganellen ermöglicht. Autophagie wird durch zellulären Stress, wie z. B. Nährstoffmangel oder Entzug von Wachstumsfaktoren, rasch induziert. Unter diesen Bedingungen stellt sie einen alternativen Weg zur Herstellung von Substraten für die Energiegewinnung dar und kann dadurch das Überleben von Zellen zunächst gewährleisten.

Obwohl die morphologischen Charakteristika der Autophagie bereits Mitte der 60iger Jahre des letzten Jahrhunderts beschrieben wurden (Baudhuin, 1966), sind die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen erst in den letzten Jahren bekannt geworden. Man unterscheidet zwischen verschiedenen Typen der Autophagie (Mikroautophagie, Makroautophagie, Chaperon-vermittelte Autophagie), wobei Makroautophagie die am häufigsten beobachtete Form darstellt. Dabei wird zunächst eine sogenannte phagophore Membran ausgebildet, durch die Zytoplasma-Abschnitte sowie Zellorganellen von den

restlichen zellulären Bestandteilen getrennt werden. Die daraus resultierenden Vesikel sind von einer Doppelmembran umgeben und werden auch als Autophagosomen bezeichnet. Durch die Fusion mit Lysosomen entstehen sogenannte Autophagolysosomen, in denen der zytoplasmatische Inhalt proteolytisch abgebaut wird (Maiuri *et al.*, 2007).

Autophagie soll eigentlich das Überdauern von Zelle unter ungünstigen Umweltbedingungen gewährleisten. Der Prozess kann allerdings auch zur Induktion von Zelltod führen. Obwohl der zu Grunde liegende Mechanismus noch nicht bekannt ist, geht man davon aus, dass das Ausmaß und die Dauer der Autophagie-Phase über Überleben und Zelltod entscheiden. Eine massive Induktion von Autophagie führt zur Proteolyse essentieller Zellorganellen. Dadurch können die lebensnotwendigen, zellulären Funktionen so stark eingeschränkt werden, dass die Zelle letztendlich daran zugrunde geht (Clarke, 1990; Lum *et al.*, 2005).

Der molekulare Mechanismus der Autophagie-Induktion ist noch nicht vollständig verstanden. Deshalb werden im Folgenden ausgewählte, essentielle Bestandteile des Signalweges erläutert.

1.5.2 Autophagiemodulatoren

1.5.2.1 Beclin-1 und Phosphatidylinositol 3-Kinase

Das Lipid Phosphatidylinositol-3-phosphat wird durch die Familie der Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3K) generiert. Die Klasse-III-PI3K spielen eine wesentliche Rolle bei der Bildung von Autophagosomen (Petiot *et al.*, 2000). Durch Inhibition dieser Kinasen kann die Induktion von Autophagie verhindert und somit reguliert werden. Intrazellulär wird die Aktivität der Autophagie-spezifischen PI3K unter anderem durch Beclin-1 (*Coiled-coil, myosin-like Bcl2-interacting protein,* Atg6) reguliert. Beclin-1 interagiert nicht nur mit der Klasse-III-PI3K, sondern auch mit dem antiapoptischen Protein Bcl-2 (Liang *et al.,* 1998). Durch Interaktion wird die Bindung von Beclin-1 an die Klasse-III-PI3K blockiert, wodurch die Kinase eine verringerte Aktivität aufweist (Pattingre *et al.,* 2005). Bcl-2 ist demnach nicht nur ein wichtiger Apoptosemodulator, sondern spielt auch eine wesentliche Rolle in der Regulation von Autophagie (Gozuacik und Kimchi, 2007).

1.5.2.2 Der mTor Signalweg und die Bildung von Autophagosomen durch Atg-Proteine

mTor (*mammalian target of rapamycin*) ist eine Serin/Threonin-Kinase, die eine zentrale Rolle bei der Regulation von Proteinsynthese, Zellwachstum, Proliferation und Autophagie spielt. Sie wurde zuerst als molekulares Angriffsziel des Antibiotikums Rapamycin identifiziert. mTor kann im aktiven Zustand die Induktion von Autophagie inhibieren (Fingar und Blenis, 2004). Der zu Grunde liegende Mechanismus ist allerdings nicht geklärt. Bekannt ist jedoch, dass Rapamycin als Inhibitor dieser Kinase fungiert und Autophagie induziert. Unter physiologischen Bedingungen führt z.B. Nährstoffmangel oder osmotischer Stress zur natürlichen Inhibition des Tor-Signalweges und zur Induktion von Autophagie (Gozuacik und Kimchi, 2007). Durch Inhibition von mTor wird die Transkription der sogenannten Atg (*autophagy-related genes*)-Proteine aktiviert.

Mit dem Namen "Atg" werden Genprodukte bezeichnet, die an der Induktion sowie der Durchführung von Autophagie beteiligt sind (Klionsky *et al.*, 2003). Dazu gehören u.a. Atg5 und Atg12, die für die Bildung von Autophagosomen unerlässlich sind. Atg5 und Atg12 werden kovalent miteinander verknüpft (Mizushima *et al.*, 1998). Dies ist Voraussetzung für die Bindung an Atg16. Atg16 ist dann in der Lage größer Proteinkomplexe zu bilden und stabilisieren (Mizushima *et al.*, 2003). Dieser Vorgang ist notwendig für Bildung von Autophagosomen (Mizushima *et al.*, 2003). Dieser Vorgang ist notwendig für Bildung von Autophagosomen (Mizushima *et al.*, 2001). Zur Rekrutierung von Lipidmolekülen, die für die Bildung phagophorer Membranen benötigt werden, ist Atg8, besser bekannt als LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*), verantwortlich. Nach Induktion von Autophagie wird LC3 durch Konjugation an Phosphatidylethanolamin (PE) modifiziert, um die Bindung an Lipide zu ermöglichen (Ichimura *et al.*, 2000; Gozuacik und Kimchi, 2007). LC3 wird häufig zum Nachweis von Autophagie verwendet. Sowohl die Konjugation an PE im Western Blot als auch die Translokation vom Zytoplasma in phagophore Membranen durch Fluoreszenzmikroskopie, kann als sicherer Indikator für Autophagie angesehen werden.

1.6 Organell-spezifische Induktion von Zelltod

Der intrinsische Apoptoseweg wird, wie bereits beschrieben, durch Signale aus dem Zellinneren induziert. Verschiedene Zellorganellen spielen bei der Detektion und der Weiterleitung dieser Signale eine wesentliche Rolle. Sie sind in der Lage pathologische Veränderungen zu erkennen und sowohl lokale als auch globale Antworten auszulösen, die entweder zu einer Anpassung an veränderte Umweltbedingungen oder zum Tod der Zelle führen. Beispielsweise induziert eine massive Schädigung von Mitochondrien, durch die Störung der ATP (Adenosintriphosphat)-Synthese oder von Lysosomen, durch Freisetzung von Ca²⁺-abhängigen Cystein-Proteasen (Calpainen, Cathepsinen), nekrotischen Zelltod. Eine weniger aggressive Schädigung bestimmter Organellen kann hingegen zur kontrollierten Induktion von Apoptose führen. Viele Organellen verfügen deshalb über molekulare Detektoren wie z.B. den ER (endoplasmatisches Retikulum)-Rezeptoren, die spezifisch Veränderungen erkennen und lokale Signaltransduktionswege aktivieren. Diese leiten ein Signal entweder an andere Zellorganellen wie die Mitochondrien weiter, was letztendlich zur Induktion des intrinsischen Apoptoseveges führt, oder aktivieren einen alternativen Apoptose-vermittelnden Signalweg.

Vor allem Proteine im Zellkern und im ER können als Detektoren intrazellulärer Veränderungen fungieren. Der Zellkern dient der Erkennung von genotoxischem Stress, wogegen das ER eine wichtige Rolle bei der Detektion von Veränderungen des zellulären Milieus einnimmt (zusammengefasst aus Ferri und Kroemer, 2001). Das medizinische Interesse am endoplasmatischen Retikulum als Sensor für zellulären Stress hat in den letzten Jahren daher stark zu genommen. Die Signalwege, die zur Induktion von Zelltod nach ER-Stress führen, sind noch nicht geklärt und werden kontrovers diskutiert. Man vermutet allerdings, dass Fehlregulationen dieser Signalwege an der Entstehung verschiedener Erkrankungen, wie z.B. dem Morbus Alzheimer (Hoozemans *et al.*, 2005; Unterberger *et al.*, 2006) oder dem Diabetes mellitus (Delepine *et al.*, 2000) maßgeblich beteiligt sind.

1.6.1 ER-Stress und Apoptoseinduktion

Einer der wichtigsten Prozesse, der mit dem ER assoziiert ist, ist die Synthese und korrekte Faltung sekretorischer, Membran-gebundener und einiger Organell-spezifischer Proteine. Um einen effizienten Ablauf dieses Vorgangs zu gewährleisten, müssen im Lumen des ER's bestimmte Bedingungen herrschen. Daher findet man dort neben hohen ATP- und Ca²⁺-Konzentrationen, eine oxidierende Umgebung, um die Bildung von Disulfidbrücken zu erleichtern. Auf Grund dieser speziellen Bedingungen ist das ER besonders anfällig gegenüber Veränderungen, die die zelluläre Energieversorgung, den Redox-Status oder die Ca²⁺-Konzentration betreffen. Solche Veränderungen führen zur Akkumulation ungefalteter Proteine im ER-Lumen und damit zur Induktion von ER-Stress.

Als Reaktion auf ER-Stress wird zunächst ein Signaltransduktionsweg aktiviert, der als *"unfolded protein response"* (UPR) bezeichnet wird (Abb. 7). Er wird durch die drei ER-Transmembranrezeptoren PERK (*pancreatic ER-kinase (PKR)-like ER-kinase*), ATF6 (*activating transcription factor 6*) und IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*) induziert. Durch Assoziation mit dem ER-Chaperon GRP78 (*Glucose-Regulated Protein* 78-KD; Bip) sind alle drei ER-Rezeptoren unter physiologischen Bedingungen inaktiv. Kommt es zur Akkumulation ungefalteter Proteine im ER-Lumen, wird die kompetitive Bindung an GRP78 aufgehoben. Die ungefalteten Proteine konkurrieren mit den ER-Membranrezeptoren um die Bindung an GPR78, wodurch es letztendlich zur Freisetzung und schrittweisen Aktivierung zunächst von PERK, dann ATF6 und schließlich IRE1 kommt.

PERK kann nach Dissoziation von GRP78 dimerisieren, wodurch es zur Autophosphorylierung und somit zur Aktivierung dieser Kinase kommt. Im Zytoplasma phosphoryliert aktive PERK eIF2 (*eukaryotic initiation factor 2*), was wiederum zur Inhibition der "Cap-abhängigen" Translation führt. Eukaryontische mRNAs werden während der Transkription am 5'-Ende mit einem Guanin-Nukleotid, das durch eine 5'-5'-

Phosphodiesterbindung kovalent gebunden wird, modifiziert. Diese Struktur wird als "Cap" bezeichnet und dient u.a. der Erkennung und Bindung von Ribosomen. Die Mehrzahl der mRNAs wird über diesen Mechanismus in Proteine translatiert. Durch einen Translationsstopp wird daher die Menge unreifer Polypeptidketten, die ins ER-Lumen gelangt reduziert, da die Akkumulation und Aggregation ungefalteter Proteine toxisch für Zellen ist. Einige mRNAs besitzen zusätzlich interne, ribosomale Eintrittsstellen (internal ribosomal entry site, IRES) und können deshalb trotz eIF2-abhängiger Translationsblockade translatiert werden. Dabei handelt es sich vor allem um antiapoptotische Genprodukte, die im Aminosäuremetabolismus, in Redox-Reaktionen, Stressantworten in und der Proteinsekretion involviert sind. Sie sind in erster Linie für die Beseitigung der Proteinaggregate im ER-Lumen und für die Wiederherstellung der zur Proteinfaltung benötigten Bedingungen zuständig. Der durch PERK aktivierte Signalweg soll demnach zunächst den Normalzustand der Zelle wiederherstellen und verhindern, dass Apoptose induziert wird.

Der ER-Transmembranrezeptor ATF6 wird, genau wie PERK, durch GRP78 reguliert. Nach Dissoziation des Chaperons, transloziert ATF6 zum Golgi-Apparat, wo er durch Spaltung aktiviert wird. In dieser Form gelangt ATF6 in den Nukleus und initiiert dort die Transkription bestimmter Zielgene. Unter den Zielgenen befinden sich verschiedene Chaperone, die ebenfalls an der Beseitigung ungefalteter Proteine beteiligt sind. Allerdings wird auch der Transkriptionsfaktor XBP1 (*X box-binding protein 1*) induziert. Dieser spielt eine zentrale Rolle im IRE1-vermittelten Signaltransduktionsweg, der zur Induktion von Apoptose nach lang andauerndem ER-Stress führt. Der ATF6 vermittelte Signalweg kann deshalb nicht eindeutig als pro- oder antiapoptotisch klassifiziert werden.

Der dritte ER-Transmembranrezeptor IRE1 wird ebenfalls durch Dissoziation von GRP78 aktiviert. Auf Grund seiner Endoribonukleasefunktion kann aktiviertes IRE1 ein 26 Nukleotidgroßes Intron aus der XBP1-mRNA herausschneiden. Diese XBP1-Spleißvariante, die auch als sXBP1 (*spliced XBP1*) bezeichnet wird, ist ein stabiler und aktiver Transkriptionsfaktor, der verschiedene Zielgene, darunter den PERK-Inhibitor P58^{IPK} (*inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)*), induziert. P58^{IPK} hebt den eIF2-abhängigen Translationsblock auf und markiert damit eine Art Endpunkt der UPR.

War die UPR erfolgreich, so haben sich die Bedingungen im ER-Lumen wieder normalisiert, die Faltung neu-synthetisierter Proteine kann fortgesetzt werden und die Zelle überlebt. Ist dies nicht der Fall, so kann die Aufhebung des Translationsblocks zur Produktion proapoptotischer Proteine führen, wodurch letztendlich programmierter Zelltod induziert wird. Während lang andauerndem ER-Stress sind die Signaltransduktionswege, die durch PERK,

Chaperone

Proteinabbau

Gene f
ür

.P58IPI

Gen-

Expression

sXBP1



0

sXBP1

sXBP1 mRNA

XBP1 mRNA

IRE1

200

ATF6 und IRE1 aktiviert werden, demnach in der Lage Signale zu vermitteln, die zur Induktion von Apoptose führen können (zusammengefasst aus Szegezdi *et al.*, 2006).

Abbildung 7: Schematische Darstellung der "Unfolded Protein Response" (UPR) (nach Szegezdi et al., 2006).

Sobald ungefaltete Proteine im ER-Lumen aggregieren, dissoziiert GRP78 von den ER-Stress-Rezeptoren PERK, ATF6 und IRE1. Dadurch wird zunächst PERK aktiviert, gefolgt von ATF6 und als letztes IRE1. Durch die Phosphorylierung von eIF2 kann aktive PERK einen Translationssblock induzieren. ATF4 gehört zu den Transkripten, die diesem Block entgehen. Dieser Transkriptionsfaktor wird in den Nukleus transportiert und reguliert dort die Expression von Genen, die für die Aufrechterhaltung der ER-Homöostase benötigt werden. ATF6 wird durch Translokation an den Golgi-Apparat und anschließende Spaltung vollständig aktiviert. In dieser Form ist ATF6 ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von Chaperonen und XBP1 reguliert. Zur Aktivierung von XBP1 muss zunächst ein Intron aus der XBP1-mRNA entfernt werden. Dieser Schritt wird durch IRE1 katalysiert. Das entstandene Spleißprodukt, genannt sXBP1, transloziert dann in den Kern, wo es als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen reguliert, die für Chaperone z. B. P58^{IPK} kodieren oder in den Abbau von Proteinen involviert sind. Die UPR dient der Wiederherstellung der normalen ER-Funktion. Bei lang andauerndem Stress wird Apoptose induziert.

Weder die Beteiligung bestimmter zentraler Apoptosemodulatoren an ER-Stress-induzierter Apoptose noch ihre Eingliederung in einen detaillierten Signalweg sind vollständig verstanden. Sicher ist allerdings, dass Caspasen eine essentielle Rolle während der ER-Stress-vermittelten Apoptose spielen. Zunächst nahm man an, dass das ER unabhängig von den Todesrezeptor- und Mitochondrien-vermittelten Signalwegen Apoptose induziert. In diesem als "ER-spezifisch" -bezeichnetem Signalweg soll Caspase-12 als apikale Initiatorcaspase fungieren (Rao *et al.*, 2001). Es wurde vermutet, dass sie direkt, also Apoptosom-unabhängig, Caspase-9 spalten kann und so eine Caspase-Kaskade induziert, die letztendlich zur Aktivierung von Caspase-3 und somit zur Apoptose führt (Rao *et al.*, 2002). Da das Apoptosom als Caspase-9-Aktivator in diesem Modell nicht benötigt wird,

wäre dieser Prozess auch unabhängig von der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien (Morishima *et al.*, 2002).

Mittlerweile ist allerdings bekannt, dass dies zumindest im humanen System nicht der Fall sein kann. In Individuen kaukasischen und asiatischen Ursprungs ist im *Caspase-12-*Gen durch einen Nukleotidaustausch ein Stopcodon in Exon 4 entstanden, wodurch ein verkürztes und damit funktionell inaktives Protein generiert wird. Nur Menschen afrikanischen Ursprungs exprimieren das komplette Caspase-12-Protein, dass allerdings ebenfalls katalytisch inaktiv ist (Saleh *et al.*, 2004). Caspase-12 kann also im Menschen nicht das zentrale, Apoptose-induzierende Enzym nach ER-Stress sein.

Auf der Suche nach einem allgemein gültigen Mechanismus nahm man deshalb zunächst an, dass Caspase-4 im humanen System, aber auch in der Maus, eine wichtige Rolle bei der Vermittelung von Zelltod nach ER-Stress spielt. Caspase-4 und Caspase-12 sind auf Proteinebene zu 48% homolog und werden im gleichen Genabschnitt kodiert (Hitomi *et al.*, 2004). 2005 konnte allerdings gezeigt werden, dass weder Caspase-12 noch Caspase-4 essentiell für die Induktion von Apoptose nach ER-Stress sind (Obeng und Boise, 2005). Welche Caspase als zentraler Regulator während der ER-Stress-vermittelten Apoptose fungiert, ist daher bis heute nicht bekannt.

Vermutlich sind auch Mitglieder der Bcl-2-Familie in die Regulation dieses Prozesses involviert. Das Apoptosesignal könnte vom ER auf die Mitochondrien übertragen und der intrinsische Signalweg so induziert werden. Diese Übertragung könnte sogar durch Bcl-2-Proteine selbst vermittelt werden, da einige von ihnen, z.B. Bcl-2, Bcl-x_L (Krajewski *et al.*, 1993), Bak, Bax (Zong *et al.*, 2003) und einige *BH3-only Proteine* auch am ER lokalisiert sein können.

Bak und Bax sind wahrscheinlich außerdem ein Teil der bereits beschriebenen UPR. Es wurde gezeigt, dass sie direkt mit IRE1 interagieren und zu dessen Aktivierung beitragen. Weiterhin wird angenommen, dass Bak und Bax in diesem Zusammenhang als zusätzliche Stress-Sensoren fungieren und für die Übertragung des apoptotischen Signals vom ER an die Mitochondrien und somit an einen der beiden zentralen Apoptosesignalwege verantwortlich sein könnten (Hetz *et al.*, 2006). Allerdings wird auch dieser Mechanismus sowie die Abhängigkeit ER-Stress-induzierter Apoptose von der Bcl-2-Familie noch kontrovers diskutiert.

1.6.2 ER-Stress und Autophagie-Induktion

Aktuellen Publikationen zufolge induziert ER-Stress vermutlich nicht nur Apoptose, sondern auch Autophagie. Die Funktion von Autophagie in diesem Zusammenhang ist noch nicht

bekannt. Es wird vermutet, dass dieser Prozess zusammen mit der UPR an der Beseitigung ungefalteter Proteine im ER-Lumen beteiligt ist (Teckman und Perlmutter, 2000). Der molekulare Mechanismus ist allerdings bislang nur in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Hoyer-Hansen und Jaattela, 2007). In diesem Modellsystem ist der ER-Rezeptor IRE1 vermutlich an der Induktion von Autophagie beteiligt. Dies geschieht unabhängig von der IRE1-vermittelten Modifikation der XBP1-mRNA und ist wahrscheinlich auf die Kinasefunktion des Rezeptors zurück zu führen (Ogata *et al.*, 2006).

Ferner ist nicht bekannt, ob Autophagie nach ER-Stress das Überleben von Zellen ermöglicht oder zur Induktion von Zelltod führt. Beide Möglichkeiten werden diskutiert. In *S. cerevisiae* dient die Induktion von Autophagie nach ER-Stress dazu, das Überleben der Zelle zu sichern. Durch diesen Mechanismus können größere Mengen ungefalteter Proteine aus dem ER-Lumen in Autophagolysosomen abgebaut werden, was die Wiederherstellung physiologischer Bedingungen erleichtert (Bernales *et al.*, 2006).

Auch in Säugerzellen wird ein ähnlicher Mechanismus vermutet, da andere Arten von zellulärem Stress, z.B. der Entzug von Wachstumsfaktoren, ebenfalls die Induktion von Autophagie bedingen, wodurch das Überleben von Zellen gewährleistet wird. Der Focus der Untersuchungen lag besonders bei Apoptose-inkompetenten Zellen, da in diesen Modellsystemen relativ einfach zwischen Autophagie-vermitteltem Überleben und autophagischem Zelltod unterschieden werden kann. Beispielsweise zeigten Untersuchungen in Apoptose-inkompetenten Bak/Bax^{-/-}-Zellen, dass der Entzug des Wachstumsfaktors IL-3 (Interleukin-3) die Abhängigkeit dieser Zellen von Autophagie bedingt. Obwohl die Zellen in nährstoffhaltigem Medium kultiviert wurden, musste zusätzlich Autophagie zur Aufrechterhaltung der Energieproduktion induziert werden. War das nicht möglich, so führte dies zur Induktion von Zelltod (Lum et al., 2005).

2006 wurde allerdings gezeigt, dass Apoptose-inkompetente Zellen nach ER-Stress, Zelltod durch Autophagie einleiten. Dabei wurde durch photodynamische Behandlung ER-Stress in Bak/Bax^{-/-}-Fibroblasten induziert. Diese konnten nur überleben, wenn Autophagie inhibiert wurde. War dies nicht der Fall, so starben die Apoptose-inkompetenten Zellen einen Autophagie-abhängigen Zelltod (Buytaert *et al.*, 2006a). Diese Beispiele verdeutlichen, dass die Rolle der Autophagie nach ER-Stress noch kontrovers diskutiert wird.

1.6.3 ER-Stress induzierende Agenzien

ER-Stress kann durch bestimmte Agenzien in Zellen induziert werden, wobei eines der bekanntesten aus der Wurzel von *Thapsia garganica* gewonnen und als Thapsigargin bezeichnet wird. 1978 wurde dieses Sesquiterpen-Lakton auf Grund seiner Fähigkeit, Histamin aus Mastzellen freizusetzen entdeckt und erstmalig isoliert (Rasmussen *et al.*,

1978). Erst später fand man heraus, dass Thapsigargin durch eine Störung des Ca²⁺-Haushaltes ER-Stress induzieren kann.

Der zelluläre Ca²⁺-Haushalt wird unter anderem durch die Aktivität der SERCA–Pumpe (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*) reguliert. Bei ihr handelt es sich um einen ATP-abhängigen Kationen-Transporter, der in allen Zelltypen eines eukaryontischen Organismus exprimiert wird (Wuytack *et al.*, 2002). Durch ihre Aktivität wird ein für die Faltung von Proteinen notwendiger Ca²⁺-Gradient zwischen dem ER-Lumen [mM Ca²⁺] und dem Zytosol [nM Ca²⁺] aufrecht erhalten. Thapsigargin inhibiert die SERCA-Pumpe, wodurch es zu einer Ca²⁺-Depletion im ER-Lumen und zu einem lokalen Anstieg der Ca²⁺-Konzentration im Zytosol kommt (Thastrup *et al.*, 1990). Die Ca²⁺-Depletion im ER führt zur Aktivierung der UPR, die Apoptose induzieren kann. Ferner kann auch die erhöhte Ca²⁺-Konzentration im Zytosol zur Einleitung von Zelltod führen (Tombal *et al.*, 2000).

Thapsigargin ist im Vergleich zu anderen bekannten SERCA-Inhibitoren nicht nur spezifischer, sondern auch wesentlich effizienter (Sagara und Inesi, 1991). 1990 wurde erstmals gezeigt, dass dieses Naturprodukt Apoptose in Prostatakrebszellen sowie in einigen weiteren Tumorzelllinien induzieren kann (Furuya *et al.*, 1994). In weiterführenden Experimenten wurde deutlich, dass Thapsigargin unabhängig vom Zelltyp und der proliferativen Aktivität Zelltod wesentlich effizienter als gängige Chemotherapeutika, wie z.B. Taxol oder Doxorubicin, vermittelt. Die zytotoxische Wirkung ist dabei allerdings nicht nur auf Tumorzellen beschränkt (Denmeade *et al.*, 2003).

Das Makrolidantibiotikum Brefeldin A ist ein weiteres ER-Stress-induzierendes Agenz. 1968 wurde es auf Grund seiner antiviralen Eigenschaften erstmals beschrieben (Tamura *et al.*, 1968). Erst später fand man heraus, dass es ein effizienter Inhibitor des intrazellulären Vesikeltransportes ist (Misumi *et al.*, 1986).

Vesikel werden für den Transport von Proteinen aus dem ER benötigt, weshalb es nach Brefeldin A-Behandlung zur Proteinakkumulation und somit zur Induktion von ER-Stress kommt. Durch Bindung an das G-Protein ARF (*ADP-ribosylation factor*) hemmt Brefeldin A die Bildung von Transportvesikeln. Im inaktiven Zustand liegt ARF an GDP (Guanindiphosphat) gebunden vor. Durch die Interaktion mit einem GEF (*guanine nucleotide-exchange factor*) wird das GDP durch ein GTP (Guanintriphosphat) ersetzt und ARF aktiviert. Aktiviertes ARF ist an der Bildung von Transportvesikeln beteiligt. Durch die Bindung von Brefeldin A an den intermediären Komplex aus ARF-GDP und GEF wird die Austauschreaktion verhindert. ARF verbleibt im inaktiven Zustand und die Bildung neuer Vesikel wird inhibiert (Zeghouf *et al.*, 2005).

Auch Tunicamycin gehört zu einer Klasse von Verbindungen, die in Zellen ER-Stress induzieren können. Es wird von *Streptomyces lysosuperificus* produziert und wurde auf

Grund seiner antiviralen Eigenschaften erstmals 1971 beschrieben (Takatsuki *et al.*, 1971). Erst später zeigte sich, dass Tunicamycin die Bildung N-glykosylierter Proteine im ER-Lumen inhibiert (Leavitt *et al.*, 1977). Das Antibiotikum interferiert mit der Reaktion, die zur Bildung von Dolichol-Phosphat-gekoppelten Oligosacchariden führt. Die Lipid-Kopplung der Zuckerreste ist notwendig für die Übertragung auf Proteine und dient als Plattform für weitere Modifikationen (McDowell und Schwarz, 1988). Die Tunicamycin-vermittelte Inhibition dieser Reaktion bedingt eine Störung der gesamten N-Glykosylierung, eine Akkumulation von Proteinen im ER-Lumen und letztendlich die Induktion von ER-Stress.



Abbildung 8: ER-Stress-induzierende Agenzien.

Strukturformeln der Naturprodukte Thapsigargin, Brefeldin A und Tunicamycin. Dargestellt sind außerdem die Organismen, aus denen die ER-Stress-induzierenden Reagenzien isoliert wurden.

1.7 Chemotherapeutika

Unter dem Begriff Chemotherapie versteht man die Behandlung bösartiger Tumore mittels natürlicher oder synthetisch hergestellter Chemikalien. In Abhängigkeit ihres Wirkmechanismus werden sie als DNA-schädigende, Mikrotubuli-interferierende und antimetabolische Agenzien klassifiziert. Grundsätzlich dämmen alle Chemotherapeutika das Wachstum und die Ausbreitung von Tumoren ein, indem sie die Proliferation inhibieren. Der therapeutische Index eines Reagenz hängt deshalb davon ab, selektiv Tumorzellen abzutöten und gleichzeitig mit dem Wachstum normaler Zellen nicht zu interferieren. Auch die Spezifität eines Chemotherapeutikums hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab. Einer davon ist die erhöhte mitotische Aktivität entarteter Zellen, die sie anfälliger für die Wirkung von Chemotherapeutika macht. Allerdings findet man, beispielsweise im hämatopoetischen System sowie bei gastrointestinalen Epithelzellen, eine hohe

Teilungsrate, weshalb auch diese Zellen häufig während des Verlaufs einer Tumortherapie geschädigt werden.

Obwohl die meisten Chemotherapeutika ganz unterschiedliche chemische Eigenschaften aufweisen, induziert ein Großteil von ihnen Zelltod durch die Aktivierung apoptotischer Signalwege (Nguyen und Hussain, 2007). Für viele Agenzien ist der genaue Mechanismus allerdings noch nicht vollständig geklärt. Das Wissen über die Beteiligung bestimmter Apoptosemodulatoren an Signalwegen, die nach Chemotherapeutika-Behandlung zu Apoptose führen, ist essentiell für eine gezielte therapeutische Bekämpfung verschiedener Tumorarten. Eines der erfolgreichsten Chemotherapeutika ist Taxol, das im Folgenden näher erläutert wird.

1.7.1 Taxol und Apoptoseinduktion

Taxol wurde im Rahmen eines Programms entdeckt, in dem insgesamt 35000 Pflanzenextrakte auf ihre antineoplastische Aktivität hin untersucht wurden. Extrakte der Pflanze *Taxus brevifolia* zeigten dabei eine zytotoxische Aktivität gegenüber Leukämiezellen und einer Vielzahl weiterer Tumorzelllinien. Erst 1971 wurde die, für die antineoplastische Aktivität verantwortliche Verbindung aus Taxus-Extrakten isoliert und als Taxol bezeichnet (Leistner, 2005; Wani *et al.*, 1971).



Abbildung 9: Struktur und molekulares Angriffziel von Taxol.

(A) Strukturformel des Chemotherapeutikums Taxol. Das Chemotherapeutikum wurden 1971 erstmals aus *Taxus brevifolia* isoliert. (B) Bindung von Taxol an ein Tubulin-Heterodimer.

Kurz nach Aufklärung der Strukturformel wurden bereits erste Hinweise auf das molekulare Angriffsziel und die Wirkungsweise von Taxol bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass Taxol zu den Mikrotubuli-interferierenden Substanzen gehört.

Mikrotubuli sind hohle Zylinder, deren Wand aus 13 in Längsrichtung parallel und konzentrisch um die Zylinderachse angeordneten Protofilamenten besteht. Jedes dieser Protofilamente setzt sich aus aneinander gereihten Tubulin-Molekülen zusammen. Tubulin liegt in Zellen als Heterodimer aus einer α - und einer β -Untereinheit vor. Sowohl die Kräfte zwischen den α - und β -Untereinheiten der Tubulin-Heterodimere in den Protofilamenten als auch laterale Kräfte zwischen den aneinander liegenden Protofilamenten halten Mikrotubuli zusammen. Wie die Tubulin-Dimere weist auch der gesamte Mikrotubulus eine polare Struktur auf. Er besitzt ein (-)-Ende, dass bei der Mitosespindel an den Centrosomen verankert ist, und ein (+)-Ende, dass mittels der Kinetochore an die Centromere gekoppelt wird. Zusätzlich gibt es auch Mikrotubuli mit freiem (-)- und (+)-Ende.

Obwohl Mikrotubuli mikroskopisch als dünne und eher starre Strukturen erscheinen, sind sie hochdynamische Gebilde. Sie können rasch aufgebaut und wieder verkürzt werden. Dabei werden am (+)-Ende eines Mikrotubulus ständig neue Tubulin-Moleküle angelagert (Polymerisation), wogegen am (-)-Ende stetig Tubulin-Dimere entfernt werden (Depolymerisation). Den momentanen Zustand eines Mikrotubulus kann man dementsprechend als Gleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation beschreiben. Dies wird auch als dynamische Instabilität bezeichnet.

Im Gegensatz zu den meisten Mikrotubuli-interferierenden Agenzien, wie z. B. Colchicin und Vinca-Alkaloiden, bewirkt die Behandlung mit Taxol nicht den Zerfall, sondern die Stabilisierung von Mikrotubuli. Taxol lagert sich irreversibel und mit hoher Affinität an das β -Tubulin der bereits aufgebauten Mikrotubuli an und hemmt so ihre Depolymerisation. Dies geschieht offenbar bevorzugt am (+)-Ende. Die Dynamik der Mikrotubuli, die Voraussetzung für ihre Funktion darstellt, geht dadurch verloren. In Folge dessen sind Zellen nach Taxol-Behandlung nicht mehr in der Lage einen funktionsfähigen Spindelapparat aufzubauen. Es kommt zur Aneuploidie, der Zellteilungsvorgang wird extrem verlängert oder kann nicht beendet werden. Viele Zellen arretieren in der G₂/M-Phase des Zellzyklus oder versuchen wieder in die G₁-Phase zurückzukehren. Daraus resultiert die Bildung vielkerniger und polyploider Zellen.

Die Taxol-induzierte Spindelschädigung kann zur Aktivierung einer Signalkaskade führen, die Apoptose einleitet. Der genaue Mechanismus der Apoptoseinduktion und die beteiligten Apoptosemodulatoren sind noch nicht vollständig geklärt und werden kontrovers diskutiert (Bartsch, 2005). Trotzdem werden Taxol und seine Derivate bereits erfolgreich in der Behandlung von Ovarialkarzinomen, fortgeschrittenen Mammakarzinomen und fortgeschrittenem NSCLC (*non small cell lung cancer*) eingesetzt (Lipp and Bokemeyer, 2005).

Obwohl vieles darauf hindeutet, dass Taxol-induzierte Apoptose über den mitochondrialen Signalweg verläuft, gibt es auch Publikationen, die eine essentielle Rolle des Todesrezeptorassoziierten Signalweges postulieren (Park *et al.*, 2004; Friesen *et al.*, 1996) Dies wird durch die Abhängigkeit des Taxol-vermittelten Zelltodes von Todesrezeptor-assoziierten Apoptosemodulatoren wie Caspase-8, Caspase-10 und FADD begründet. Tatsächlich könnte zumindest Caspase-8 an der Induktion von Apoptose nach Taxol-Behandlung beteiligt sein. Vieles spricht in diesem Fall allerdings für eine Todesrezeptor-unabhängige Aktivierung der Caspase, die im Signalweg unterhalb der Effektorcaspase-3 auftritt (Wieder *et al.*, 2001). Aktuellen Publikationen zufolge kann Caspase-8, unabhängig von Todesrezeptoren, in einer Art mitochondrialer Rückkopplungsreaktion durch Caspase-3 gespalten und aktiviert werden.

Eine Beteiligung von Caspase-10 ist stark umstritten. Untersuchungen führten zwar zu der Vermutung, dass Taxol-induzierte Apoptose abhängig von Caspase-10 ist, allerdings stammen sämtliche Ergebnisse aus Experimenten in denen der vermeintlich Caspase-10-spezifische Inhibitor AEVD verwendet wurde (Park *et al.*, 2004). Heute weiss man allerdings, dass Peptid-basierte Caspase-Inhibitoren eher unspezifisch wirken und daher ungeeignet sind, um den Einfluss einer bestimmten Caspase in einem Signalweg zu untersuchen (Timmer *et al.*, 2007). Die Rolle von Caspase-10 in der Taxol-induzierten Apoptose bleibt damit umstritten.

Auch der Einfluss des Todesrezeptor-assoziierten Adapterproteins FADD während Taxolinduzierter Apoptose wird kontrovers diskutiert. Es ist bekannt, dass FADD Todesrezeptorunabhängig phosphoryliert wird, in den Zellkern transloziert und dort an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist (Alappat *et al.*, 2003). Diese Phosphorylierung soll entscheidend für die Induktion des nach Taxol-Behandlung auftretenden G₂/M-Arrestes sein (Alappat *et al.*, 2005). Jedoch ist auch diese Todesrezeptor-unabhängige Funktion von FADD und ihre Notwendigkeit für die Apoptoseinduktion nach Taxol-Behandlung noch umstritten (Wieder *et al.*, 2001).

Vieles deutet demnach darauf hin, dass Taxol-induzierte Apoptose nicht über den Todesrezeptor-assoziierten Signalweg verläuft. Doch auch der Einfluss des mitochondrialen Signalweges auf Taxol-induzierte Apoptose ist nicht genau geklärt. Während in einigen Publikationen vermutet wird, dass Zelltod nach Taxol-Behandlung Apaf-1- und Caspase-9- (und sogar Caspase-3-) unabhängig verläuft (Ofir *et al.*, 2002), deuten andere Veröffentlichungen auf eine mögliche, wichtige Rolle dieser zentralen Apoptosemodulatoren hin (Perkins *et al.*, 2000; Perkins *et al.*, 1998).

In diesem Zusammenhang stehen auch Untersuchungen, die sich mit der Rolle der Bcl-2-Familienmitglieder beschäftigen. Es wurde vermutet, dass beispielsweise Bcl-2 eine besondere Funktion während der Induktion von Taxol-vermittelter Apoptose einnimmt. Dabei wird angenommen, dass Bcl-2, trotz seiner eigentlich antiapoptotischen Natur, notwendig für die Apoptoseinduktion sei. Dies wird durch eine Taxol-induzierte Phosphorylierung des Proteins begründet, die mit der Bindung von Bcl-2 an das proapoptotische Protein Bax interferieren könnte. Dadurch läge mehr freies Bax in den Zellen vor, welches dann Apoptose induzieren könnte (Haldar *et al.*, 1996). Mittlerweise konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Bcl-2 auch im normalen Zellzyklus in der G₂/M-Phase induziert wird. Somit tritt die Bcl-2-Phosphorylierung zwar auch durch den induzierten Zellzyklusarrest während einer Taxol-Behandlung auf, ist jedoch wahrscheinlich keine Voraussetzung für die Induktion von Apoptose (Ling *et al.*, 1998). Die Rolle von Bcl-2 während Taxol-vermittelter Apoptose bleibt somit ungeklärt.

Ähnlich verhält es sich auch mit dem Einfluss der proapoptotischen Bcl-2-Proteine Bak und Bax. Es ist bisher nicht im Detail verstanden, ob Bak und Bax während Taxol-induziertem Zelltod eine redundante Funktion übernehmen oder ob der Prozess im Wesentlichen nur von einem der beiden Bcl-2-Familienmitglieder abhängt. Da Taxol seit geraumer Zeit als Chemotherapeutikum verwendet wird, ist es von besonderem Interesse den Mechanismus der Apoptoseinduktion zuklären. Dieses Wissen könnte einen gezielteren Einsatz des Chemotherapeutikums ermöglichen.



2. Zielsetzung

Ziel einer Chemotherapie ist die effektive, spezifische Eliminierung entarteter Zellen. Dabei basiert die Wirksamkeit zytotoxischer Chemotherapien im Prinzip auf der Induktion von Apoptose in den Tumorzellen.

Apoptose kann über zwei verschiedene, miteinander kommunizierende Signalwege ausgelöst werden. Der extrinsische Apoptosesignalweg wird durch die Aktivierung von Todesrezeptoren durch spezifische Liganden aktiviert, während der intrinsische durch intrazellulär generierte Signale, wie z.B. einer Schädigung der DNA, induziert wird.

Die Inaktivierung solcher Zelltodmechanismen stellt für maligne Tumore einen entscheidenden Selektionsvorteil dar und ist eine der am häufigsten anzutreffenden Veränderungen dieser Zellen. Dabei kann eine solche Inaktivierung beide Signalwege betreffen und auf jeder Ebene auftreten. Hieraus wird deutlich, dass Resistenzen von Tumoren gegenüber Chemotherapien häufig in Defekten apoptotischer Signalwege begründet sind, die es Tumorzellen nicht ermöglichen, Apoptose auszulösen oder durchzuführen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die molekularen Grundlagen der auftretenden Resistenzen bei Behandlung von Tumoren mit dem Chemotherapeutikum Taxol zu untersuchen. Neuartige Chemotherapeutika, die Apoptose durch die Induktion von ER-Stress auslösen, könnten eine Alternative zu klassischen Therapeutika darstellen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher die vergleichende Charakterisierung der noch weitestgehend unbekannten Signaltransduktionswege, die zur Apoptose von Tumorzellen bei Behandlung mit ER-Stressinduzierenden Agenzien, wie z.B. Thapsigargin, führen.

Eine genaue molekulare Kenntnis der zellulären Signaltransduktionsprozesse unter Behandlung mit Taxol oder Thapsigargin könnte daher zur Entwicklung spezifischer Strategien zur Umgehung von resistenten Tumorphänotypen genutzt werden. Ziel dieser Entwicklung sind effektivere Therapiestrategien und eine Verringerung der unter Therapie auftretenden Resistenzen. Therapeutische Interventionsmöglichkeiten könnten außerdem wesentlich erweitert werden, wenn der zytotoxischen Wirkung von ER-Stress-induzierenden Reagenzien ein grundsätzlich anderer apoptotischer Signaltransduktionsweg zu Grunde liegen würde.

2.1 Mechanismus der Taxol-induzierten Apoptose

Taxol gehört zur Klasse der Mikrotubuli-interferierenden Chemotherapeutika und wird zur Therapie von Ovarialkarzinomen, fortgeschrittenen Mammakarzinomen und nicht-

kleinzelligen Lungenkarzinomen eingesetzt. Es bindet irreversibel und mit hoher Affinität an die β-Untereinheit des Tubulins der bereits aufgebauten Mikrotubuli und inhibiert so ihre Depolymerisation. Dadurch sind Zellen nach Taxol-Behandlung nicht mehr in der Lage den für die Zellteilung notwendigen, funktionsfähigen Spindelapparat aufzubauen. Dies führt zur Induktion von Apoptose nach Taxol-Behandlung. Die zu Grunde liegenden molekularen Signaltransduktionswege und die beteiligten Apoptosemodulatoren sind noch nicht bekannt und werden kontrovers diskutiert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb der Mechanismus des Taxol-induzierten Zelltodes genauer charakterisiert werden. Bislang wurden zur Untersuchung wesentlicher Komponenten des Taxol-induzierten Apoptosesignalweges pharmakologische Inhibitoren oder RNA-Interferenz verwendet. Diese Reagenzien ermöglichen häufig nur eine unvollständige Inhibition bzw. eine reduzierte Expression von Proteinen. Insbesondere bei pharmakologischen Inhibitoren besteht häufig das Problem einer zu geringen Spezifität, so dass ein möglicher Einfluss eines Proteins auf einen Signalweg nicht vollständig ausgeschlossen oder nachgewiesen werden kann. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit zelluläre Modellsysteme, in denen die Gene der zu untersuchenden Proteine spezifisch deletiert sind, zur Identifizierung wesentlicher Komponenten des Taxol-induzierten Signalweges verwendet werden.

2.2 Induktion von Zelltod nach ER-Stress

Eine der Hauptaufgaben des ER ist die korrekte Faltung neu synthetisierter Proteine. Dafür werden bestimmte Bedingungen im ER-Lumen benötigt, die dieses Organell sehr anfällig für Veränderungen des zellulären Milieus machen. Durch eine Störung der ER-Homöostase kann es dort zur Akkumulation ungefalteter Proteine kommen. Als Reaktion wird die *"unfolded protein response"* (UPR) ausgelöst, die der Wiederherstellung physiologischer Bedingungen dient. Ist dies nicht möglich, so wird in Zellen Apoptose induziert. Der zu Grunde liegende molekulare Mechanismus ist noch nicht bekannt und wird kontrovers diskutiert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb der Signalweg und die essentiellen Komponenten, die zur Induktion von Apoptose nach ER-Stress führen, charakterisiert werden. Zur Untersuchung sollten die ER-Stress-induzierenden Reagenzien Thapsigargin, Brefeldin A und Tunicamycin verwendet werden. Obwohl die Reagenzien unterschiedliche molekulare Angriffsziele haben wird vermutet. dass sie in Zellen über die gleichen Signaltransduktionswege die Induktion von Apoptose bedingen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb auch etwaige Unterschiede zwischen den zellulären Auswirkungen der Reagenzien untersucht werden.

28

Material und Methoden
3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Taxol (Paclitaxel), Thapsigargin, Brefeldin A, Tunicamycin und Staurosporin wurden von Merck (Darmstadt), O-VD-OPh von MP Biomedicals (Wiesbaden) bezogen.

3.1.2 Eukaryontische Zellen

Zur Kultivierung der Zellen wurden allen Medien 50 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 10% fötales Kälberserum (FKS) zugefügt.

Zelllinie	Herkunft	Charakteristika	Medium / Supplemente
Jurkat A3	humane T-Lymphozyten	akute T-Zell- Leukämie	RPMI 1640
Jurkat A3, Caspase- 8-defizient	humane T-Lymphozyten	fehlende Caspase-8- Expression nach Mutagenese (Juo <i>et al</i> ., 1998)	RPMI 1640
Jurkat A3, FADD- defizient	humane T-Lymphozyten	fehlende FADD- Expression nach Mutagenese (Juo <i>et al.</i> , 1999)	RPMI 1640
Jurkat E6	humane T-Lymphozyten		RPMI 1640
Jurkat E6, Bcl-2 _{tg}	humane T-Lymphozyten	Bcl-2 überexprimierend (Armstrong <i>et al.</i> , 1996)	RPMI 1640
Jurkat JMR	humane T-Lymphozyten	fehlende Caspase-9- Expression nach Mutagenese (Samraj <i>et al.</i> , 2007)	RPMI 1640
Jurkat JMR/ Caspase-9	humane T-Lymphozyten	Caspase-9 überexprimierend (Samraj <i>et al</i> ., 2007)	RPMI 1640
MCF-7	humanes Mammakarzinom	Caspase-3 defizient	RPMI 1640
MCF-7/Caspase-3	humanes Mammakarzinom	Caspase-3 überexprimierend (Janicke <i>et al.</i> , 1998)	RPMI 1640 400 μg/ml Geneticin
MCF-7/Caspase-10	humanes Mammakarzinom	Caspase-10 überexprimierend (Engels <i>et al.</i> , 2005)	RPMI 1640 300 μg/ml Zeocin

MCF-7/Caspase-3/ Caspase-10	humanes Mammakarzinom	Caspase-3 und -10 überexprimierend (Engels <i>et al</i> ., 2005)	RPMI 1640 300 μg/ml Zeocin 400 μg/ml Geneticin
MEF	murine, embryonale Fibroblasten		DMEM
MEF, Apaf-1 ^{-/-}	murine, embryonale Fibroblasten	Deletion des <i>Apaf-1-</i> Gens (Cecconi <i>et al.</i> , 1998)	DMEM
MEF, Bak ^{-/-}	murine, embryonale Fibroblasten	Deletion des <i>Bak-</i> Gens (Lindsten <i>et</i> <i>al</i> ., 2000)	DMEM
MEF, Bax⁻/₋	murine embryonale Fibroblasten	Deletion des <i>Bax-</i> Gens (Knudson <i>et</i> <i>al.</i> , 1995)	DMEM
MEF, Bak/Bax ^{-/-}	murine embryonale Fibroblasten	Deletion des <i>Bak-</i> und des <i>Bax</i> -Gens (Lindsten <i>et al</i> ., 2000)	DMEM
MEF, Bid- ^{/-}	murine embryonale Fibroblasten	Deletion des <i>Bid-</i> Gens (Yin <i>et al.</i> , 1999)	DMEM
MEF, Bim ^{-/-}	murine embryonale Fibroblasten	Deletion des <i>Bim</i> - Gens (Bouillet <i>et al.</i> , 1999)	DMEM
MEF, Caspase-2 [≁]	murine embryonale Fibroblasten	Deletion des <i>Caspase-2</i> -Gens (Bergeron <i>et al.</i> , 1998)	DMEM
MEF, Caspase-9 ^{-/-}	murine embryonale Fibroblasten	Deletion des <i>Caspase-9</i> -Gens (Hakem <i>et al.</i> , 1998)	DMEM
SHEP	humanes Neuroblastom		RPMI 1640
SH-SY5Y	humanes Neuroblastom	Verlust der Caspase- 8/-10 Expression durch Promotor- Methylierung (Teitz <i>et al.</i> , 2000)	RPMI 1640

3.1.3 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> Stamm	Genotyp	Verwendung	Bezugsquelle
BL21 (DE3) gold	E. coli B F [−] ompT hsdS (r _B [−] m _B [−]) dcm ⁺ Tet ^r galλ (DE3) endA Hte,	Bakterienstamm zur Expression von Fusionsproteinen	Stratagene (Heidelberg)

Antigen	Reaktivität	Spezies	Klon	Verwendung	Bezugsquelle
Aktin	human, murin	Maus	AC-74	WB	Sigma
Apaf-1	human, murin	Ratte	18H2	WB	Alexis Biochemicals (Lörrach)
Bak	human, murin	Kaninchen		WB	Upstate (Schwalbach)
Bax	human, murin	Kaninchen		WB	Upstate
Bcl-2	human, murin	Maus	C-2	WB	Santa Cruz (Heidelberg)
Bid	human, murin	Ziege		WB	R&D SYSTEMS (Wiesbaden- Nordenstadt)
Bim	human, murin	Kaninchen		WB	Stressgene (Michigan, USA)
Caspase-2	human, murin	Ratte	11B4	WB	Alexis
Caspase-3	human	Ziege		WB	R&D SYSTEMS
Caspase-3	murin	Kaninchen		WB	Pharmingen (Heidelberg)
Caspase-3 p17/19	human, murin	Kaninchen		WB	Cell Signaling (Danvers, USA)
Caspase-8	human	Maus	12F5	WB	Alexis
Caspase-8	murin	Ratte	IG12	WB	Alexis
Caspase-9	human	Kaninchen		WB	Cell Signaling
Caspase-9	murin	Kaninchen		WB	Cell Signaling
Caspase-10	human	Maus	4C1	WB	MBL (Woburn,USA)
Cytochrom c	human, murin	Maus	6H2.B4	DZ	BD Bioscience (Heidelberg)
PARP	human, murin	Maus	7D3-6	WB	BD Bioscience
Tubulin	human, murin	Maus	DM1A	WB, IF	Sigma

3.1.4 Primäre Antikörper

WB: Western Blot DZ: Durchflusszytomterie IF: Immunfluoreszenz

3.1.5 Sekundäre Antikörper (Meerrettich-Peroxidase-konjugiert)

Antigen	Reaktivität	Spezies	Bezugsquelle
lgG	Kaninchen	Ziege	Santa Cruz
lgG	Maus	Ziege	Promega (Mannheim)
lgG	Ziege	Kaninchen	Molecular Probes (Karlsruhe)

	Datta	Ziana	Santa Cruz
lgo	Ralle	Ziege	Sania Gruz

3.1.6 Sekundäre Antikörper (Fluoreszenz-markiert)

Antigen	Reaktivität	Spezies	Konjugat	Bezugsquelle
lgG	Maus	Huhn	Alexa Fluor 488	Molecular Probes

3.1.7 Größenstandards

Bezeichnung	Verwendungszweck	Bezugsquelle
High-Range Rainbow Molecular Weight Marker	Protein Größenstandard (14,3-220 kDa)	Amersham Bioscience (Buckinghamshire, UK)
Low-Range Rainbow Molecular Weight Marker	Protein Größenstandard (2,5-45 kDa)	Amersham Bioscience
Page Ruler	Protein Größenstandard (11-140 kDa)	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die Kultivierung eukaryontischer Zellen erfordert sterile Bedingungen, um Kontaminationen mit Bakterien, Hefen oder Pilzen zu vermeiden. Daher wurden alle Arbeiten in Zellkulturlaboratorien an speziellen Sterilarbeitsbänken (HeraSafe, Heraeus, Hanau) durchgeführt. Es wurden ausschließlich γ-bestrahlte Zellkulturmaterialien, wie z.B. Kulturschalen (Greiner, Solingen), Kulturflaschen (Greiner), Pipetten (Costar, Corning, USA) und Zentrifugenröhrchen (Greiner) verwendet. Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C in 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in einem Inkubator (HeraCell, Heraeus) kultiviert. Die für die Zellkultur verwendeten Medien (DMEM, RPMI 1640) und Supplemente, wie z.B. Penicillin/Streptomycin, fötales Kälberserum (FKS), Geneticin und Zeocin wurden von der Firma PAA Laboratories (Pasching, Österreich) bezogen.

3.2.2 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Zur Kryokonservierung eukaryontischer Zellen wurde dem Kulturmedium neben 20% fötalem Kälberserum, 10% Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) zugesetzt, das die Kristallbildung von Wasser beim Einfrieren vermindert. Die Zellen wurden in einer Dichte von maximal 2-3 x 10⁶-Zellen/ml in Einfriermedium (DMEM/RPMI, 20% FKS, 10% DMSO) aufgenommen und über Nacht auf -80°C abgekühlt. Die langfristige Lagerung erfolgte anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C erwärmt und in ein Zentrifugenröhrchen mit Medium überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 300 g für 5 min (Multifuge 3-S-R, Heraeus). Das Zellpellet wurde dann in frischem, vorgewärmtem Medium aufgenommen und in ein Kulturgefäß überführt.

3.2.3 Herstellung und Lagerung von Zellpellets

Zur Herstellung von Zellpellets wurden Zellen mit einem Zellschaber (Sarsted, Nümbrecht) oder durch Behandlung mit Trypsin (PAA) vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst und in 15 ml-Röhrchen überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 300 g und 4°C (Multifuge 3-S-R, Heraeus) wurde der Überstand entfernt. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C.

3.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Um die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen und deren Veränderung als Reaktion auf verschiedene Stimuli zu untersuchen, wurden eukaryontische Zellen zunächst fixiert,

permeabilisiert und die zu untersuchenden Proteine dann mit spezifischen, Fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt. Dazu wurden 5 x 10⁴-Zellen in Kulturschalen auf Deckgläschen ausplattiert, über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend mit Chemotherapeutika stimuliert. 24 h nach Behandlung wurden die Zellen zunächst mit PBS (phosphate buffered saline, PAA) gewaschen und 1 min in Methanol/Aceton (1:1) fixiert. Dem Trocknen der Deckgläschen und der anschließenden Rehydratisierung in PBS, folgte eine einstündige Blockierung (5% BSA (Rinderserumalbumin); 0,05% Saponin in PBS). Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (0,2 µg/ml in Blockierungslösung) erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Deckgläschen wurden im Anschluss dreimal mit PBS gewaschen, um nichtgebundene Antikörper zu entfernen und 1 h bei Raumtemperatur (RT) mit sekundärem Antikörper (100 µg/ml in Blockierungslösung) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS konnten die Deckgläschen angetrocknet und mit Einbettmedium (Mounting Medium, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) auf Objektträgern fixiert werden. Durch das im Einbettmedium enthaltene 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, 1 µg/ml) wurden die Zellkerne angefärbt. Die Analyse und Dokumentation erfolgte entweder mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops [Axiovert 135, Zeiss (Jena); Kamera: ProGress C14, Jenoptik; Software: Openlap, Volocity (Improvision, Coventry, UK)] oder eines konfokalen Laserscanmikroskops [Leica (Solms) LSM 510 Meta: Software: LCS light].

3.2.5 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde in Kooperation mit dem Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie der Heinrich-Heine-Universität unter der Leitung von Prof. Dr. Heinz Mehlhorn in freundlicher Zusammenarbeit mit Marion Nissen durchgeführt.

3.2.6 Zytotoxizitäts-Tests

Zur kolorimetrischen Bestimmung der Zytotoxizität von Chemotherapeutika wurde ein Verfahren verwendet, das auf der Färbung von Zellen mit Kristallviolett basiert (Gillies *et al.*, 1986). Dazu wurden je 2 x 10⁴ Zellen pro Vertiefung in einer 96-Loch-Platte ausplattiert, über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend mit Chemotherapeutika oder ER-Stressinduzierenden Reagenzien behandelt. Nach 48 bzw. 72 h wurden die Zellen mit Kristallviolett (0,5% Kristallviolett; 20% Methanol) gefärbt und der Farbstoff anschließend mit Essigsäure (33%) solubilisiert. Nach Bestimmung der Absorption bei 590 nm (A590) wurde, der spezifische Zelltod und somit die Zytotoxizität ermittelt.

> spezifischer Zelltod [%] = 100 - A590 der getesteten Probe x 100 A590 einer unbehandelten Probe

3.2.7 Durchflusszytometrie

3.2.7.1 Nachweis von Zelltod durch Propidiumiodid-Ausschluss

Der Farbstoff Propidiumiodid ist nicht membranpermeabel und kann nur in Zellen mit zumindest partiell geschädigter Plasmamembran eindringen und dort in DNA interkalieren. Tote Zellen weisen im Durchflusszytometer (*fluorescence activated cell sorter*, FACS) eine höhere Fluoreszenz auf als lebende. Deshalb ist der Propidiumiodid-Ausschluss eine einfache und effektive Methode, um lebende Zellen von toten zu unterscheiden. Für den Propidiumiodid-Ausschluss wurden die Zellen, nach Stimulation mit Chemotherapeutika oder ER-Stress-induzierenden Reagenzien, zunächst mit Trypsin abgelöst und anschließend aus den Kulturschalen in spezielle FACS-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 300 g und 4°C (Multifuge 3-S-R, Heraeus) wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend in PBS aufgenommen und mit Propidiumiodid (2 µg/ml; Sigma) versetzt. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer (FL2-Standardeinstellungen, Messung von je 10000 Zellen pro Probe, FACSCalibur, Software: Cell Quest Pro, BD Bioscience).

3.2.7.2 Nachweis von Apoptose nach Nicoletti

Der Nachweis von hypodiploider DNA, der erstmals von Nicoletti *et al.* (1991) beschrieben wurde, ist eine einfache Methode, um in einer Population den Anteil apoptotischer Zellen zu ermitteln. Behandelt man Zellen mit einem hypotonen Puffer, so wird die Plasmamembran zerstört, wodurch Zytoplasma und RNA ausströmen. Das Propidiumiodid im Puffer kann dann in die DNA interkalieren. Im Durchflusszytometer kann diploide DNA (höhere Fluoreszenz) detektiert werden, die sich leicht von der hypodiploide Population (niedrigere Fluoreszenz), die von den apoptotischen Nuklei gebildet wird, unterscheiden lässt.

Für den Nachweis von Apoptose nach Nicoletti wurden die Zellen, nach Stimulation mit Chemotherapeutika oder ER-Stress-induzierenden Reagenzien, zunächst mit Trypsin abgelöst, aus Kulturschalen in spezielle FACS-Röhrchen überführt und 5 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und in 200 µl hypotonem Citrat-Puffer (0,1% Na-Citrat, 0,1% Triton X-100, 50 µg/ml Propidiumiodid) aufgenommen. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer (FL3-Standardeinstellungen, Messung von je 10000 Zellen pro Probe).

3.2.7.3 Nachweis von Apoptose durch Annexin V-Bindung

Ein sehr früh nachzuweisendes Merkmal der Apoptose ist der Verlust der asymmetrischen Verteilung von Phosphatidylserin (PS) in der Plasmamembran der Zelle. Normalerweise befindet sich PS fast ausschließlich in der dem Zytoplasma zugewandten

Phospholipidschicht der Doppelmembran und nicht auf der Außenseite der Zelle. Diese Asymmetrie wird unter Energieaufwand aufrechterhalten. Bei der Apoptose geht diese Asymmetrie verloren. Der durchflusszytometrische Nachweis von PS auf der Zelloberfläche erfolgt mittels Fluoreszenz-gekoppeltem Annexin V. Annexin V bindet spezifisch und hochaffin an Phosphatidylserin.

Zum Nachweis von Apoptose durch Annexin V-Bindung wurden Zellen, nach Stimulation mit Chemotherapeutika oder ER-Stress-induzierenden Reagenzien, zunächst mit Trypsin abgelöst, aus Kulturschalen in spezielle FACS-Röhrchen überführt und 5 min bei 300 g und RT zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und in 200 µl Bindungspuffer (10 mM Hepes/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) aufgenommen. Nach Zugabe von 5 µl des gebrauchsfertigen Annexin V-FITC (BD Bioscience) sowie 2 µg/ml Propidiumiodid, erfolgte eine 15-minütige Inkubation unter Lichtausschluss und die anschließende Analyse im Durchflusszytometer (FL1/FL2-Standardeinstellungen, Messung von je 10000 Zellen pro Probe)

3.2.7.4 Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta \Psi m$)

Der Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta \Psi_m$) ist ein frühes Merkmal der Apoptose. Zur durchflusszytometrischen Messung wird der kationische, lipophile Farbstoff 3,3'-Dihexyloxacarbocyaniniodid (DiOC₆) verwendet. Auf Grund seiner lipophilen Eigenschaften kann er die intakte Mitochondrienmembran durchdringen und dank seiner positiven Ladung innerhalb der negativ geladenen Mitochondrienmatrix akkumulieren. Bei Induktion von Apoptose über den intrinsischen Signalweg kommt es zu einem Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials, wodurch die Aufnahme des Farbstoffes in die Mitochondrien verringert wird. Dies wird im Durchflusszytometer durch eine schwächere Fluoreszenz im Vergleich zu nicht-apoptotischen Zellen sichtbar.

Zur Bestimmung des mitochondrialen Transmembranpotentials wurden Zellen nach Stimulation mit Chemotherapeutika oder ER-Stress-induzierenden Reagenzien zunächst mit Trypsin abgelöst, aus Kulturschalen in spezielle FACS-Röhrchen überführt, 5 min bei 300 g und RT zentrifugiert und mit 40 nM DiOC₆ (Molecular Probes) gefärbt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C unter Lichtausschluss wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit Propidiumiodid (2 μ g/ml) versetzt und im Durchflusszytometer analysiert (FL1/Fl2-Standardeinstellungen, Messung von je 10000 Zellen pro Probe).

3.2.7.5 Durchflusszytometrischer Nachweis der Cytochrom c-Freisetzung

Nach Induktion von Apoptose kann es zur Oligomerisierung von Bak und Bax kommen, wodurch Poren in der äußeren Mitochondrienmembran gebildet werden. Durch diese Poren

kann Cytochrom c ins Zytoplasma austreten und dort zusammen mit Apaf-1 das Apoptosom, einen multimeren Proteinkomplex, der als Plattform zur Aktivierung von Caspase-9 dient, bilden. Die Freisetzung von Cytochrom c ist demnach nicht nur eine Begleiterscheinung der Apoptose, sondern Folge der Induktion des mitochondrialen Signalweges.

Zum durchflusszytometrischen Nachweis der Cytochrom c-Freisetzung wurden Zellen, nach Stimulation mit Chemotherapeutika oder ER-Stress-induzierenden Reagenzien, mit Trypsin abgelöst, aus Kulturschalen in spezielle FACS-Röhrchen überführt und für 5 min bei 300 g und RT zentrifugiert. Die Zellpellets wurden zunächst 5 min bei 4°C permeabilisiert (100 mM KCl; 50 µg/ml Digitonin in PBS) und anschließend 20 min bei RT fixiert (4% Formaldehyd in PBS). Nach dreimaligen Waschen in PBS wurden die Zellen zunächst 1 h bei RT in Blockierungslösung (5% BSA; 0,05% Saponin in PBS) inkubiert. Nach Zugabe des ersten Antikörpers (2,5 µg/ml) in Blockierlösung wurden die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen 1 h bei RT mit Alexa Fluor 488-gekoppeltem, sekundärem Antikörper (100 µg/ml in Blockierungslösung) inkubiert, erneut gewaschen, in PBS resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert (FL1/FL2-Standardeinstellungen, Messung von je 10000 Zellen pro Probe).

3.2.7.6 Acridinorange-Färbung

Die Acridinorange-Färbung kann zur durchflusszytometrischen Detektion von Autophagie verwendet werden. Während dieser Art des Zelltodes kommt es zur Akkumulation saurer Vesikel, die durch den Farbstoff nachgewiesen werden können. Acridinorange weist bei neutralem pH eine Membranpermeabilität auf, die bei saurem pH geringer wird. Daher kommt es zur Akkumulation des Farbstoffes in sauren Kompartimenten, wie Autophagolysosomen. Durch Färbung von Zellen mit Acridinorange erscheint das Zytoplasma, auf Grund des neutralen pH-Wertes, hellgrün, wogegen saure Kompartimente, nach Anregung, rotes Licht emittieren. Die Intensität der roten Fluoreszenz ist proportional zur Konzentration saurer Vesikel.

Zum Nachweis autophagischer Vesikel wurden 3 x 10^4 Zellen in Kulturschalen ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. An bestimmten Zeitpunkten nach Stimulation mit ER-Stress-induzierenden Reagenzien wurden die Zellen mit Acridinorange (1 µg/ml, Merck) versetzt und 20 min lichtgeschützt bei RT inkubiert. Anschließend wurden sie mit Trypsin abgelöst, aus Kulturschalen in spezielle FACS-Röhrchen überführt, 5 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert und in PBS resuspendiert. Mittels durchflusszytometrischer Analyse konnte dann die Bildung saurer Vesikel, die als Indikator für die Induktion von Autophagie dient, in Relation zu unbehandelten Kontrollen gemessen werden. (FL2-Standardeinstellungen, Messung von je 10000 Zellen pro Probe)

3.2.8 Klonogenitäts-Tests

Um zu Überprüfen, ob Zellen eine zeitlich begrenzte Behandlung mit zytotoxischen Reagenzien überleben und danach ihre proliferative Aktivität wieder erlangen, wurden Klonogenitäts-Tests durchgeführt. Dazu wurden je 3 x 10⁴ Zellen pro Vertiefung in einer Kulturplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. 48 h nach Stimulation mit Chemotherapeutika oder ER-Stress-induzierenden Reagenzien wurden die Zellen mit frischem Medium versetzt und für weitere 24 h bei 37°C inkubiert. Waren die unbehandelten Kontroll-Zellen 90% konfluent, so wurden alle Zellen mit Trypsin abgelöst und 1:10 in Kulturschalen mit frischem Medium verdünnt. Sechs Tage nach Inkubation erfolgten die Färbung mit Kristallviolett und die Bestimmung der relativen Proliferation.

rel. Proliferation [%] = A590 der getesteten Probe x 100 A590 einer unbehandelten Probe

3.2.9 Seneszenz-assoziierte ß-Galaktosidase-Färbung

Zum qualitativen Nachweis von Seneszenz wird das Substrat 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid (X-Gal) verwendet. Es wird durch das in seneszenten Zellen aktive Enzym β -Galaktosidase hydrolysiert, wodurch Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl, ein blauer Indolfarbstoff, entsteht. Zum Nachweis Seneszenz-assoziierter β -Galaktosidase-Aktivität wurden 3 x 10⁴ Zellen in Kulturplatten ausplattiert und mit steigenden Taxol-Konzentrationen behandelt. Nach 48 h wurden die Zellen mit frischem Medium ohne Taxol versetzt und für weitere 24 h bei 37°C inkubiert. Waren die unbehandelten Kontroll-Zellen 90% konfluent, so wurden alle Zellen mit Trypsin abgelöst und 1:10 in Kulturschalen mit Deckgläschen und frischem Medium verdünnt. Nach 14 Tagen wurden die Zellen zunächst 5 min bei RT fixiert (0,2% Glutaraldehyd; 2% Formaldehyd), mit PBS gewaschen und anschließend 24 h in der Färbelösung (150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM K₃Fe(CN₆), 5 mM K₂Fe(CN₆), 40 mM Zitronensäure, 12 mM Natriumphosphat pH 6,0 mit 1 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-galaktosid) bei 37°C unter CO₂-Ausschluss inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops.

3.2.10 Herstellung zytoplasmatischer Lysate

Zur Analyse zytoplasmatischer Proteine in Zelllysaten ist es ausreichend Zellen mit einem milden Lysepuffer (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 2 µg/ml Aprotinin, 2 µg/ml Leupeptin, 2 µg/ml Pepstatin A) zu lysieren. Das Detergenz in der Lösung permeabilisiert die Plasmamembran, wodurch lösliche Proteine des Zytoplasmas entlang eines Konzentrationsgradienten, welcher durch den Salzgehalt im

Puffer gebildet wird, nach außen diffundieren. Zur zytoplasmatischen Lyse wurden jeweils 10⁶ Zellen in 100 µl Lysepuffer aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 30 min bei 20000 g (Zentrifuge 54177R, Eppendorf, Hamburg) und 4°C, wurde der Überstand (lösliche Fraktion) in ein frisches Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt. Nach Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford oder mittels BCA, wurden die Lysate (25 µg Gesamtprotein) in 2 x Ladepuffer (100 mM Tris pH 6,8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0,2% Bromphenol Blau, 20% Glycerin) aufgenommen, 5 min bei 100°C denaturiert, auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Western Blot weiter analysiert.

3.2.11 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur gleichzeitigen Analyse nukleärer und zytoplasmatischer Proteine ist es notwendig, einen Gesamtzellextrakt herzustellen. Hierfür müssen Lysepuffer verwendet werden, die entweder eine hohe Salzkonzentration und/oder ein starkes Detergenz zur Auflösung der Kernmembran enthalten.

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden jeweils 10⁶ Zellen in 100 µl Lysepuffer aufgenommen (20 mM HEPES pH 7,9, 350 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 20% Glycerin, 1% NP-40, 0,1% SDS, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 2 µg/ml Aprotinin, 2 µg/ml Leupeptin, 2 µg/ml Pepstatin A). Das Detergenz im Lysepuffer sorgt für eine Auflösung der Kernmembran, so dass nukleäre Proteine freigesetzt werden. Durch die hohe Salzkonzentration kommt es zu Störungen der elektrostatischen Wechselwirkungen von Proteinen und DNA, so dass auch Proteine, die an DNA gebunden waren, von dieser abgelöst wurden. Zur Lyse der Zellen erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Lysate für 30 min bei 20000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in frische Reaktionsgefäße überführt und der Proteingehalt der Lysate bestimmt. Die Proben wurden in 2 x Ladepuffer aufgenommen, 5 min bei 100°C denaturiert, auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Western Blot weiter analysiert.

3.2.12 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Konzentration einer Proteinlösung kann über einen von Bradford entwickelten Test bestimmt werden. Hierbei wird die Eigenschaft des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau ausgenutzt, in Gegenwart von Proteinen eine Rotverschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm aufzuweisen (Compton und Jones, 1985). Der Grund für diese Verschiebung ist die Stabilisierung der unprotonierten Sulfonat-Form des Farbstoffes durch eine Komplexbildung mit kationischen Seitenketten der Proteine. Um eine Lösung mit unbekannter Proteinkonzentration zu bestimmen, muss zunächst eine Eichgerade mit definierten Proteinkonzentrationen erstellt werden. Die entsprechende Funktionsgleichung liefert dann die unbekannte Proteinkonzentration. Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford wurden in einer Halbmikroküvette (Sarstedt) 995 µl Bradford-Reagenz (1:5 in Wasser verdünnt, BIO-RAD, München) mit 5 µl der Probe versetzt. Der Inhalt der Küvette wurde gemischt und für zehn Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 595 nm (UV/VIS Spectrometer Lambda 20, PERKIN ELMER, Waltham, USA) gemessen. Die Proteinkonzentration wurde dann mit Hilfe der Eichgeraden ermittelt.

3.2.13 Konzentrationsbestimmung von Proteinen durch Bicinchoninsäure (BCA)

Diese Methode der Proteinkonzentrationsbestimmung beruht auf der Verknüpfung der Biuret- mit einer Indikatorreaktion. Bicinchoninsäure bildet selektiv mit den aus der Biuretreaktion resultierenden Cu²⁺-Ionen eine Farbkomplex. Die Proteinbestimmung mittels BCA erfolgte gemäß Herstellerangaben (PIERCE, Bonn).

3.2.14 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen in einer porösen Gelmatrix entsprechend ihrem Molekulargewicht müssen sie vollständig denaturiert werden. Dies geschieht durch Erhitzen und Behandlung der Proben mit SDS (Natriumdodecylsulfat) und DTT (Dithiothreitol). In wässrigem Milieu binden die Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen den aliphatischen Teil des SDS, während die negativ geladene Sulfatgruppe des SDS nach außen gerichtet ist. Die Eigenladung der Proteine wird dadurch überdeckt. Durch die Beladung von 1 g Protein mit etwa 1,4 g SDS entsteht ein konstantes Masse/Ladungsverhältnis, wodurch die Retardierung eines Proteins im Gel linear abhängig vom Molekulargewicht wird.

Zur Auftrennung von Proteinen wurden 6-, 8-, 10-, 12- oder 15%ige Trenngele verwendet denen 5%ige Sammelgele aufgelagert wurden. Für die Elektrophorese wurde das Mini-Protean 3 Cell System von BIO-RAD benutzt. Die Gele wurden mit Laufpuffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1% SDS) bedeckt und die in Probenpuffer aufgenommenen und denaturierten Proben wurden in die Taschen des Sammelgels geladen. Nach Anlegen einer Spannung wandern Chloridionen als Leitionen vor der Proteinfraktion. Glycinionen, die bei pH 6,8 hauptsächlich als in der Summe ungeladene Zwitterionen vorliegen, bleiben dahinter zurück. Die SDS-Proteinmizellen werden zwischen diesen Leit- und Folgeionen in einer Zone geringer Leitfähigkeit aufkonzentriert und erreichen fokussiert das Trenngel, wo sie dann ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt werden. Durch den höheren pH-Wert im Trenngel erhält das Glycin eine negative Nettoladung und wandert als Front vor der Proteinfraktion. Zur Molekulargewichtskontrolle sowie zur visuellen Kontrolle von Gelelektrophorese und anschließendem Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Hybond-P, Amersham Biosciences) wurde ein vorgefärbter Protein-Größenstandard verwendet.

	Sammelgel (5%) Gesamtvolumen: 10 ml	Trenngel (12%) Gesamtvolumen: 30 ml	Trenngel (15%) Gesamtvolumen: 30 ml
30% Acrylamid/Bisacrylamid Mix (BIO-RAD)	1,7 ml	12 ml	14 ml
Wasser	6,8 ml	9,9 ml	6,9 ml
1 M Tris-HCl pH 6,8	1,25 ml	-	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	7,5 ml	7,5 ml
10% SDS	100 µl	300 µl	300 µl
10% APS	100 µl	300 µl	300 µl
Temed	10 µl	12 µl	12 µl

3.2.15 Western Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden für nachfolgende Analysen mittels des *"Tank-Blot"*-Verfahrens elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen. Dabei wird ausgenutzt, dass die durch das SDS negativ geladenen Proteine zur Anode und damit aus dem Gel auf die Membran wandern. Dazu wurde in eine mit Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin pH 8) gefüllte Blotkammer (BIO-RAD) eine Transfereinheit eingehängt. Vor ihrem Zusammenbau wurde die PVDF-Membran zunächst 1 min in Methanol aktiviert, dann kurz in Wasser gewaschen und anschließend 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Membran und das aufliegende Gel wurden mit jeweils zwei in Transferpuffer getränkten 3MM-Papieren (Whatman, Dassel) abgedeckt. Der Transfer erfolgte 2 h bei 200 mA.

Im Anschluss an den Transfer wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in Blockierungslösung (5% BSA, 0,2% Tween-20 in PBS) für 1 h unter leichtem Schütteln abgesättigt. Die Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper (1 μ g/ml in Blockierungslösung) erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran sechsmal 10 min in PBST (PBS; 0,2 % Tween-20) gewaschen und eine Stunde lang bei RT mit Meerrettich-Peroxidase- (HRP) konjugiertem sekundärem Antikörper (100 μ g/ml in Blockierungslösung) inkubiert. Nach erneutem Waschen (sechsmalig mit PBST) erfolgte die Detektion mittels ECL gemäß Herstellerangaben (Amersham Biosciences). Nach Exposition des Films (ECL Hyperfilm, Amersham Bioscience) erfolgte seine Entwicklung (Curix 60, AGFA, Köln).

3.2.16 Aufreinigung rekombinanter Caspasen

3.2.16.1 Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung 6 x His-markierter Proteine erfolgte mittels Nickel-Nitrilotriessigsäure- (Ni-NTA, Qiagen, Hilden) Affinitätschromatographie. Die Imidazolringe der 6 x His-Markierung binden an die Ni-Ionen, die durch die NTA-Gruppe der Matrix immobilisiert sind. Imidazol selber kann ebenfalls an die Ni-Ionen binden und so die Bindung von Histidin-Resten, die in nicht-markierten Proteinen vorkommen, stören. Bei niedriger Imidazolkonzentration wird so eine unspezifische Bindung von Proteinen verhindert, wobei 6 x His-markierte Proteine weiterhin fest an die Ni-NTA-Matrix binden. Die Elution 6 x His-markierter Proteine erfolgt anschließend durch hohe Imidazolkonzentrationen. Unter diesen Bedingungen dissoziiert das markierte Protein von der Matrix. Zur Minimierung unspezifischer Bindungen empfiehlt es sich deshalb die Säule mit Imidazol zu waschen und die gewünschten Proteine anschließend durch steigende Imidazolkonzentration im Puffer zu eluieren.

Zur Aufreinigung 6 x His-markierter-Caspase-3 mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurden 10 ml einer Übernachtkultur von E.coli-Bakterien des Stammes BL-21 (DE3) Gold in 1 I frischem, Antibiotika-haltigem (Ampicillin: 100 µg/ml) LB-Medium (1% NaCl, 1% Bacto Trypton/Pepton, 0,5% Hefeextrakt, pH 7) inokuliert und bei 37°C unter ständigem Schütteln (220 rpm Certomat Bs-1, B.Braun Biotech International, Göttingen) bis zu einer Absorption von 0,3 bei 600 nm herangezogen. Nach Induktion der Proteinexpression durch Isopropylbeta-D-thiogalactopyranoside (IPTG, 0,1 mM, Applichem, Darmstadt) wurden die Ansätze 5 h bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde dann durch 30-minütige Zentrifugation bei 1200 g (SORVALL RC513 Plus) pelletiert und in Lysepuffer (5 ml Puffer pro Gramm Nasskultur: 50 mM Natriumphosphat pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) resuspendiert. Nach Zugabe von Lysozym (1 mg/ml) sowie Protease-Inhibitoren und 1 mM DTT, erfolgte eine Inkubation für 30 min unter leichtem Schütteln bei 4°C. Anschließend wurde die Suspension für 30 min bei 20000 g und 4°C zentrifugiert. Nachdem 1 ml, zuvor in Lysepuffer äquilibrierte, Ni-NTA-Agarose zu den Überständen der Zentrifugation gegeben wurde, erfolgte eine einstündige Inkubation bei 4°C unter leichtem Schütteln. Zur Gewinnung rekombinanter Proteine wurden die Ansätze anschließend auf eine Säule (Disposable Chromatography Columns, BIO-RAD) gegeben und zunächst zweimal mit Puffer Z (50 mM Natriumphosphat pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte durch Zugabe von 6 ml Puffer Z mit hoher Imidazolkonzentration (300 mM).

Zur Kontrolle der Aufreinigung wurden während der gesamten Durchführung nach jedem Schritt Proben genommen, die wie die Proben der Elutionsfraktionen in 2 x Ladepuffer aufgenommen, 5 min bei 100°C denaturiert und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden. Zum Nachweis der Proteine wurden die Gele mit Coomassie-Blau (0,25 g Coomassie Brillant Blue, 20% Methanol, 5% Essigsäure) fixiert, gefärbt und anschließend wieder entfärbt (20% Methanol, 5% Essigsäure).

3.2.16.2 Aufreinigung von Proteinen aus Einschlusskörpern

Caspase-10 befand sich nach Induktion mit IPTG (1 mM) nicht in der zytoplasmatischen Fraktion, sondern reicherte sich in unlöslichen, zellulären Einschlusskörpern an. Um die Caspase aus dieser Fraktion aufzureinigen wurde nicht der Überstand nach Zelllyse weiter verwendet, sondern das Pellet. Dieses wurde zunächst dreimal mit kaltem TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) gewaschen. Anschließend wurde es in 6 M Guanidinium-HCl (pH 1,5) denaturiert und 1 h bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 27500 g und 4°C, zur Entfernung des Zelltrümmer, wurde der Überstand, zur Renaturierung der Proteine, zunächst zügig 1:10 mit H₂0 verdünnt und anschließend mit dem zweifachen Puffervolumen (1 M Tris, 5 mM DTT pH 8,0) versetzt. Zur Konzentration und Aktivierung der Proteine sowie zum Pufferaustausch erfolgte die weitere Aufreinigung über Centricons (nach Herstellerangaben, Millipore, Schwalbach)

3.2.17 Nachweis aktiver Caspasen durch Biotin-Markierung

Zum Nachweis aktiver Caspasen in Zellextrakten kann eine biotinylierte und methylierte Variante des Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk (Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe)-Fluoromethylketon) verwendet werden. Der Inhibitor bindet spezifisch an das aktive Zentrum aktivierter Caspasen. Durch das gekoppelte Biotin können die gebundenen Caspasen anschließend mittels Streptavidin-Agarose aus den Zellextrakten präzipitiert werden.

Dazu wurden 1 x 10^7 Zellen in Kulturflaschen ausplattiert und über Nacht inkubiert. 24 h nach Stimulation mit ER-Stress-induzierenden Agenzien wurde die Zellsuspension mit Biotin-VADfmk (20 µM, MP-Biomedicals) versetzt und 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in 500 µl Lysepuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1mM DTT) resuspendiert und 15 min bei 4°C inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 20000 g wurde der Überstand in frische Reaktionsgefäße überführt. 25 µl wurden dann zur Kontrolle des Gesamtextraktes entnommen. Die restliche Suspension wurde mit 30 µl Streptavidin-Agarose (Oncogene, Cambridge) versetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfprobenrotator inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer (0,5% NP-40) wurden die Ansätze mit 60 µl 2 x Ladepuffer versetzt, 5 min bei 100°C denaturiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

3.2.18 Nachweis der Caspase-Aktivität

Die Aktivität von Caspasen kann durch einen enzymatischen Substrattest bestimmt werden, der auf der Spezifität von Caspase für die Aminosäuresequenz bestimmter Tetrapeptide beruht. Durch die Caspase-abhängige Abspaltung der amc/afc-Gruppe des ac-DEVD-amc (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aminomethylcoumarin), ac-IETD-amc (N-Acetyl-IIe-Glu-Thr-Asp-aminomethylcumarin) und ac-AEVD-afc (N-Acetyl-Ala-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoro-methylcumarin, MP-Biomedicals) entsteht ein fluoreszierender Farbstoff, der im Fluorometer (amc = 460 nm; afc = 505 nm, Infinite M200, Tecan, Crailsheim) gemessen werden kann.

Zur Bestimmung der Caspase-Aktivität in zuvor hergestellten Lysaten, wurden 25 µg Gesamtprotein mit dem synthetischen Substrat (50 µM) versetzt und in Caspase-Puffer (50 mM HEPES pH 7,3, 100 mM NaCl, 10% Saccharose, 0,1% CHAPS 2-[cyclohexylamino-]1-propansulfonsäure, 10 mM DTT) auf ein Gesamtvolumen von 200 µl verdünnt. Die Ansätze wurden dann in 96-Loch-Platten überführt und die Fluoreszenz bei 37°C alle 10 min über einen Gesamtzeitraum von 3 h gemessen.

Eine weitere Möglichkeit ist der luminometrische Nachweis der Caspase-Aktivität in Zellextrakten. Dabei werden Tetrapeptide verwendet (z-DEVD-aminoluciferin), die an ein Luciferase-Substrat gekoppelt sind. Durch aktive Caspasen wird das Aminoluciferin vom Tetrapeptid abgespalten, wodurch mit Hilfe der im Puffer enthaltenden Luciferase ein lumineszentes Signal generiert wird. Dieses kann dann mittels eines Luminometers (MicroLumat *Plus* LB 96V, BERTHOLD Technologies, Bad Wildbad) detektiert werden. Die Menge aktiver Caspasen ist proportional zur Lichtemission. Zum Nachweis der Caspase-Aktivität wurden 25 µg Gesamtprotein verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben (CASPASE-GLO-Assay, Promega).



4. Ergebnisse

4.1 Mechanismus des Taxol-induzierten Zelltodes

Taxol gehört zur Klasse der Mikrotubuli-interferierenden Agenzien, die in Tumorzellen Apoptose induzieren und deshalb in der Chemotherapie eingesetzt werden. Der zu Grunde liegende Mechanismus der Apoptoseinduktion ist allerdings nicht bekannt.

4.1.1 Synthetische Tetrapeptide, die auf der Konsensussequenz AEVD basieren, sind nicht Caspase-10-spezifisch

Untersuchungen von Park *et al.* (2004) zufolge wird vermutet, dass die Aktivierung von Caspase-10 für die Apoptoseinduktion nach Taxol-Behandlung notwendig ist. Diese Annahme basiert allerdings im Wesentlichen auf Experimenten mit dem vermeintlich Caspase-10-spezifischen Tetrapeptidinhibitor ac-AEVD-fmk (N-Acetyl-Ala-Glu-Val-Asp-Fluoromethylketon).

Im Allgemeinen erkennen und binden Caspasen spezifische Tetrapeptidsequenzen (P_4 - P_1) ihrer Substrate und hydrolysieren die Peptid-Bindung auf der Carboxylseite von Aspartatresten. Die Sequenz AEVD entspricht zwar einer Caspase-10-Spaltstelle, Untersuchungen von Peptid-Bibliotheken (Garcia-Calvo et al., 1998) lieferten jedoch bereits sehr früh Hinweise. dass es Überlappungen der individuellen Caspase-Konsensussequenzen gibt. Verschiedene synthetische Tetrapeptide wurden mit rekombinanten Caspasen inkubiert und ihre Spezifität für die einzelnen Substrate bestimmt. Dabei zeigte sich, dass Tetrapeptidinhibitoren eher unspezifisch wirken und daher wahrscheinlich ungeeignet sind, um die verschiedenen Caspasen und ihren individuellen Einfluss auf apoptotische Signalwege in vivo zu untersuchen (Timmer und Salvesen, 2007).

Zur Überprüfung dieser Annahme wurden im Rahmen dieser Arbeit rekombinante Caspase-3 und -10 sowie die Fluoreszenz-markierten Substrate ac-AEVD-afc (N-Acetyl-Ala-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcumarin) und ac-IETD-amc (N-Acetyl-IIe-Glu-Thr-Asp-aminomethyl-cumarin), die aus der Konsensussequenz für Caspase-10 bzw. -8 abgeleitet sind, verwendet.



Abbildung 10: Ac-AEVD-afc ist kein spezifisches Caspase-10 Substrat.

Rekombinante Caspase-3 (*A*) und -10 (*B*) wurden entweder mit Ac-AEVD-afc oder Ac-IETD-amc inkubiert und die Aktivität fluorimetrisch bestimmt. Die Caspase-Aktivität wird in unit (u) angegeben, wobei 1 u als die Menge einer Caspase definiert ist, die 1 nmol ac-IETD-amc in 1 h bei 37°C spaltet. Die Fluoreszenz-gekoppelten Substrate wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0-30 u) der rekombinanten Caspasen inkubiert. Durch Caspase-abhängige Spaltung der Substrate entstand ein blau fluoreszierender Farbstoff, der im Fluorometer bei 505 nm (afc) und 460 nm (amc) gemessen wurde. Alle Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt. (AU: *arbitrary units*).

Aus den Ergebnissen der Caspase-Aktivitätstests geht deutlich hervor, dass beide Caspasen mit ähnlicher Effizienz das eigentlich Caspase-8-spezifische Substrat ac-IETD-amc spalten konnten. Für das vermeintlich Caspase-10-spezifische ac-AEVD-afc zeigte sich sogar, dass es wesentlich effizienter durch Caspase-3 als durch Caspase-10 gespalten wurde (Abb. 10A, B).

Diese Ergebnisse bestätigen damit die Untersuchungen von Garcia-Calvo *et al.* (1998) und deuten an, dass der Einsatz von Tetrapeptidinhibitoren, wie AEVD-fmk, ungeeignet ist, um den Einfluss einzelner Caspasen auf bestimmte apoptotische Signalwege *in vivo* zu analysieren.

4.1.2 Embryonale Mausfibroblasten sind sensitiv gegenüber Taxolinduzierter Apoptose

Obwohl einige Publikationen noch immer eine Rolle von Caspase-10 in der Apoptoseinduktion muriner Zellen postulieren (Giampietri *et al.*, 2006; Green *et al.*, 2004), gibt es eindeutige Hinweise, dass Mäusen und Ratten das *Caspase-10*-Gen fehlt (Reed *et al.*, 2003). Daher wurden embryonale Mausfibroblasten (MEFs) als Modellsystem verwendet, um zu überprüfen, ob Caspase-10 tatsächlich eine zentrale Rolle während Taxol-induzierter Apoptose einnimmt.



Abbildung 11: Caspase-10 wird in murinen Zellen nicht exprimiert.

Lysate von Wildtyp (WT) MEFs wurden im Western Blot mittels spezifischer Antikörpern analysiert. Als Positivkontrolle wurden Lysate humaner Jurkat-T-Lymphozyten verwendet. Die Pfeile markieren die Position von Procaspase-10, Procaspase-8 und Aktin.

Die durchgeführte Western Blot-Analyse (Abb. 11) macht deutlich, dass die verwendeten MEFs zwar Caspase-8, jedoch keine Caspase-10 exprimieren. Humane Jurkat-T-Lymphozyten, die als Positivkontrolle verwendet wurden, zeigten dagegen die Expression beider Initiatorcaspasen. Zur Untersuchung der Rolle von Caspase-10 während Taxolinduzierter Apoptose sind die verwendeten embryonalen Mausfibroblasten demnach geeignet.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse (Abb. 12A) zeigen, dass die Behandlung mit steigenden Taxol-Konzentrationen DNA-Fragmentierung in embryonalen Mausfibroblasten induziert. Dies kann bereits nach Gabe geringer Taxol-Mengen (0,1 μ M) durchflusszytometrisch detektiert werden. Gleichzeitig kommt es zur Dosis-abhängigen Exposition von Phosphatidylserin und zum Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta \Psi_m$), zwei weiteren biochemischen Merkmalen der Apoptose (Abb. 12A). Ferner konnte in Western Blot-Analysen nach Taxol-Behandlung eine Abnahme der Proformen von Caspase-8 und -9 detektiert werden, was auf eine Aktivierung dieser Caspasen schließen lässt. Zusätzlich wurde das aktive Caspase-3-Fragment nachgewiesen (Abb. 12B).



Abbildung 12: Taxol-induzierte Apoptose in Caspase-10-defizienten MEFs.

(A) Taxol induziert Apoptose in MEFs. 48 h nach Taxol-Behandlung wurden MEFs mittels Propidiumiodid (PI)-Färbung auf DNA-Fragmentierung untersucht (oben). Die Markerregion M1 enthält apoptotische, hypodiploide Zellkerne. Diploide Kerne und solche mit höherem DNA-Gehalt sind in Markerregion M2 zusammengefasst. Zusätzlich wurde die Exposition von Phosphatidylserin mittels Fluoreszenz-gekoppeltem Annexin V und PI (Mitte) sowie der Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta \Psi_m$), durch den potentiometrischen Farbstoff DiOC₆ (unten), durchflusszytometrisch bestimmt. Links sind repräsentative Messdiagramme unbehandelter sowie Taxol-behandelter (1 µM) MEFs gezeigt. Die Balkendiagramme (rechts) zeigen die statistische Evaluation der durchflusszytometrischen Analyse nach Behandlung von MEFs mit steigenden Taxol-Konzentrationen. Alle Messungen wurden mindestens dreimal durchgeführt. Angegeben sind Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen gemessener hypodiploider Zellkerne (oben), vitaler Zellen mit Phosphatidylserin-Exposition (Mitte) oder mit reduziertem mitochondrialem Transmembranpotential (unten) in Prozent. **(B)** Taxol-Behandlung führt zur Aktivierung von Caspasen. Lysate unbehandelter bzw. Taxol-behandelter MEFs (1 μ M; 48 h) wurden mittels Western Blot analysiert. Schwarze Pfeile kennzeichnen die Position der Proformen der untersuchten Caspasen sowie von Aktin. Das aktive Caspase-3-Fragment ist durch einen weißen Pfeil markiert.

Die Experimente zeigen eindeutig, dass Taxol in MEFs trotz fehlender Caspase-10-Expression Apoptose induziert. Demnach ist Taxol-vermittelter Zelltod in diesem Modellsystem Caspase-10-unabhängig.

4.1.3 In humanen Zellen ist Taxol-induzierte Apoptose unabhängig von Rezeptor-assoziierten Initiatorcaspasen

Durch die bisherigen Experimente konnte gezeigt werden, dass Taxol-vermittelte Apoptose in murinen Zellen unabhängig von Caspase-10 induziert wird. Humane Zellen, die Caspase-10 exprimieren, könnten sich jedoch hinsichtlich der Notwendigkeit von Caspase-10 für die Induktion von Apoptose nach Taxol-Behandlung von murinen Zellen unterscheiden.

Um zu überprüfen, ob Taxol-induzierte Apoptose auch im humanen System Caspase-10unabhängig verläuft, wurden u.a. Neuroblastom-Zellen als Modellsystem verwendet. Diese weisen häufig, bedingt durch Promotormethylierung, den Verlust der Expression von Todesrezeptor-assoziierten Initiatorcaspasen auf (Teitz *et al.*, 2000). Neuroblastom-Zellen denen sowohl Caspase-8- als auch Caspase-10-Expression fehlen (SH-SY5Y), wurden in den folgenden Experimenten mit Neuroblastom-Zellen verglichen, die beide Initiatorcaspasen exprimieren (SHEP).

Aus der durchflusszytometrischen Analyse und den Western Blots (Abb. 13B, C) geht eindeutig hervor, dass in den verwendeten Neuroblastom-Zellen unabhängig von Caspase-10 Taxol-vermittelte Apoptose induziert wird. Sowohl in Zellen mit als auch ohne Caspase-8/-10-Expression konnte die Aktivierung von Caspase-3 detektiert werden (Abb. 13B). Gleichzeitig wiesen beide Zelllinien 48 h nach Behandlung mit 0,1 µM Taxol bereits einen hohen Prozentsatz an Zellen mit fragmentierter DNA auf. Bei einer Taxol-Konzentration von 1 µM erreichte der Prozentsatz hypodiploider Zellen ein Plateau, an dem 47% der SH-SY5Y- und 63% der SHEP-Zellen apoptotisch waren. Durch Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh wurde die Apoptoseinduktion in beiden Zelllinien inhibiert (Abb. 13C). Dies verdeutlicht, dass Taxol-induzierte Apoptose zwar Caspase-abhängig ist, Todesrezeptor-assoziierte Initiatorcaspase-8 und -10 hier jedoch keine Rolle spielen.



Abbildung 13: Taxol-induzierte Apoptose ist unabhängig von der Caspase-8- und -10- Expression.

(*A*) Lysate von SH-SY5Y-Zellen wurden im Western Blot mittels spezifischer Antikörper analysiert. Als Positivkontrolle wurden Lysate von SHEP-Zellen verwendet. Die Proformen von Caspase-8 und -10 sowie Aktin sind durch schwarze Pfeile markiert. (*B*) Taxol induziert die Aktivierung von Caspase-3 in Caspase-8/-10-defizienten Zellen. 48 h nach Taxol-Behandlung wurden Lysate von SHEP- und SH-SY5Y-Zellen hergestellt und im Western Blot mittels spezifischer Antikörper analysiert. Die Position von Procaspase-3 und Aktin sind durch schwarze, die der aktiven Caspase-3-Fragmente durch weiße Pfeile gekennzeichnet. (*C*) Taxol-induzierte Apoptose ist Caspase-abhängig. SHEP- (links) und SH-SY5Y-Zellen (rechts) wurden 48 h mit steigenden Taxol-Konzentrationen und/oder dem Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh (Quinolyl-Val-Asp-Methyldifluorophenoxy-Methylketon, 10 μ M) behandelt und durchflusszytometrisch analysiert. Die statistische Evaluation zeigt repräsentative Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen der gemessenen hypodiploiden Zellkerne. Alle Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt.

4.1.4 Die Rekonstitution mit Caspase-10 bewirkt keine erhöhte Taxol-

Sensitivität

Die zuvor beschriebenen Experimente zeigen deutlich, dass Taxol Apoptose prinzipiell unabhängig von der Expression und Aktivität Todesrezeptor-assoziierter Initiatorcaspasen induzieren kann. Dennoch wäre es denkbar, dass Caspase-10, wie bereits für Caspase-8 beschrieben (Wieder *et al.*, 2001; von Haefen *et al.*, 2003), an einer postmitochondrialen Amplifikation des apoptotischen Signals beteiligt ist. Nach Chemotherapeutika-Behandlung kommt es zur Aktivierung von Caspase-3 durch Caspase-9. Aktivierte Caspase-3 kann dann Caspase-8 durch Spaltung aktivieren, wodurch es zu einer Signalverstärkung kommt.

Um die Rolle von Caspase-10 während der postmitochondrialen Amplifizierung nach Taxol-Behandlung zu untersuchen wurde die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 verwendet. Charakteristisch für sie ist der Verlust von Caspase-3 und Caspase-10, wogegen Caspase-8 exprimiert wird (Janicke *et al.*, 1998; Engels *et al.*, 2005). Für die folgenden Untersuchungen wurden sowohl Wildtyp (WT) als auch rekonstituierte (Caspase-3; Caspase-10; Caspase-3/-10) MCF-7-Klone verwendet.



Abbildung 14: Rekonstitution mit Caspase-10 sensitiviert nicht für Taxol-vermittelte Toxizität.

(A) Lysate von MCF-7-Zellen und stabil transfizierten Klonen dieser Zellen wurden im Western Blot mittels spezifischer Antikörper analysiert. Die Proformen von Caspase-10, Caspase-8 und Caspase-3 sowie Aktin sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. (B) Caspase-10 ist in MCF-7-Zellen nicht an einer mitochondrialen Amplifizierung beteiligt. Zur Ermittlung der Zytotoxizität wurden alle Zellen 48 h nach Taxol-Behandlung (0,1 μ M) mit Kristallviolett gefärbt. Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen des relativen Zelltodes in Prozent (links). Zusätzlich wurden MCF-7-Zellen und die stabil transfizierten Klone für 72 h mit Taxol (0,1 μ M) behandelt und anschließend durchflusszytometrisch auf apoptotische DNA-Fragmentierung analysiert (rechts). Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen der gemessenen hypodiploiden Zellkerne in Prozent. Alle Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt.

Die Ergebnisse der Western Blots bestätigen, dass die verwendeten MCF-7-Zellen weder Caspase-3 noch Caspase-10 exprimieren (Abb. 14A). Die rekonstituierten, stabilen Klone dieser Zelllinie weisen dagegen, wie bereits beschrieben, Caspasen-3- und/oder -10- Expression auf.

Es wurde gezeigt, dass die Rekonstitution mit Caspase-10 MCF-7-Zellen gegenüber einer Behandlung mit dem Todesrezeptorliganden TRAIL sensitiviert. Diese wird durch zusätzliche Caspase-3-Expression noch verstärkt (Engels *et al.*, 2005). Im Gegensatz zur Behandlung mit TRAIL, liegt jedoch keine Korrelation zwischen der Expression von Caspase-3, -8 oder -10 und der Empfindlichkeit von MCF-7-Zellen gegenüber Taxol vor. Die Zelltodraten liegen bei allen MCF-7-Zelllinien zwischen 20-40% und sind somit unabhängig von der Rekonstitution mit Caspase-3 und/oder -10 (Abb. 14B, links). In den verschiedenen MCF-7-Zellen wurde nach Taxol-Behandlung auch spezifisch die Induktion von apoptotischer DNA-Fragmentierung untersucht. Da MCF-7-Zellen keine Caspase-3 exprimieren, kommt es bei ihnen nicht zur klassischen internukleosomalen DNA-Spaltung, da die verantwortliche Endonuklease (CAD, *caspase-activated DNase*) nicht aktiviert werden kann (Sakahira *et al.*, 1998). Dennoch kann man durchflusszytometrisch auch in diesen Zellen hochmolekulare apoptotische DNA-Fragmentierung messen. Tatsächlich zeigten alle Zelllinien nach Taxol-Behandlung (0,1 μ M), unabhängig von der Caspase-10-Expression, vergleichbare Prozentsätze hypodiploider Zellkerne.

In diesem Modellsystem hat die Rekonstitution humaner Zellen mit Caspase-10 keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber Taxol. Ferner deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Caspase-10 nach Taxol-Behandlung nicht an einer postmitochondrialen Verstärkung des apoptotischen Signals beteiligt ist.

4.1.5 Das Todesrezeptor-assoziierte Adapterprotein FADD hat keinen Einfluss auf Taxol-induzierte Apoptose

FADD wird nach Bindung des Liganden zum Todesrezeptor rekrutiert und fungiert dort als essentieller Adapter für die Bindung und Aktivierung von Caspasen. Es nimmt somit eine Schlüsselrolle während der Todesrezeptor-induzierten Apoptose ein.

Die voran gegangenen Versuche deuten an, dass Zelltod nach Taxol-Behandlung prinzipiell über den mitochondrialen Signalweg vermittelt wird. Um eine Beteiligung des Rezeptorabhängigen Apoptoseweges vollständig auszuschließen, wurden humane Jurkat-T-Lymphozyten als Modellsystem verwendet, da von ihnen sowohl FADD- als auch Caspase-8-defiziente Klone existieren. Die durchflusszytometrische Untersuchung und die Western Blots bestätigen die Ergebnisse der voran gegangenen Experimente. Sowohl WT als auch Caspase-8- und FADD-defiziente Jurkat-T-Lymphozyten weisen eine vergleichbare Sensitivität gegenüber Taxol-vermittelter-Apoptose auf (Abb. 15). Verglichen mit den WT und den Caspase-8-defizienten Jurkat-T-Lymphozyten kann in FADD-defizienten Zellen, in denen die Todesrezeptor-vermittelte Aktivierung von Caspase-8 und -10 inhibiert ist, sogar eine leicht erhöhte Apoptoseinduktion nach Taxol-Behandlung beobachtet werden. Ferner zeigten alle Zelllinien eine ähnliche Zeit- und Konzentrations-abhängige Induktion Taxolvermittelter Apoptose (Abb. 15C). Auch Caspase-3-Aktivierung konnte in allen Jurkat-Klonen detektiert werden (Abb. 15D). Entsprechend der erhöhten Apoptoserate konnte in FADDdefizienten Zellen auch eine verstärkte Aktivierung von Caspase-3 detektiert werden. Mittels Western Blot konnte weiterhin die Aktivierung von Caspase-8 in WT und FADD-defizienten Zellen nachgewiesen werden. Dies resultiert wahrscheinlich aus der Aktivierung der Caspase im Rahmen der mitochondrialen Amplifikation.



Abbildung 15. Taxol induziert Apoptose unabhängig vom Todesrezeptorsignalweg.

(A) Lysate von Wildtyp (WT), Caspase-8- oder FADD-defizienten Jurkat-Zellen wurden mittels Western Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper analysiert. Die Proformen von Caspase-8, -10 und -3 sowie FADD sind mit Pfeilen gekennzeichnet. (B) Taxol induziert Zellzyklusarrest und DNA-Fragmentierung unabhängig von Caspase-8 und FADD. WT, Caspase-8- und FADD-defiziente Jurkat-Zellen wurden für 24 h mit 1 µM Taxol behandelt (Mitte; unbehandelte Kontrollzellen: links) und durchflusszytometrisch analysiert. Alle Zelllinien wiesen unabhängig von der FADD- und Caspase-8-Expression DNA-Fragmentierung in vergleichbaren Prozentsätzen auf. Die Position der Zellkerne in der G_0/G_1 -Phase wurde mit weißen, die in der G_2/M -Phase mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Die lineare Darstellung des Zellzyklusprofils (grau: ohne Taxol, schwarz: mit Taxol, rechts) zeigte, dass nach Taxol-Behandlung neben WT Zellen auch FADD- und Caspase-8-defiziente Zellen in der G₂/M-Phase arretieren. Die Zellen in dieser Zyklusphase wurden in Prozent aller vitalen Zellen angegeben. (C) Taxol induziert Apoptose in Zellen ohne FADD- oder Caspase-8-Expression. 24, 48 und 72 h (rechts) nach Behandlung mit steigenden Taxol-Konzentrationen (links) wurden die verwendeten Jurkat-Zelllinien durchflusszytometrisch analysiert. Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichung der gemessenen hypodiploiden Zellkerne. Alle Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt. (D) Taxol-vermittelte Caspase-3-Aktivierung ist unabhängig von FADD und Caspase-8. 48 h nach Taxol-Behandlung (1 µM) wurden Lysate von WT, Caspase-8- und FADDdefizienten Jurkat-T-Lymphozyten hergestellt und im Western Blot analysiert. Die Positionen der Proformen von Caspase-8 und -3 sowie von Aktin sind durch schwarze Pfeile, die der aktiven Caspase-3 durch weiße Pfeile markiert.

Neben seiner proapoptotischen Funktion, spielt FADD auch eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus (Alappat *et al.*, 2003). Es wurde beschrieben, dass die Phosphorylierung von FADD den Taxol-induzierten G_2 /M-Arrest vermittelt. In den verwendeten FADD-defizienten Jurkat-T-Lymphozyten scheint dies allerdings nicht der Fall zu sein, da im Vergleich zu WT und Caspase-8-defizienten Zellen keine Abweichungen in der Zellzyklus-Verteilung vorliegen. Auch nach Taxol-Behandlung (0,1 μ M) arretierten annähernd gleiche Prozentsätze von Zellen aller Linien (circa 80% der lebenden Zellen) am G₂/M-Übergang (Abb. 15B). Bei dem bereits beschriebenen Einfluss von FADD auf die Regulation des Zellzyklus nach Taxol-Behandlung, handelt es sich wahrscheinlich um Zelltyp-spezifisches Verhalten des Adapterproteins, dass in primären Zellen, nicht aber in Tumorzellen zu beobachten ist.

In Bezug auf die Taxol-bedingte Apoptoseinduktion zeigen die Untersuchungen (Abb. 15) jedoch eindeutig, dass dieser Prozess unabhängig von Caspase-8 und FADD verläuft. Damit wurden die Ergebnisse der hier bereits beschriebenen Experimente bestätigt. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass Taxol-vermittelter Zelltod nicht über den extrinsischen, apoptotischen Signalweg verläuft oder verstärkt wird.

4.1.6 Taxol-induzierte Apoptose wird durch Apaf-1 und Caspase-9 vermittelt

Durch die bisherigen Untersuchungen kann eine Beteiligung des extrinsischen Signalweges, beim Taxol-vermitteltem Zelltod ausgeschlossen werden. Da Taxol-induzierte Apoptose durch Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh inhibiert werden kann, ist der Prozess eindeutig Caspase-abhängig. Es ist daher wahrscheinlich, dass Taxol, wie viele andere Chemotherapeutika den intrinsischen Signalweg zur Apoptosom-abhängigen Aktivierung von Caspase-9 und zur Apoptoseinduktion nutzt.

Die Bedeutung von Caspase-9 während Taxol-induzierter Apoptose wurde bislang nur mittels pharmakologischer Inhibition untersucht. Ihre Rolle in diesem Prozess wird jedoch immer noch kontrovers diskutiert. Um die Funktion von Caspase-9 während Taxol-vermittelter Zelltod-Induktion zu untersuchen, wurden Caspase-9-defiziente Jurkat-T-Lymphozyten sowie rekonstituierte Klone als Modellsystem verwendet.



Abbildung 16: Taxol-induzierte Apoptose ist Caspase-9-abhängig.

(A) 48 h nach Stimulation mit 1 µM Taxol wurden Lysate Caspase-9-defizienter und Caspase-9rekonstituierter Jurkat-Zellen hergestellt und im Western Blot mittels spezifischer Antikörper analysiert. Die Positionen von Procaspase-9 sowie Aktin sind durch schwarze Pfeile markiert. (B) Taxol-bedingte DNA-Fragmentierung ist Caspase-9-abhängig. 48 h nach Behandlung mit steigenden Taxol-Konzentrationen wurden Caspase-9-defiziente und Caspase-9-rekonstituierte Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Nur in den Caspase-9-rekonstituierten Zellen konnte die Bildung hypodiploider Nuklei detektiert werden (links). Dies kann in den Caspase-9-profizienten Zellen durch Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh (20 µM) inhibiert werden (rechts). Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen. (C) Caspase-9-defiziente Jurkat-Zellen zeigen keine Apoptose-typischen Veränderungen nach Taxol-Behandlung. Caspase-9defiziente und -rekonstituierte Jurkat-T-Lymphozyten wurden wie in (B) beschrieben behandelt und im Durchflusszytometer analysiert. Nur Caspase-9-profiziente Zellen zeigten die Induktion von Zelltod (links), einen Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials (Mitte) und eine Externalisierung von Phosphatidylserin (rechts). (D) Taxol-induzierter Zelltod und Apoptose werden durch Behandlung mit Q-VD-OPh inhibiert. Caspase-9-rekonstituierte Zellen wurden mit steigenden Taxol-Konzentrationen und/oder Q-VD-OPh (20 µM) behandelt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Zugabe des Caspase-Inhibitors protektierte die Zellen gegen die in (C) beschriebenen Apoptosetypischen Veränderungen. *(E)* Die Langzeit-Behandlung Caspase-9-defizienter Jurkat-T-Zellen mit Taxol führt zur Induktion von Caspase-unabhängigem Zelltod. Vier Tage nach Behandlung mit 1 μ M Taxol und/oder 20 μ M Q-VD-OPh wurden Caspase-9-defiziente und -profizienten Jurkat-Zellen wie in *(C, D)* beschrieben analysiert. Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen in Prozent. Alle Messungen wurden mindestens dreimal durchgeführt.

Die verwendeten Jurkat-Zellen wurden zunächst hinsichtlich ihrer Caspase-9-Expression im Western Blot untersucht (Abb. 16A). Abgesehen von Caspase-9, zeigen die beiden Zelllinien keine Unterschiede in der Expression anderer, wichtiger Apoptoseregulatoren, wie z.B. den Mitgliedern der Bcl-2-Familie, IAP (*inhibitor of apoptosis*)-Proteinen oder anderer Caspasen (Samraj *et al.*, 2007).

Aus den in Abbildung 16 dargestellten Experimenten geht deutlich hervor, dass Caspase-9defiziente Jurkat-Zellen vollständig resistent gegenüber Taxol-induzierter Apoptose sind. 48 h nach Taxol-Behandlung weist ein hoher Prozentsatz der Caspase-9-rekonstituierten Klone hingegen DNA-Degradierung, Externalisierung von Phosphatidylserin und einen Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials auf (Abb. 16B, C). Diese Apoptose-typischen Veränderungen sind Caspase-abhängig, da ihr Auftreten durch Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh inhibiert wird (Abb. 16D).

Obwohl die Caspase-9-defizienten Zellen nach Taxol-Behandlung bis zu 72 h keine Apoptose-typischen morphologischen Veränderungen aufweisen, kann der Verlust dieser Caspase die Zellen trotzdem nicht langfristig gegenüber Taxol-vermitteltem Zelltod schützten. Nach viertägiger Inkubation mit dem Chemotherapeutikum konnte auch in Caspase-9-defizienten Jurkat-T-Lymphozyten die Induktion von Zelltod, ein Zusammenbruch mitochondrialen Transmembranpotentials des sowie die Externalisierung von Phosphatidylserin detektiert werden. An diesem Zeitpunkt konnte die Behandlung mit Q-VD-OPh die Caspase-9-profizienten Jurkat-T-Zellen nicht mehr vor Taxol-vermitteltem Zelltod protektieren (Abb. 16E). Dadurch wird deutlich, dass zumindest in diesem Zellsystem die Langzeit-Behandlung mit Taxol einen Wechsel von einem Caspase-abhängigen zu einem Caspase-unabhängigen Zelltod induziert.

Obwohl nach längerer Behandlung Zelltod auch in Caspase-9-defizienten Jurkat-T-Lymphozyten induziert wird, konnte gezeigt werden, dass Taxol-vermittelte Apoptose über den mitochondrialen Signalweg verläuft und abhängig von Caspase-9 ist. Neben den Jurkat-T-Lymphozyten wurden embryonale Fibroblasten von Mäusen, in denen das *Apaf-1*- oder *Caspase-9*-Gen spezifisch deletiert ist, verwendet, um die Rolle von Caspase-9 während Taxol-induzierter Apoptose eingehender zu untersuchen. Die in Abbildung 17 dargestellten Untersuchungen machen deutlich, dass Taxol-induzierte Apoptose abhängig von Caspase-9 und Apaf-1 ist und bestätigen somit die Ergebnisse im Jurkat-Zellmodell.



Abbildung 17: Taxol-induzierte Apoptose ist Apaf-1- und Caspase-9-abhängig.

(*A*) Lysate von WT, Caspase-9- und Apaf-1-defizienten MEFs wurden im Western Blot mittels spezifischer Antikörper analysiert. (*B*) Caspase-9- und Apaf-1-defiziente MEFs sind resistent gegenüber Taxol-vermittelter Apoptose. 48 h nach Behandlung mit steigenden Taxol-Konzentrationen wurden WT, Caspase-9- und Apaf-1-defiziente Zellen durchflusszytometrisch auf DNA-Fragmentierung untersucht (links). Durch Behandlung mit Q-VD-OPh (20 μM) kann die Induktion von Apoptose in den WT MEFs reduziert werden. WT MEFs wurden 48 h mit Taxol und/oder Q-VD-OPh behandelt und durchflusszytometrisch auf DNA-Fragmentierung untersucht (rechts). Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen der gemessenen hypodiploiden Nuklei in Prozent. (*C*) Der Verlust der Caspase-9- oder Apaf-1-Expression schützt Zellen vor Apoptose-typischen Veränderungen. Die verwendeten Zellen wurden wie in (*B*) behandelt und durchflusszytometrisch auf den Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials (links) und Phosphatidylserin-Exposition (rechts) untersucht. Nur in WT MEFs kommt es zum Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials und zur Externalisierung von Phosphatidylserin. Die Behandlung mit Q-VD-OPh kann in den WT Zellen das Auftreten dieser

apoptotischen Charakteristika blockieren. (D) Taxol-induzierte Bildung multipolarer Spindeln ist unabhängig von Caspase-9 und Apaf-1. 24 h nach Taxol-Behandlung wurden die Zellen zunächst fixiert, dann die Mikrotubuli mittels spezifischer Antikörper (grün) und Zellkerne mittels DAPI (blau) gefärbt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laserscanmikroskops. (E) Die Taxolvermittelte Aktivierung von Effektorcaspasen ist abhängig von Apaf-1 und Caspase-9. 48 h nach Taxol-Behandlung wurden Lysate von WT, Caspase-9- und Apaf-1-defizienten Zellen hergestellt und im Western Blot mittels spezifischer Antikörper analysiert. Die Caspase-3-Proform sowie Aktin sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Durch Verlängerung der Expositionszeit von 30 sek auf 2 min konnte auch aktive Caspase-3 detektiert werden, die durch einen weißen Pfeil markiert ist. (F) In fluorimetrischen Messungen konnte keine Caspase-3-ähnliche (DEVDase-) Aktivität in den Caspase-9- und Apaf-1-defizienten MEFs detektiert werden. Dargestellt ist die Steigerung der Caspase-Aktivität nach 48 h in Relation zum Ausgangszeitpunkt vor Behandlung. Alle Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt.

Zunächst wurde in den Zelllinien die fehlende Expression von Caspase-9 und Apaf-1 verifiziert (Abb. 17A). Anschließend wurde die Induktion von Apoptose gemessen. 48 h nach Behandlung mit 1 µM Taxol zeigten etwa 20-30% der WT MEFs DNA-Fragmentierung, einen Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials und die Externalisierung von Phosphatidylserin. Die Caspase-9- und Apaf-1-defizienten MEFs waren dagegen vollständig protektiert (Abb. 17B, C). Ferner konnte in diesen Zellen weder im Western Blot noch fluorimetrisch die Aktivierung von Caspase-3 nachgewiesen werden (Abb. 17E, F). Trotzdem zeigten die Zellen die für Taxol typische Bildung multipolarer Spindeln (Abb. 17D). Das bedeutet, dass das Chemotherapeutikum in den Caspase-9- oder Apaf-1-defizienten Zellen seine normale Wirkung entfaltet und lediglich die Induktion von Apoptose blockiert ist.

Die Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh bewirkte in WT MEFs, wie auch bei den Caspase-9-profizienten Jurkat-Zellen, einen verminderten Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials sowie eine geringere Externalisierung von Phosphatidylserin. Dies macht erneut deutlich, dass Taxol-induzierte apoptotische Merkmale Caspase-abhängig sind. Weiterhin bestätigen diese Ergebnisse, dass Taxol Apoptose über den intrinsischen Signalweg induziert, bei dem die Aktivierung von Caspase-9 durch das Apoptosom eine zentrale Rolle spielt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Caspase-9-defiziente Jurkat-T-Lymphozyten nach Langzeitbehandlung mit Taxol nicht mehr gegen die Induktion von Zelltod protektiert sind. Um zu überprüfen, ob diese Beobachtung allgemein gültig oder Zelltyp-spezifisch ist, wurden Klonogenitäts-Tests mit WT, Caspase-9- und Apaf-1-defizienten MEFs durchgeführt.



Abbildung 18: Nach Taxol-Behandlung bleiben Caspase-9- und Apaf-1-defiziente Zellen proliferativ aktiv.

(A) Caspase-9- und Apaf-1-defiziente MEFs sind gegen Taxol-induzierte Apoptose protektiert. 48 h nach Behandlung mit steigenden Taxol-Konzentrationen wurden die Zellen gewaschen und in Kulturschalen mit normalem Kulturmedium (ohne Taxolzusatz) überführt. Nach weiteren sieben Tagen wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt (rechts) und ihre relative Proliferation ermittelt. Die statistische Evaluation zeigt die Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen in Prozent (links). (B) Caspase-9- und Apaf-1-defiziente Zellen nehmen die klonale Proliferation nach Taxol-Behandlung wieder auf. WT, Caspase-9- und Apaf-1-defiziente Zellen wurden wie in (A) behandelt und lichtmikroskopisch analysiert. (C) WT, Caspase-9- und Apaf-1-defiziente MEFs wurden wie in (A) behandelt und für 14 Tage kultiviert. Durch Nachweis der β-Galaktosidase-Aktivität mit dem Substrat X-Gal wurden die Zellen lichtmikroskopisch auf die Induktion von Seneszenz untersucht. (D) Caspase-9- und Apaf-1-defiziente Zellen sind auch nach Langzeitbehandlung gegen Taxol-induzierte Apoptose protektiert. WT, Caspase-9- und Apaf-1-defiziente Zellen wurden vier Tage mit Taxol (1 µM) und/oder Q-VD-OPh (20 µM) behandelt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Lediglich in WT Zellen konnte die Induktion von Zelltod und der Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials beobachtet werden. Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen in Prozent. Alle Messungen wurden mindestens dreimal durchgeführt.

Aus den Ergebnissen geht deutlich hervor, dass der Verlust der Apaf-1- oder Caspase-9-Expression embryonalen Mausfibroblasten, im Gegensatz zu Jurkat-T-Lymphozyten, einen langfristigen Überlebensvorteil verleiht. Die Proliferation ist im Vergleich zu unbehandelten Zellen verlangsamt. Dies resultiert wahrscheinlich aus der gestörten Bildung mitotischer Spindeln, die auch in diesen Zellen detektiert werden konnte. Dennoch kann die Bildung neuer Kolonie beobachtet werden (Abb. 18A).

Durch Untersuchung der β-Galaktosidase-Aktivität konnte in einigen Apoptoseinkompetenten Zellen die Induktion von Seneszenz beobachtet werden (Abb. 18C). Der Großteil der Caspase-9- und Apaf-1-defizienten MEFs ist allerdings in der Lage die Proliferation wieder aufzunehmen. Weiterhin konnte in diesen Zellen auch nach viertägiger Taxol-Behandlung weder der Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials noch die Induktion von Zelltod nachgewiesen werden (Abb. 18D). Diese Beobachtung unterstützt die Ergebnisse der Klonogenitäts-Tests. Der Verlust der Caspase-9- oder der Apaf-1–Expression bedingt demnach in diesem Zellsystem, einen Überlebensvorteil nach Taxol-Behandlung. Ferner unterstreichen diese Experimente die wichtige Bedeutung des mitochondrialen Signalweges und Caspase-9 für Taxol-induzierte Apoptose.

4.1.7 Die Rolle der Bcl-2-Familie während Taxol-induzierter Apoptose

Die pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie sind wichtige Regulatoren des mitochondrialen Apoptosesignalwegs. Da Taxol-induzierter Zelltod über diesen Signalweg verläuft, wurde die Rolle verschiedener Bcl-2-Familienmitglieder in diesem Prozess untersucht.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse verdeutlichen nochmals, dass Taxolinduzierte Apoptose über den intrinsischen Signalweg verläuft, da Jurkat-Zellen, die Bcl-2 überexprimieren, resistent gegen dieses Chemotherapeutikum sind (Abb. 19A). Lediglich in den Kontrollzellen kann die Induktion von Apoptose detektiert werden.

Bcl-2 ist ein Antagonist proapoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder wie Bak und Bax. Deshalb wurde auch der Einfluss von Bak und Bax untersucht. Dazu wurden embryonale Fibroblasten von Mäusen, in denen entweder das *Bak*- oder das *Bax*-Gen oder beide Gene spezifisch deletiert sind, mit steigenden Taxol-Konzentrationen behandelt. Mittels durchflusszytometrischer Untersuchung konnte gezeigt werden, dass Bak/Bax-defiziente MEFs vollständig gegenüber Taxol-induzierter Apoptose protektiert sind. In WT Zellen ist dagegen schon nach Behandlung mit geringen Taxol-Konzentrationen apoptotische DNA-Fragmentierung detektierbar. Embryonale Mausfibroblasten, denen lediglich das *Bak*-Gen fehlt, weisen eine den WT Zellen-ähnliche Apoptoseinduktion auf.



Abbildung 19: Rolle der Bcl-2-Familienmitglieder während Taxol-induzierter Apoptose.

(A) Die Überexpression von antiapoptotischem Bcl-2 protektiert Zellen gegenüber Taxol-induziertem Zelltod. Lysate von Jurkat-T-Zellen, die entweder mit einem Bcl-2-kodierendem Plasmid oder der entsprechenden Leervektorkontrolle stabil transfiziert sind, wurden im Western Blot mittels spezifischer Antikörper analysiert. Bcl-2 und Aktin sind durch schwarze Pfeile markiert. 48 h nach Behandlung mit steigenden Taxol-Konzentrationen wurden beide Zelllinien durchflusszytometrisch auf DNA-Fragmentierung untersucht. Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen der hypodiploiden Nuklei in Prozent. (B) Bak, Bax und Bim spielen eine wichtige Rolle in der Taxol-induzierten Apoptose. Embryonale Fibroblasten von Mäusen, in denen das Bid-, Bim-, Bak- oder Bax-Gen spezifisch deletiert ist sowie von Mäusen, in denen das Bak- und Bax-Gen spezifisch deletiert ist, wurden 48 h mit steigenden Taxol-Konzentrationen behandelt und durchflusszytometrisch analysiert. Bak/Bax-defiziente MEFs sind vollständig, Bax- und Bim-defiziente Zellen zumindest teilweise gegenüber Taxol-induzierter Apoptose protektiert. Die Induktion von DNA-Fragmentierung kann nur in WT, Bid- und Bak-defizienten Zellen detektiert werden (links). Die statistische Evaluation der gemessenen hypodiploiden Nuklei zeigt Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen in Prozent. Die Zellen wurden zusätzlich an verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung mit 1 µM Taxol durchflusszytometrisch untersucht (rechts). (C) Bim, Bak und Bax beeinflussen den Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials nach Taxol-Behandlung. Die verwendeten Zelllinien wurden 24 h mit verschiedenen Taxol-Konzentrationen behandelt und nach Färbung mit DiOC₆ und PI im Durchflusszytometer analysiert. Ein hoher Prozentsatz von Zellen mit reduziertem mitochondrialen Transmembranpotential kann nur in WT, Bidund Bak-defizienten Zellen beobachtet werden. (D) Bim-, Bax- oder Bak/Bax-defiziente Zellen sind langfristig gegenüber Taxol-induzierter Apoptose protektiert. Die Klonogenitäts-Tests wurden wie in Abb. 18 bereits beschrieben durchgeführt. Nach sieben Tagen erfolgten die Färbung mit Kristallviolett und die statistische Evaluation der relativen Proliferation. Angegeben sind Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen in Prozent. Alle Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt.

Obwohl angenommen wird, dass Bak und Bax eine redundante Funktion ausüben, zeigte sich, dass Zellen denen das *Bax*-Gen fehlt, zumindest teilweise gegen Taxol-vermittelte Apoptose protektiert sind (Abb. 19B). Die Unterschiede zwischen Bak- und Bax-defizienten Zellen werden besonders nach Behandlung mit geringen Taxol-Konzentrationen deutlich. In Bak-defizienten Zellen findet sich außerdem ein höherer Prozentsatz an Zellen mit reduziertem mitochondrialem Transmembranpotential (Abb. 19C). In Klonogenitäts-Tests wurde deutlich, dass Bak/Bax- und Bax-defiziente Zellen im Vergleich zu Bak-defizienten und WT MEFs einen Überlebensvorteil aufweisen (Ab. 19D). Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass Taxol-induzierte Apoptose bevorzugt über einen mitochondrialen, Bax-abhängigen Signalweg verläuft.

BH-3-only Proteine sind essentiell für den apoptotischen Signalweg und agieren oberhalb von Bak und Bax. Um die Rolle dieser Proteine während Taxol-induzierter Apoptose ausführlicher zu untersuchen, wurden embryonale Fibroblasten von Mäusen, in denen das *Bid-* oder *Bim-*Gen spezifisch deletiert ist, verwendet. Bim interagiert mit Mikrotubuli-assoziierten Dynein-Komplexen und spielt eine Rolle bei der Apoptoseinduktion nach Taxol-Behandlung (Tan *et al.*, 2005; Bouillet *et al.*, 2002; Bouillet *et al.*, 1999). Vergleichende Analysen des Einflusses der verschiedenen Bcl-2-Familienmitglieder auf Taxol-induzierten Zelltod fehlen allerdings bislang.

Wie erwartet, waren Bim-defiziente Zellen zumindest teilweise gegen Taxol-induzierte DNA-Fragmentierung und den Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials protektiert (Abb. 19B, C). Die Resistenz gegen das Chemotherapeutikum wurde vor allem nach Behandlung mit niedrigen Konzentrationen deutlich. In Klonogenitäts-Tests zeigte sich weiterhin, dass Bim-defiziente Zellen, im Vergleich zu den WT MEFs, einen Überlebensvorteil aufweisen (Abb. 19D).

Bid-defiziente MEFs waren dagegen nicht gegen Taxol-induzierte Apoptose protektiert. Die Zellen waren in allen Versuchen so sensitiv wie WT Zellen. Da das *BH-3-only Protein* Bid den Todesrezeptorsignalweg mit dem mitochondrialen Signalweg verbindet, machen diese Ergebnisse erneut deutlich, dass Taxol-induzierte Apoptose nicht über den extrinsischen Apoptoseweg verläuft. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die Bcl-2-Familienmitglieder Bim und Bax eine wesentliche Rolle während der Taxol-vermittelten Apoptose spielen. Ferner resultiert die fehlenden Expression von Bax, Apaf-1 oder Caspase-

9 in einem deutlichen Überlebensvorteil Taxol-behandelter Zellen, der vor allem bei niedrigen Konzentrationen des Chemotherapeutikums zu beobachten war.

4.2 ER-Stress-induzierte Apoptose ist abhängig von Caspase-9 und ihrer Aktivierung im Apoptosom

4.2.1 Caspase-9 ist essentiell für die Apoptose-Induktion nach ER-Stress Die Faltung neu synthetisierter Proteine gehört zu den Hauptaufgaben des endoplasmatischen Retikulums (ER). Dafür werden bestimmte Bedingungen im ER-Lumen benötigt, die dieses Organell sehr anfällig für zellulären Stress machen. Schon leichte Veränderungen der ER-Homöostase führen zur Akkumulation ungefalteter Proteine im ER-Lumen und zur Induktion der sogenannten *"unfolded protein response"* (UPR). Dieser Mechanismus dient der Wiederherstellung physiologischer Bedingungen (Szegezdi *et al.,* 2006). Ist dies nicht möglich, so werden Signalwege eingeleitet, die Apoptose auslösen. Caspasen sind an diesem Prozess maßgeblich beteiligt.

Zunächst nahm man an, dass eine ER-spezifische Caspase-Kaskade existiert, die durch Caspase-12 als apikale Initiatorcaspase aktiviert wird (Rao *et al.*, 2001). Da Caspase-12 allerdings im Menschen nur als katalytisch inaktives Enzym exprimiert wird, kann dieser Signalweg, zumindest im humanen System, nicht für die Einleitung von Apoptose nach ER-Stress verantwortlich sein (Saleh *et al.*, 2004). Die zentralen Modulatoren der nach ER-Stress induzierten Apoptose sind demnach nicht bekannt und werden kontrovers diskutiert.

Häufig aktivieren Zelltod-induzierende Signale aus dem Zellinneren den intrinsischen Apoptoseweg. Caspase-9 und ihre Apaf-1-abhängige Aktivierung im Apoptosom spielen hierbei eine zentrale Rolle. Um zu überprüfen, ob diese Apoptosemodulatoren auch in die Induktion von Zelltod nach ER-Stress involviert sind, wurden embryonale Fibroblasten (MEF) von Mäusen verwendet, in denen das *Caspase-9*- oder *Apaf-1*-Gen spezifisch deletiert ist.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung zeigen, dass die Induktion von Apoptose nach ER-Stress abhängig von Caspase-9 ist (Abb. 20). Nur in WT Zellen, die sowohl Caspase-9 als auch Apaf-1 exprimieren, konnte DNA-Fragmentierung detektiert werden. Caspase-9^{-/-}-MEFs zeigten dagegen selbst 72 h nach Behandlung mit Thapsigargin, Brefeldin A oder Tunicamycin eine Induktion von DNA-Fragmentierung (Abb. 20B). Obwohl Caspase-9 im Signalweg unterhalb der Mitochondrien aktiviert wird, ist auch die Freisetzung von Cytochrom c und der Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$) in Caspase-9^{-/-}-MEFs nach Behandlung mit ER-Stress-induzierenden Reagenzien inhibiert (Abb. 20C). Die Caspase spielt demnach eine wesentliche Rolle während der Apoptoseinduktion nach ER-Stress.


Abbildung 20: ER-Stress-induzierte Apoptose ist abhängig von Caspase-9 und Apaf-1.

(A) Lysate von Wildtyp- (WT), Caspase-9- und Apaf-1-defizienten MEFs wurden im Western Blot mittels spezifischer Antikörper analysiert. (B) MEFs ohne Caspase-9- oder Apaf-1-Expression sind resistent gegen ER-Stress-induzierte Apoptose. WT, Caspase-9^{-/-}- und Apaf-1^{-/-}-MEFs wurden mit Thapsigargin (1,5 µM), Brefeldin A (1 µg/ml) oder Tunicamycin (1 µg/ml) behandelt und nach 0, 24, 48 und 72 h mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und die zugehörigen Standardabweichungen der gemessenen hypodiploiden Zellkerne in Prozent. (C) Caspase-9^{-/-}-MEFs setzen nach Induktion von ER-Stress nur wenig Cytochrom c aus den Mitochondrien frei. WT und Caspase-9-defiziente MEFs wurden 24 h mit Thapsigargin, Brefeldin A oder Tunicamycin behandelt. Anschließend wurden die verwendeten Zellen zunächst fixiert, permeabilisiert und über Nacht mit Cytochrom c-spezifischen Antikörpern inkubiert. Nach Inkubation mit einem Alexa Fluor 488-gekoppeltem sekundären Antikörper erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen von Zellen mit freigesetztem Cytochrom c in Prozent. (*D*) Der Verlust von Caspase-9 und Apaf-1 schützt Zellen vor dem Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials. Die Zellen wurden 24 h mit Thapsigargin, Brefeldin A und Tunicamycin behandelt und anschließend mit dem potentiometrischen Farbstoff DiOC₆ versetzt. Nach PI-Zugabe erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer. Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen vitaler Zellen mit einem reduzierten mitochondrialen Transmembranpotential ($\Delta \Psi_m^{\text{red.}}$) in Prozent. (unbeh.: unbehandelt; red.: reduziert).

Auf Grund voran gegangener Publikationen wurde vermutet, dass Caspase-9 nach ER-Stress durch Caspase-12 und nicht durch das Apoptosom aktiviert wird (Rao *et al.*, 2002). Die Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigten dagegen, dass auch der Verlust von Apaf-1 Zellen gegen ER-Stress-induzierte Apoptose protektiert. Apaf-1^{-/-}-MEFs wiesen weder DNA-Fragmentierung noch einen Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials auf. Folglich sind nicht nur Caspase-9, sondern auch ihre Apaf-1-abhängige Aktivierung im Apoptosom essentiell für die Induktion von Apoptose nach ER-Stress.

Um zu überprüfen, ob an der Induktion von Zelltod nach ER-Stress noch eine alternative Caspase-Kaskade beteiligt ist, die zur späteren Caspase-3-Aktivierung und damit zur verzögerten Einleitung des apoptotischen Zelltodes führt, wurden Caspase-Aktivitätstests durchgeführt sowie die Klonogenität von Zellen nach Thapsigargin-Behandlung untersucht.



Abbildung 21: Fehlende Caspase-3-Aktivierung verleiht Caspase-9^{-/-}- und Apaf-1^{-/-}-Zellen einen Überlebensvorteil nach ER-Stress.

(*A*) Caspase-3 wird in Zellen ohne Apaf-1- und Caspase-9-Expression nach Thapsigargin-Behandlung nicht aktiviert. 0, 24 und 48 h nach Behandlung mit Thapsigargin (1,5 μM) wurden Lysate von WT-, Apaf-1^{-/-}- und Caspase-9^{-/-}-Zellen hergestellt und luminometrisch auf Caspase-3-ähnliche (DEVDase-) Aktivität untersucht. (AU: *arbitrary units*). (*B*) Apaf-1^{-/-}- und Caspase-9^{-/-}-MEFs nehmen die Proliferation nach ER-Stress wieder auf. 48 h nach Thapsigargin-Behandlung wurden die verwendeten Zellen in Kulturschalen mit frischem Medium ohne Thapsigargin überführt. Nach sieben Tagen erfolgte die Färbung mit Kristallviolett.

Die Ergebnisse des Caspase-Aktivitätstests zeigen, dass Caspase-3 in Caspase-9- oder Apaf-1-defizienten Zellen nicht aktiviert werden kann. Die Experimente verdeutlichen daher die entscheidende Rolle von Caspase-9 und Apaf-1 für die Aktivierung von Effektorcaspasen und die Apoptoseinduktion nach ER-Stress. Nur wenn, wie in WT MEFs, beide Proteine exprimiert werden, kann Caspase-3 nach Behandlung mit ER-Stress-induzierenden Reagenzien effizient aktiviert werden (Abb. 21A). Folglich sind beide Apoptosemodulatoren für die Aktivierung der Effektorcaspase erforderlich.

Caspase-9 und Apaf-1 sind somit absolut essentiell für die Induktion von Apoptose nach ER-Stress. Zellen ohne Apaf-1- oder Caspase-9-Expression sind nicht nur gegen ER-Stressinduzierte Apoptose protektiert, sie sind auch in der Lage die Proliferation wieder aufzunehmen. In Klonogenitäts-Tests, in denen WT, Caspase-9- und Apaf-1-defiziente Zellen 48 h nach Thapsigargin-Behandlung in Kulturschalen mit frischem Medium überführt wurden, ist sieben Tage danach nur bei Apaf-1^{-/-} und Caspase-9^{-/-}-MEFs die Bildung neuer Kolonien zu beobachten (Abb. 21B).

Im murinen System sind diesen Experimenten zufolge Caspase-9 und Apaf-1 die zentralen Regulatoren der ER-Stress-induzierten Apoptose. Um zu überprüfen, ob dies auch für das humane System zutrifft, wurden im Folgenden humane Caspase-9-defiziente Jurkat-T-Lymphozyten und der entsprechende Caspase-9-rekonstituierte Klon verwendet.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen (Abb. 22) zeigen eindeutig, dass Caspase-9 auch im humanen System die zentrale Rolle bei der Initiation von Apoptose nach ER-Stress einnimmt. Caspase-9-defiziente Zellen sind im Vergleich zu dem rekonstituierten Klon sogar 72 h nach Thapsigargin-Behandlung noch gegen die Induktion von Zelltod protektiert (Abb. 22A, links). Werden die Caspase-9-defizienten Zellen zusätzlich mit dem Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh behandelt, so kann keine weitere Reduktion der Zelltodrate erreicht werden. Dies bedeutet, dass der Zelltod, der in einem geringen Prozentsatz der Caspase-9-rekonstituierten Zellen induziert wird, Caspase-unabhängig ist (Abb. 22A, rechts). Weiterhin weisen besonders Zellen, die Caspase-9 exprimieren, DNA-Fragmentierung und einen Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials nach Thapsigargin-Behandlung auf. Die Caspase-9-defizienten Zellen sind gegen diese Apoptose-typischen Merkmale protektiert (Abb. 22B). Da auch die Aktivierung anderer Caspase-9 folglich die apikale Initiatorcaspase in der ER-Stress-induzierten Apoptose.



Abbildung 22: Caspase-9 ist die Initiatorcaspase während ER-Stress-induzierter Apoptose.

(A) Caspase-9-defiziente Jurkat-Zellen sind resistent gegenüber ER-Stress-induziertem Zelltod. Caspase-9-defiziente und -profiziente Jurkat-Zellen wurden 0, 24, 48 und 72 h nach Thapsigargin-Behandlung (1,5 µM) mit PI gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer auf die Induktion von Zelltod untersucht (links). Ebenso wurden Caspase-9-defiziente Jurkat-Zellen mit Thapsigargin und dem Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh (20 µM) behandelt und nach 0, 24, 48 und 72 h durchflusszytometrisch analysiert (rechts). Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der PI-positiven Zellen in Prozent. (B) Der Verlust von Caspase-9 schützt Zellen vor **DNA-Fragmentierung** und dem Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials. Caspase-9-defiziente und -profiziente Jurkat-Zellen wurden 48 h mit Thapsigargin behandelt. Anschließend wurden sie entweder auf DNA-Fragmentierung oder durch Färbung mit DiOC₆ auf den Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials untersucht. Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen hypodiploiden Zellkerne (links) und vitaler Zellen mit reduziertem mitochondrialem Transmembranpotential (rechts) in Prozent. Alle Messungen wurden mindestens dreimal durchgeführt. *(C)* Nach Thapsigargin-Behandlung zeigen Caspase-9-defiziente Zellen keine Caspase-Aktivierung. Caspase-9-defiziente und -profiziente Zellen wurden 24 h mit Thapsigargin behandelt. Nach Inkubation mit dem zellpermeablen Caspase-Inhibitor Biotin-VAD-fmk (Biotin-Asp (OMe)-Glu-(OMe)-Val-Asp (OMe)-fluoromethylketon), erfolgte die Lyse der Zellen und die Präzipitation Biotin-VAD-fmk-gekoppelter, aktiver Caspasen mittels Streptavidin-Agarose. Die Analyse erfolgte im Western Blot mittels spezifischer Antikörper. Die Positionen von Procaspase-9, -2, -8 und -3 sind durch schwarze Pfeile, die der aktiven Spaltprodukte durch weiße Pfeile markiert. (unbeh.: unbehandelt; L: Lysat; IP: Präzipitat).

Eher unerwartet ist dabei die Beobachtung, dass Caspase-2 in Caspase-9-defizienten Zellen nicht aktiviert werden kann, da beschrieben wurde, dass Caspase-2, die wie Caspase-9 zu den Initiatorcaspasen gehört, nach ER-Stress Caspase-9-unabhängig aktiviert wird (Cheung *et al.*, 2006). Zusammengefasst wird aus den durchgeführten Experimenten deutlich, dass Caspase-9 sowohl im murinen als auch im humanen System der zentrale Initiator ER-Stress-induzierter Apoptose ist. Da weder in Caspase-9^{-/-} noch in Apaf-1^{-/-}-MEFs DNA-Fragmentierung oder der Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials beobachtet werden konnte, wird Caspase-9 auch nach ER-Stress allein durch das Apoptosom aktiviert.

4.2.2 Caspase-2 ist an einer postmitochondrialen Amplifizierung des apoptotischen Signals beteiligt

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass auch Caspase-2 in den Caspase-9-defizienten Jurkat-Zellen nicht aktiviert werden konnte. Bislang wurde jedoch vermutet, dass Caspase-2 als Initiatorcaspase fungiert und während ER-Stress-induzierter Apoptose eine entscheidende Rolle spielt (Dahmer, 2005).

Um zu untersuchen, ob diese voneinander abweichenden Ergebnisse Zelltyp-spezifisch sind, wurden embryonale Fibroblasten von Mäusen verwendet, in denen das *Caspase-2-*Gen spezifisch deletiert ist. Zusätzlich kann mit Hilfe dieser Zellen auch geklärt werden, ob die Resistenz der Caspase-9- und Apaf-1-defizienten Zellen auf eine fehlende Caspase-2-Aktivierung zurück zu führen ist.

Durch Western Blot-Analyse konnte bestätigt werden, dass die hier verwendeten Caspase-2^{-/-}-MEFs tatsächlich keine Caspase-2 exprimieren (Abb. 23A).



Abbildung 23: Caspase-2^{-/-}-MEFs sind gegen ER-Stress-induzierte Apoptose protektiert.

(A) Lysate von WT und Caspase-2^{-/-}-MEFs wurden im Western Blot mittels spezifischer Antikörper analysiert. Die Position von Caspase-2 und Aktin sind durch schwarze Pfeile markiert. (B) Caspase-2defiziente MEFs weisen keine DNA-Fragmentierung nach Thapsigargin-Behandlung auf. WT und Zellen wurden 48 h mit Thapsigargin (1,5 µM) Caspase-2-defiziente behandelt und durchflusszytometrisch auf DNA-Fragmentierung untersucht. Gezeigt sind repräsentative Messdiagramme unbehandelter und Thapsigargin-behandelter Zellen. Die Markerregion M1 enthält hypodiploide Zellkerne. Diploide Kerne und solche mit höherem DNA-Gehalt sind in der Markerregion M2 zusammengefasst. (C) WT und Caspase-2-defiziente Zellen wurden mit Thapsigargin (1,5 µM), Brefeldin A (1 µg/ml) oder Tunicamycin (1 µg/ml) behandelt und auf DNA-Fragmentierung untersucht. Die statistische Auswertung zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der hypodiploiden Zellkerne in Prozent. (D) Caspase-2^{-/-}-MEFs zeigen nach ER-Stress keinen Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials. WT und Caspase-2^{-/-}-Zellen wurden 48 h mit ER-Stressinduzierenden Reagenzien behandelt. Nach Inkubation mit dem potentiometrischen Farbstoff DiOC₆ konnte durchflusszytometrisch der Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials bestimmt werden. Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen gemessener vitaler Zellen mit reduziertem (red.) mitochondrialen Transmembranpotential in Prozent. (E) Caspase-2unabhängige Freisetzung von Cytochrom c nach Behandlung mit ER-Stress-induzierenden Reagenzien. WT und Caspase-2^{-/-}-Zellen wurden 24 h mit Thapsigargin, Brefeldin A, Tunicamycin oder Staurosporin (2,5 µM) behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und dann über Nacht mit Cytochrom c-spezifischen Antikörpern inkubiert. Nach Inkubation mit einem Alexa Fluor 488-gekoppeltem sekundärem Antikörper, konnte die Freisetzung von Cytochrom c durchflusszytometrisch analysiert werden. Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen von Zellen mit freigesetztem Cytochrom c in Prozent. (F) Caspase-2 agiert im Signalweg unterhalb der Mitochondrien. WT, Caspase-2^{-/-}- und Bid^{-/-}-Zellen wurden 48 h mit Thapsigargin, Brefeldin A oder Tunicamycin und/oder dem Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh behandelt. Anschließend erfolgte der durchflusszytometrische Nachweis von DNA-Fragmentierung. Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und Standardabweichung der gemessenen hypodiploiden Zellkerne in Prozent. Alle Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt.

Die in Abbildung 23 dargestellten Experimente zeigen weiterhin, dass der Verlust von Caspase-2 gegen ER-Stress-induzierte Apoptose schützt. DNA-Fragmentierung ist selbst 72 h nach Behandlung mit ER-Stress-induzierenden Reagenzien nur in WT Zellen, nicht aber in Caspase-2^{-/-}-MEFs detektierbar (Abb. 23B, C). Auch andere Apoptose-typische Merkmale, wie der Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials, sind stark inhibiert (Abb. 23D).

Interessanterweise kann allerdings auch in Caspase-2^{-/-}-MEFs die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien detektiert werden. Dieses Ergebnis war unerwartet, da bislang angenommen wurde, dass Caspase-2 im Signalweg oberhalb der Mitochondrien agiert und der Verlust der Caspase die Freisetzung von Cytochrom c z.B. nach Chemotherapeutika-Behandlung inhibiert. Das Zelltod-induzierende Signal soll von Caspase-2 u.a. durch Spaltung des *BH-3-only Proteins* Bid auf die Mitochondrien übertragen werden (Guo *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2005). Die hier dargestellten Untersuchungen zeigen jedoch, dass Cytochrom c auch in Caspase-2^{-/-}-MEFs freigesetzt wird. Wäre die Caspase-2-abhängige Bid-Spaltung tatsächlich essentiell für die Induktion von Zelltod nach Behandlung mit ER-Stress-induzierenden Reagenzien, so müssten Bid-defiziente Zellen resistent gegenüber ER-Stress-induzierter Apoptose sein.

Um dies zu überprüfen, wurden embryonale Fibroblasten von Mäusen, in denen das *Bid*-Gen spezifisch deletiert ist, verwendet. Allerdings zeigte sich, dass auch in Zellen ohne Bid apoptotische DNA-Fragmentierung bereits 48 h nach Behandlung mit ER-Stressinduzierenden Reagenzien zu gleichen Prozentsätzen wie in WT MEFs detektierbar war. Ferner ist dies vollständig Caspase-abhängig, da die Behandlung mit Q-VD-OPh DNA-Fragmentierung inhibiert (Abb. 23F).

72



Abbildung 24: ER-Stress-induzierter Zelltod in Caspase-2^{-/-}-MEFs.

(A) Induktion von Caspase-abhängigem Zelltod in Caspase-2^{-/-}-MEFs nach Thapsigargin-Behandlung. WT und Caspase-2^{-/-}-MEFs wurden mit Thapsigargin (1,5 µM) und/oder Q-VD-OPh (20 µM) behandelt. Nach 0, 24, 48 und 72 h wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf Zelltod untersucht. Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen PI-positiven Zellen in Prozent. (B) Der Verlust von Caspase-2 bedingt keinen Überlebensvorteil nach Thapsigargin-Behandlung. WT und Caspase-2-defiziente Zellen wurden 48 h nach Thapsigargin-Behandlung in Kulturgefäße mit frischem Medium überführt. Nach sieben Tagen erfolgte die Färbung mit Kristallviolett. (C) Verzögerte Aktivierung von Effektorcaspasen in Caspase-2^{-/-}-MEFs. Lysate von WT und Caspase-2^{-/-}-MEFs wurden 0, 24 und 48 h nach Thapsigargin-Behandlung hergestellt. Durch luminometrische Messung wurde Caspase-3-ähnliche (DEVDase-) Aktivität in den Lysaten bestimmt. Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der Caspase-Aktivität. (D) Der Verlust von Caspase-2 kann Zellen nur kurzfristig gegen ER-Stress-induzierte Apoptose protektieren. WT und Caspase-2^{-/-}-MEFs wurden 96 h mit Thapsigargin (1,5 µM) behandelt und durchflusszytometrisch auf DNA-Fragmentierung untersucht. Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen hypodiploiden Zellkerne in Prozent. Alle Messungen wurden mindestens dreimal durchgeführt.

Die Caspase-abhängige Spaltung von Bid kann also zumindest nach ER-Stress nicht für die Induktion von Apoptose essentiell sein. Weiterhin sind für die Freisetzung von Cytochrom c nach Behandlung mit ER-Stress-induzierenden Reagenzien weder Caspase-2 noch die Caspase-2-abhängige Aktivierung eines alternativen, Bid-unabhängigen Signalweges essentiell.

Die Freisetzung von Cytochrom c ermöglicht die Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges und der damit assoziierten Caspasen. Deshalb wäre eigentlich auch in Caspase-2^{-/-}-MEFs eine Aktivierung von Caspasen und damit die Fragmentierung von DNA zu erwarten. Um zu überprüfen, ob diese apoptotischen Charakteristika in Caspase-2^{-/-}MEFs vielleicht lediglich zeitlich verzögert eintreten, wurden weitere Experimente durchgeführt.

Die in Abbildung 24 dargestellten Ergebnisse machen deutlich, dass in Caspase-2^{-/-}-MEFs die Induktion von Apoptose nach ER-Stress, im Vergleich zu WT Zellen, nur zeitlich verzögert eintritt. Letztendlich kommt es demnach auch in diesen Zellen zur Einleitung von Zelltod. Obwohl selbst nach 72 h durchflusszytometrisch keine DNA-Fragmentierung in Caspase-2-defizienten Zellen detektierbar war, konnte bereits 48 h nach Thapsigargin-Behandlung der Verlust der Plasmamembranintegrität und damit die Induktion von Zelltod in diesen Zellen gemessen werden. Da Zelltod durch den Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh inhibiert wurde, müssen andere Caspasen an dessen Einleitung beteiligt sein (Abb. 24A).

Auch die Klonogenitäts-Tests verdeutlichen, dass Caspase-2^{-/-}-MEFs nicht in der Lage sind nach Thapsigargin-Behandlung die Proliferation wieder aufzunehmen (Abb. 24B). Durch Bestimmung der Caspase-Aktivität wird deutlich, dass Caspasen, auch in Caspase-2^{-/-}-MEFs aktiviert wurden (Abb. 24C). Diese Aktivierung ist im Vergleich zu WT Zellen verzögert, bedingt allerdings auch in Caspase-2^{-/-}-MEFs die Fragmentierung von DNA und damit die Induktion von Apoptose zu späteren Zeitpunkten (Abb. 24D).

Zusammengefasst machen diese Untersuchungen deutlich, dass Caspase-2 zwar an der Induktion von Apoptose und der Aktivierung von Caspasen beteiligt, jedoch nicht essentiell dafür ist. Der Verlust von Caspase-2 bedingt demnach lediglich eine verzögerte Einleitung von Apoptose. Da der beobachtete Zelltod auch in Caspase-2^{-/-}-MEFs durch Q-VD-OPh inhibiert wurde, kann vermutlich Caspase-9 hier den Verlust von Caspase-2 kompensieren.

Ferner agiert Caspase-2 während der Einleitung von ER-Stress-induzierter Apoptose im Signalweg nicht oberhalb der Mitochondrien, da auch in Caspase-2^{-/-}-MEFs die Freisetzung von Cytochrom c beobachtet werden konnte. Signale vom ER werden außerdem nicht durch die Caspase-2-abhängige Spaltung von Bid an die Mitochondrien übertragen, da Bid^{-/-}-MEFs eine ähnliche Sensitivität gegenüber ER-Stress-induzierenden Reagenzien aufweisen wie WT Zellen. Vermutlich ist Caspase-2 nach Behandlung mit ER-Stress-induzierenden

Reagenzien daher lediglich an einer postmitochondrialen Verstärkung des apoptotischen Signals beteiligt.

4.2.3 Induktion von Autophagie in Apoptose-inkompetenten Zellen

Neben der Induktion von Apoptose ist auch die Einleitung von Autophagie nach ER-Stress beschrieben (Yorimitsu *et al.*, 2006). Dies ist besonders in Apoptose-inkompetenten Zellen interessant, da Autophagie eine alternative Form von Zelltod vermitteln könnte (Buytaert *et al.*, 2006b). Andererseits könnte die Induktion von Autophagie auch das Überleben Apoptose-inkompetenter Zellen gewährleisten, da durch den proteolytischen Abbau intrazellulärer Komponenten neue Substrate zur Energiegewinnung generiert werden können (Ogata *et al.*, 2006).

Durch den durchflusszytometrischen Nachweis saurer Kompartimente wird deutlich, dass in Apoptose-inkompetenten Zellen nach Behandlung mit Thapsigargin und Tunicamycin Autophagie induziert wird (Abb. 25A). In WT Zellen, in denen Apoptose eingeleitet wird, kann die Bildung saurer Vesikel nicht detektiert werden. Da sie apoptotisch zu Grunde gehen, kann Autophagie nur nachgewiesen werden, wenn Apoptose, durch Behandlung mit Caspase-Inhibitoren, blockiert ist (Abb. 25B).

Auch in Caspase-2^{-/-}-MEFs ist 48 h nach Behandlung mit ER-Stress-induzierenden Reagenzien die Induktion von Autophagie detektierbar. Dies ist jedoch weniger ausgeprägt, als in den Apoptose-inkompetenten, Caspase-9- und Apaf-1-defizienten Zellen, da Caspase-2^{-/-}-MEFs zwar verzögert aber dennoch wie WT Zellen apoptotisch zu Grunde gehen.

Zusammenfassend konnte demnach gezeigt werden, dass ER-Stress-induzierende Reagenzien in Apoptose-inkompetenten Zellen die Einleitung von Autophagie bedingen. Ob die Induktion von Autophagie das Überleben dieser Zellen gewährleistet oder die Induktion eines alternativen Zelltodes bedingt, ist zur Zeit noch unklar.



Abbildung 25: Induktion von Autophagie in Apoptose-inkompetenten Zellen.

(*A*) WT, Apaf-1^{-/-}-, Caspase-9^{-/-}- und Caspase-2^{-/-}-MEFs wurden 48 h mit Thapsigargin (1,5 μM) oder Tunicamycin (1 μg/ml) behandelt. Anschließend erfolgten die Anfärbung saurer Kompartimente mittels Acridinorange und die Analyse im Durchflusszytometer. Dargestellt sind repräsentative Messdiagramme. (*B*) WT Zellen wurden 48 h mit Thapsigargin (links) und/oder Q-VD-OPh (rechts) behandelt. Nach Färbung mit Acridinorange erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer. Dargestellt sind repräsentative Messdiagramme.

4.3 Bei fehlender Expression der Bcl-2-Proteine Bak und Bax führt Thapsigargin-Behandlung zu nekrotischem Zelltod

4.3.1 Bak/Bax^{-/-} embryonale Mausfibroblasten sind sensitiv gegenüber Thapsigargin

Bak und Bax gehören zu den proapoptotischen Bcl-2-Proteinen. Sie sind u.a. an den Mitochondrien lokalisiert und regulieren dort, aktiviert durch apoptotische Signale, die Freisetzung von Cytochrom c. Der Verlust dieser Proteine verleiht Zellen Resistenz gegenüber der Behandlung mit vielen Chemotherapeutika, wie z.B. Taxol und Etoposid und anderen Apoptose-induzierenden Reagenzien (Wei *et al.*, 2001). Dadurch Überleben diese und können zum Teil sogar die Proliferation wieder aufnehmen.

Es wurde postuliert, dass der Verlust von Bak und Bax Zellen auch vor der Induktion von Zelltod nach ER-Stress schützt (Wei *et al.*, 2001; Hetz *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ER-Stress-induzierte Apoptose über den intrinsischen Apoptoseweg verläuft. Deshalb liegt es nahe, dass der Verlust von Bak und Bax, ähnlich wie fehlende Caspase-9- oder Apaf-1-Expression, Zellen vor ER-Stress-induzierter Apoptose protektiert.

Um dies zu überprüfen, wurden embryonale Fibroblasten von Mäusen, in denen das *Bak*und *Bax*-Gen spezifisch deletiert ist (Abb. 26A), mit verschiedenen Konzentrationen der ER-Stress-induzierenden Agenzien Thapsigargin und Tunicamycin behandelt und zunächst der resultierende Zelltod bestimmt. Die durchflusszytometrische Untersuchung macht deutlich, dass Bak/Bax-defiziente Mausfibroblasten gegen Tunicamycin-induzierten Zelltod protektiert sind (Abb. 26B, C, links).

Die Behandlung mit Thapsigargin führt dagegen auch in Abwesenheit dieser proapoptotischen Proteine zur Induktion von Zelltod. Bereits 48 h nach Stimulation haben mehr als 50% der Bak/Bax^{-/-}-Zellen die Membranintegrität verloren und sind daher nicht mehr vital (Abb. 26B, C, rechts). Auch in Klonogenitäts-Tests wird deutlich, dass Bak/Bax-defiziente MEFs nur nach Tunicamycin-, nicht aber nach Thapsigargin-Behandlung einen Überlebensvorteil aufweisen (Abb. 26D).

Der Verlust von proapoptotischem Bak und Bax schützt Zellen demnach zwar gegen Tunicamycin, verleiht jedoch keine generelle Resistenz gegenüber ER-Stress-vermitteltem Zelltod.



Abbildung 26: Thapsigargin induziert Zelltod in Bak/Bax-defizienten MEFs.

(*A*) Lysate von Wildtyp- (WT) und Bak/Bax-defizienten Zellen wurden im Western Blot mittels spezifischer Antikörper analysiert. Die Positionen von Bak, Bax und Aktin sind durch Pfeile gekennzeichnet. (*B*, *C*) Induktion von Zelltod in Bak/Bax^{-/-}-Zellen nach Thapsigargin Behandlung. WT und Bak/Bax-defiziente Zellen wurden 48 h mit steigenden Thapsigargin- oder Tunicamycin-Konzentrationen (*B*) oder bis zu 72 h mit 1 µg/ml Tunicamycin oder 1,5 µM Thapsigargin behandelt (*C*). Nach Färbung mit Propidiumiodid (PI) wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen in Prozent. Alle Messungen wurden mindestens dreimal durchgeführt. (*D*) Der Verlust von Bak und Bax schützt Zellen vor Tunicamycin-, nicht aber vor Thapsigargin-induziertem Zelltod. 48 h nach Behandlung mit ER-Stress-induzierenden Reagenzien wurden die verwendeten Zellen in Kulturschalen mit Medium ohne Thapsigargin oder Tunicamycin überführt. Nach weiteren sieben Tagen in Kultur erfolgte die Färbung mit Kristallviolett und die Bestimmung der relativen Proliferation.

4.3.2 Thapsigargin-induzierter Zelltod führt zur Aktivierung von Caspasen

Nach anhaltendem ER-Stress kommt es zur Induktion von Capase-9-vermittelter Apoptose. Caspase-9 wird im Apoptosom aktiviert, dessen Bildung über die Freisetzung von Cytochrom c durch Bak und Bax reguliert wird. Dementsprechend sollte in Bak/Bax-defizienten Zellen nach ER-Stress keine Aktivierung von Caspasen detektiert werden.





(*A*) DNA-Fragmentierung in Bak/Bax-defizienten MEFs nach Thapsigargin-Behandlung. WT und Bak/Bax-defiziente MEFs wurde 48 h mit Thapsigargin (1,5 μ M, rechts) oder Tunicamycin (1 μ g/ml, links) behandelt. Nach Färbung mit PI wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der gemessenen hypodiploiden Zellkerne in Prozent. (*B*, *C*) Thapsigargin induziert die Aktivierung von Caspasen in WT und Bak/Bax^{-/-}-MEFs. 48 h nach Behandlung mit Thapsigargin (Th, 1,5 μ M), Brefeldin A (1 μ g/ml, Br) oder Tunicamycin (Tu, 1 μ g/ml) wurden Lysate von WT und Bak/Bax-defizienten MEFs hergestellt. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot und spezifischer Antikörper. Die Positionen von Caspase-3, Aktin, Tubulin und PARP-1 sind durch Pfeile markiert (*B*). Einige der Thapsigargin (1,5 μ M)- oder Tunicamycin (1 μ g/ml)-behandelten Lysate aus (*B*) wurden parallel in luminometrischen Tests auf Caspase-3-ähnliche (DEVDase-) Aktivität untersucht (*C*). (unbeh.: unbehandelt; AU: *arbitrary units*).

Um zu überprüfen ob Caspasen tatsächlich während der Induktion von Zelltod nach ER-Stress auch in Bak/Bax-defizienten MEFs nicht aktiviert werden, wurden weitere Experimente durchgeführt (Abb. 27A). Zunächst wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf apoptotische DNA-Fragmentierung untersucht.

Aus den in Abbildung 27 dargestellten Versuchen geht deutlich hervor, dass die Behandlung mit Thapsigargin sowohl in WT als auch in Bak/Bax^{-/-}-MEFs zur Aktivierung von Caspasen und damit zur Fragmentierung von DNA führt. 48 h nach Tunicamycin-Behandlung konnte in Bak/Bax^{-/-}-MEFs dagegen weder DNA-Fragmentierung noch Caspase-Aktivität detektiert werden (Abb. 27A, C). Anhand der Western Blot-Analyse lässt sich außerdem erkennen, dass Caspase-3 in WT, im Gegensatz zu Bak/Bax-defizienten Zellen, nach 48 h bereits vollständig aktiviert ist (Abb. 27B, oben).

Wie bereits erwähnt, sind Bak/Bax-defiziente Zellen Apoptose-inkompetent, da der intrinsische Signalweg in diesen Zellen nicht aktiviert werden kann. Nach Thapsigargin-Behandlung wiesen die hier verwendeten MEFs jedoch DNA-Fragmentierung, ein typisches Merkmal der Apoptose und eine, im Vergleich zu WT Zellen, geringe Aktivierung von Caspasen auf (Abb. 27A, C). Demnach scheint ein anderer Mechanismus für die Freisetzung von Cytochrom c und die Aktivierung von Caspase-9 verantwortlich zu sein.

Da Bak und Bax ihre proapoptotische Funktion hauptsächlich an den Mitochondrien ausüben, ist es nicht nur interessant, sondern essentiell sowohl Morphologie als auch Funktionalität dieser Organellen nach Thapsigargin- und Tunicamycin-Behandlung zu überprüfen. Sowohl WT als auch Bak/Bax-defiziente MEFs zeigen nach Behandlung mit Thapsigargin eine Reduktion des mitochondrialen Transmembranpotentials (Abb. 28A). Diese ist allerdings nur in WT Zellen Caspase-abhängig, da der Prozentsatz von Zellen mit reduziertem mitochondrialem Transmembranpotential durch Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh, in WT nicht aber in Bak/Bax-defizienten Zellen nicht an der Reduktion des mitochondrialen Transmembranpotential setelligt.

Tunicamycin hingegen induziert lediglich in WT Zellen, nicht aber in Bak/Bax^{-/-}-MEFs einen Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials. Wie nach Thapsigargin-Behandlung ist dies in WT MEFs abhängig von aktiven Caspasen, da der Verlust durch Behandlung mit Caspase-Inhibitor reduziert werden kann.



Abbildung 28: Ca²⁺-bedingte, Bak/Bax-unabhängige Freisetzung von Cytochrom c und Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta \Psi_m$).

(*A*) Caspase-unabhängiger Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials in Bak/Bax^{-/-}-MEFs. WT und Bak/Bax-defiziente MEFs wurden 48 h mit Thapsigargin (1,5 μM) oder Tunicamycin (1 μg/ml) und/oder dem Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh (20 μM) behandelt. Nach Zugabe von DiOC₆ erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen vitaler Zellen mit reduziertem mitochondrialem Transmembranpotentials Bak/Bax-defizienter MEFs 48 h nach Thapsigargin-Behandlung (1,5 μM, oben). Bak/Bax-defiziente Zellen wurden außerdem 36 h mit Thapsigargin behandelt und im Elektronenmikroskop untersucht (unten,

Nu: Zellkern; Zy: Zytoplasma; Mi: Mitochondrien; ER: endoplasmatisches Retikulum). *(C)* Die verwendeten Zelllinien wurden 24 h nach Behandlung mit Thapsigargin oder Tunicamycin fixiert, permeabilisiert und mit Cytochrom c-spezifischen Antikörpern inkubiert. Nach Inkubation mit einem Fluoreszenz-gekoppeltem sekundärem Antikörper wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Freisetzung von Cytochrom c untersucht. Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen von Zellen mit freigesetztem Cytochrom c in Prozent. *(D)* Der Ca²⁺-Chelator BAPTA-AM führt zur Reduktion von Zelltod in Bak/Bax^{-/-}-MEFs. Bak/Bax^{-/-}-MEFs wurden 48 h mit Thapsigargin (1,5 μ M) und/oder BAPTA-AM (13 μ M, 26 μ M) behandelt. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf DNA-Fragmentierung untersucht. Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen hypodiploiden Zellen in Prozent. *(E)* Bak/Bax^{-/-}-MEFs wurden 48 h mit Thapsigargin (1,5 μ M) und BAPTA-AM (13 μ M) behandelt, mit PI versetzt und durchflusszytometrisch auf Zelltod analysiert. Die statistische Evaluation zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen PI-positiven Zellen in Prozent. Alle Messungen wurden mindestens dreimal durchgeführt. (B: BAPTA-AM, Th: Thapsigargin)

Aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Bak/Bax^{-/-}-MEFs geht hervor, dass die Mitochondrien nach Thapsigargin-Behandlung stark angeschwollen und teilweise bereits zerstört sind (Abb. 28B, unten). Dies erklärt auch, warum Bak/Bax-defiziente Zellen nach Thapsigargin-Behandlung aus den Mitochondrien freigesetztes Cytochrom c aufweisen.

Dieses Ergebnis ist unerwartet und sehr interessant, da die Oligomerisierung von Bak und Bax und die daraus resultierenden Poren, der bislang einzige bekannte Mechanismus ist, der zur Freisetzung von Cytochrom c führt. Den bisherigen Ergebnissen zufolge, muss allerdings noch eine weitere Möglichkeit existieren, durch die Cytochrom c freigesetzt werden kann. Ein Hinweis auf den Mechanismus ergibt sich aus den unterschiedlichen Wirkungsweisen von Thapsigargin und Tunicamycin.

Die Behandlung mit Thapsigargin führt durch Inhibition der SERCA-Pumpe zu einer verringerten Ca²⁺-Konzentration im ER, wodurch die UPR (*unfolded protein response*) eingeleitet wird. Außerdem kommt es zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration. Auch dadurch kann Apoptose induziert werden, wenn nicht die Mitochondrien durch Aufnahme von Ca²⁺ aus dem Zytoplasma dem entgegen wirken. Tunicamycin hingegen inhibiert lediglich die N-Glykosylierung ungefalteter Proteine, wodurch zwar auch ER-Stress ausgelöst wird, es aber zu keiner Veränderung der zellulären Ca²⁺-Homöostase kommt.

Um zu überprüfen, ob der Anstieg der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration für die Induktion von Zelltod in Bak/Bax-defizienten MEFs verantwortlich ist, wurden die Zellen mit Thapsigargin und dem zellpermeablen Ca²⁺-Chelator BAPTA-AM behandelt (Abb. 28D, E).

Die Ergebnisse machen deutlich, dass eine Reduktion der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration durch Behandlung mit BAPTA-AM die Induktion von DNA-Fragmentierung (Abb. 28D) und Zelltod (Abb. 28E) nach Thapsigargin-Behandlung in Bak/Bax-defizienten Zellen verringert. Demnach könnten der beobachtete Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials und die Freisetzung von Cytochrom c in Abwesenheit von Bak und Bax auch durch den lokalen Anstieg der Ca²⁺-Konzentration ausgelöst werden. Die Mitochondrien der Bak/Bax-defizienten Zellen könnten durch den Ca²⁺-Einstrom so stark geschädigt werden, dass sie ihre normalen Funktionen nicht mehr ausüben können.

Auch die Western Blot-Analyse spricht für diese Erklärung. In Bak/Bax-defizienten Zellen wurde eine Form von PARP-1 [Poly(ADP-ribose)Polymerase-1] mit höherem Molekulargewicht detektiert (Abb. 27B). Diese entsteht durch die Bildung und Kopplung von ADP-Ribose-Polymeren an PARP-1 und weist auf eine erhöhte Aktivität des Enzyms hin. Das führt wiederum zu einem starken Abfall der zellulären NAD⁺ (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid)-Konzentration, der nur durch große ATP-Mengen kompensiert werden kann. Ist der ATP-Nachschub nicht gewährleistet, wie es in den Bak/Bax^{-/-}-MEFs der Fall sein könnte, könnte dies zur Induktion eines Caspase-unabhängigen Zelltodes führen (Beneke und Burkle, 2007).

4.3.3 Thapsigargin-Behandlung bedingt die Induktion von Nekrose in Bak/Bax^{-/-}-Zellen

Alle Apoptose-typischen Merkmale, die in Bak/Bax-defizienten MEFs detektiert wurden, sind zwar durch die Aktivität von Caspasen bedingt, allerdings ist diese nicht essentiell für die Einleitung von Zelltod. Werden die Mitochondrien der Bak/Bax-defizienten Zellen tatsächlich durch die erhöhte zytoplasmatische Ca²⁺-Konzentration nach Thapsigargin-Behandlung zerstört, so könnte eine unregulierte Art des Zelltodes wie z.B. Nekrose ausgelöst werden. Um dies im Detail zu untersuchen, wurden WT und Bak/Bax-defiziente MEFs nach Behandlung mit Thapsigargin oder Tunicamycin im Elektronenmikroskop untersucht.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 29) machen deutlich, dass in WT Zellen, sowohl nach Behandlung mit Thapsigargin als auch nach Behandlung mit Tunicamycin Apoptose induziert wird. Die Zellen weisen klassische Apoptosemerkmale, wie z.B. Chromatin-Kondensation, auf.

Bak/Bax^{-/-}-MEFs zeigen einen völlig anderen Phänotyp. Die Zellen sind nach Behandlung mit Thapsigargin angeschwollen oder bereits zerstört. Das ER erscheint vergrößert und die Mitochondrien sind nicht mehr intakt. Nach Behandlung mit Tunicamycin kann dies nicht beobachtet werden.

Thapsigargin induziert demnach in den Apoptose-inkompetenten Bak/Bax^{-/-}-Zellen Nekrose oder eine Nekrose-ähnliche Form des Zelltodes, da auch die Plasmamembran der Bak/Bax-defizienten Zellen zerstört ist. Tunicamycin und Thapsigargin sind folglich nicht nur

mechanistisch verschieden, sondern weisen auch ein unterschiedliches Potential Zelltod zu induzieren auf.



Abbildung 29: Thapsigargin induziert Nekrose in Bak/Bax ----MEFs.

WT und Bak/Bax-defiziente MEFs wurde 36 h mit Thapsigargin (1,5 µM) oder Tunicamycin (1 µg/ml) behandelt und anschließend für die Analyse im Elektronenmikroskop präpariert. (Nu: Zellkern; Mi: Mitochondrien; ER: endoplasmatisches Retikulum; A: Autophagosom)



5. Diskussion

5.1 Mechanismus des Taxol-induzierten Zelltodes

Das Chemotherapeutikum Taxol induziert die Stabilisierung von Mikrotubuli. Dies führt zu Zellzyklus-Arrest und zur Initiation von Zelltod (Bartsch, 2005). Der zu Grunde liegende molekulare Mechanismus ist jedoch noch nicht genau bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher zentrale Komponenten des apoptotischen Signalweges, sowie ihr Einfluss auf den Taxol-induzierten Zelltod untersucht. Ausgangspunkt waren Ergebnisse, die zu der Vermutung führten, dass die Initiatorcaspase-10 essentiell für Taxol-induzierte Apoptose sei (Park *et al.*, 2004; Day *et al.*, 2006). Die Hypothese basierte im Wesentlichen auf Experimenten, in denen synthetische Tetrapeptide als Caspase-Inhibitoren verwendet wurden.

Tetrapeptid-Inhibitoren, wie ac-AEVD-fmk, binden irreversibel an das katalytische Zentrum von Caspasen und verhindern so die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes und die daraus resultierende Substratspaltung. Alle Caspasen erkennen Substrate an spezifischen Tetra- oder Penta-Peptidsequenzen (Position (P)1-P4/5) und prozessieren diese nach dem Aspartatrest an Position 4/5. Obwohl sich die Konsensussequenzen der verschiedenen Caspasen leicht unterscheiden, gibt es jedoch nicht unerhebliche Überlappungen zwischen ihnen. Deshalb sind Tetrapeptid-basierende Inhibitoren *in vivo* ungeeignet zur Untersuchung individueller Caspasen.

Ein Beispiel ist das vermeintlich Caspase-10-spezifische Tetrapeptid AEVD (Ala-Glu-Val-Asp). Es ist ein potenter Inhibitor für Caspase-8 ($K_i = 1,6$ nM) und Caspase-3 ($K_i = 42$ nM) und weist dagegen eine vergleichsweise geringe Affinität für Caspase-10 ($K_i = 320$ nM) auf (Garcia-Calvo *et al.*, 1998). Untersuchungen, in denen der Tetrapeptid-basierte Inhibitor ac-AEVD-fmk verwendet wurde, besitzen demnach nicht genug Aussagekraft, um den Einfluss von Caspase-10 auf Taxol-induzierte Apoptose hinreichend zu beschreiben.

Um den Einfluss von Caspase-10 auf Taxol-vermittelte Apoptose endgültig zu klären, wurden im Rahmen dieser Arbeit embryonale Mausfibroblasten (MEF), denen das *Caspase-10*-Gen fehlt, Neuroblastom-Zellen, die auf Grund von Promotormethylierung keine Caspase-10 exprimieren und Caspase-10-defiziente MCF-7-Zellen verwendet. In allen Modellsystemen konnte eindeutig gezeigt werden, dass Taxol-induzierte Apoptose unabhängig von Caspase-10 ist.

Auch der Einfluss des Adapterproteins FADD auf Taxol-vermittelten Zelltod wird kontrovers diskutiert. Untersuchungen zufolge schützt die Überexpression einer FADD-Mutante, die nicht mehr in der Lage ist, Caspase-8 oder -10 zu rekrutieren, Zellen vor Apoptoseinduktion nach Taxol-Behandlung (Park *et al.*, 2004; Biswas *et al.*, 2001). Andere Studien konnten

diese Beobachtungen hingegen nicht bestätigen (Wieder *et al.*, 2001; von Haefen *et al.*, 2003). Weiterhin wurde gezeigt, dass FADD, neben seiner Funktion im Todesrezeptorsignalweg, auch noch eine Rolle in der Zellzyklusregulation spielt (Alappat *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 1998; Newton *et al.*, 1998). Diesen Untersuchungen zufolge ist die Phosphorylierung von FADD eine Voraussetzung für Taxolbedingten Zellzyklusarrest am Übergang zwischen G₂- und M-Phase.

Dies konnte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten allerdings nicht bestätigt werden. Die verwendeten FADD-defizienten T-Lymphozyten arretierten nach Taxol-Behandlung zu gleichen Prozentsätzen wie WT Zellen an der G₂/M-Grenze und wiesen kein verändertes Zellzyklusprofil auf. Taxol induzierte außerdem auch in diesen Zellen Apoptose, was verdeutlicht, dass die Wirkung des Chemotherapeutikums durch die fehlende FADD-Expression nicht beeinträchtigt wird. Da in voran gegangenen Untersuchungen primäre Zellen verwendet wurden und nicht wie in dieser Arbeit transformierte Jurkat-T-Lymphozyten, könnten die kontroversen Beobachtungen auch durch Zelltyp-spezifisches Verhalten des Adapterproteins verursacht werden.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass Taxol-induzierte Apoptose Caspase-8-unabhängig ist, da auch in Caspase-8-defizienten Jurkat-Zellen ähnlich wie in WT Zellen die Induktion von Apoptose detektiert wurde. Insgesamt konnte anhand der durchgeführten Experimente, in dem verwendeten Modellsystem, eine essentielle Beteiligung des Todesrezeptorsignalweges und seiner Komponenten FADD, Caspase-8 und Caspase-10 an der Apoptoseinduktion nach Taxol-Behandlung, ausgeschlossen werden.

Weiterführende Untersuchungen zeigten dagegen eindeutig, dass Taxol-induzierte Apoptose über den mitochondrialen Signalweg verläuft. Der Einfluss von Caspase-9 auf Taxolvermittelte Apoptose, die eine zentrale Rolle im intrinsischen Apoptoseweg spielt, wird immer noch kontrovers diskutiert. Während einige Studien zeigten, dass Caspase-9 nach Taxol-Behandlung aktiviert wird (Perkins *et al.*, 2000; Razandi *et al.*, 2004; von Haefen *et al.*, 2003), gibt es Untersuchungen, die diese Aktivierung nicht bestätigen konnten (Park *et al.*, 2004; Ofir *et al.*, 2002).

Die Ergebnisse der Analysen, die den Einfluss von Caspase-9 auf Taxol-induzierte Apoptose beschreiben, basieren im Wesentlichen auf dem Einsatz pharmakologischer Tetrapeptidinhibitoren oder von RNA-Interferenz. Diese Techniken ermöglichen entweder nur eine unvollständige Inhibition der Caspase oder eine lediglich reduzierte Expression des Proteins. Dadurch kann ein potentieller Einfluss von Caspase-9 auf Taxol-induzierte Apoptose nicht endgültig ausgeschlossen oder nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb embryonale Fibroblasten von Mäusen verwendet, in denen die Gene, die das zu untersuchende Protein (z.B. Caspase-9) kodieren, spezifisch deletiert sind. In diesen Modellsystemen kann ausgeschlossen werden, dass das zu untersuchende Protein die Experimente beeinflusst.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen eindeutig, dass Caspase-9 unverzichtbar für Taxol-induzierte Apoptose ist. Caspase-9- und Apaf-1-defiziente Mausfibroblasten sind selbst nach Behandlung mit hohen Taxol-Konzentrationen gegen DNA-Fragmentierung protektiert, wogegen WT MEFs schon bei 100-fach geringeren Dosen eine massive Apoptoseinduktion aufweisen. Auch der Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials sowie die Exposition von Phosphatidylserin, zwei weiteren, biochemischen Merkmalen der Apoptose, kann nur in WT, jedoch nicht Caspase-9^{-/-} oder Apaf-1^{-/-}-Zellen, detektiert werden.

Ferner wiesen auch Caspase-9-defiziente Jurkat-T-Lymphozyten nach Taxol-Behandlung weder DNA-Fragmentierung noch einen Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials oder die Exposition von Phosphatidylserin auf. In Caspase-9-profizienten Jurkat-Zellen konnten dagegen alle apoptotischen Charakteristika detektiert werden. Die Behandlung von WT MEFs oder Caspase-9-profizienten T-Lymphozyten mit dem Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh führte zur Reduktion der DNA-Fragmentierung, der Exposition von Phosphatidylserin und des Zusammenbruchs des mitochondrialen Transmembranpotentials, was die essentielle Bedeutung von Caspasen für die Induktion von Apoptose nach Taxol-Behandlung weiter unterstreicht.

Ein weiteres Indiz für die Beteiligung des mitochondrialen Signalweges ist die Beobachtung, dass Bcl-2-Überexpression, Jurkat-T-Lymphozyten vor Taxol-bedingtem Zelltod schützt. Auch diese Zellen waren gegenüber hohen Taxol-Konzentrationen resistent, wohingegen 65% der WT Zellen nach Behandlung mit 100-fach niedrigeren Konzentrationen apoptotisch waren. Dies war eher unerwartet, da vermutet wurde, dass Bcl-2, Zellen gegen Taxol nicht protektiert, sondern für das Chemotherapeutikum sensitiviert. Diese proapoptotische Eigenschaft des eigentlich antiapoptotischen Proteins sollte durch Phosphorylierung von Bcl-2 bedingt werden (Haldar *et al.*, 1996). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bestätigen diese Ergebnisse jedoch nicht und machen dagegen deutlich, dass Bcl-2 auf Grund seiner antiapoptotischen Eigenschaften Zellen gegen Taxol-induzierte Apoptose protektiert.

Bcl-2 ist ein Antagonist proapoptotischer Bcl-2-Proteine, wie Bak und Bax. Daher wurden Bak/Bax^{-/-}-MEFs auf ihre Sensitivität gegenüber Taxol-induzierter Apoptose untersucht. Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass auch Bak/Bax-defiziente embryonale Mausfibroblasten vollständig resistent gegen Taxol sind.

Es wird vermutet, dass Bak und Bax funktionell redundant sind (Lindsten *et al.*, 2000), da nur ein Verlust beider Proteine Resistenz gegenüber verschiedenen, apoptotischen Stimuli, wie

z.B. Chemotherapeutika-Behandlung, UV-Bestrahlung oder Entzug von Wachstumsfaktoren, vermittelt (Wei *et al.*, 2001). Interessanterweise scheint dies, zumindest im Taxol-vermittelten Signalweg, nicht der Fall zu sein. Die durchgeführten Untersuchungen ergaben eindeutig, dass Bax-defiziente Zellen, im Vergleich zu Bak-defizienten MEFs, partiell gegen Taxolinduzierte Apoptose protektiert waren. Es ist deshalb denkbar, dass zumindest in diesem Fall, Apoptose bevorzugt durch Bax induziert wird. Bak kann nach Taxol-Behandlung die fehlende Bax-Expression nur teilweise kompensieren.

Bislang gibt es nur wenige Untersuchungen, die zeigen, dass Bak und Bax auch nichtredundante Funktionen erfüllen. Beispielsweise wurde beobachtet, dass Bak eine zentrale Rolle bei der Apoptoseinduktion durch Gliotoxin und mikrobielle Infektionen spielt (Pardo *et al.*, 2006; Kepp *et al.*, 2007). Dagegen ist Bax essentiell für die Induktion von Zelltod durch das *BH3-only Protein* Nbk/Bik (*Bcl-2-interacting killer*) (Gillissen *et al.*, 2003).

Voran gegangene Studien bieten eine mögliche Erklärung für die funktionellen Unterschiede zwischen Bak und Bax während Taxol-induzierter Apoptose. Wie bereits erwähnt, wurde gezeigt, dass Bcl-2 am G₂/M-Übergang durch JNK (c-Jun N-terminale Kinase) phosphoryliert wird (Basu und Haldar, 1998; Yamamoto *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass Bcl-2 durch diese Phosphorylierung inhibiert wird, wodurch Bax wiederum aktiviert werden kann (Srivastava *et al.*, 1999). Dies ist außerdem der Grund, weshalb man vermutete, dass Bcl-2 Zellen gegenüber Taxol-induzierter Apoptose sensitiviert.

Aus dieser Arbeit und einer anderen aktuellen Untersuchung geht jedoch hervor, dass dieser Mechanismus wahrscheinlich nicht der Grund für die Apoptoseinduktion nach Taxol-Behandlung ist (Li *et al.*, 2005). Man vermutet, dass die Aktivierung von Bak und Bax nach Taxol-Behandlung vielmehr durch *BH3-only Proteine* erfolgt. Diese aktivieren proapoptotische Bcl-2-Proteine entweder direkt, wie z.B. Bim, Bid oder PUMA, oder indirekt durch Sequestrierung antiapoptotischer Bcl-2-Proteine (Chen *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006). Eines dieser *BH3-only Proteine* - Bid -, ein Substrat von Caspase-8 und -10, verknüpft den extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalweg. In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung zeigte sich, dass Bid-defiziente MEFs ähnlich sensitiv gegenüber Taxol waren wie WT Zellen. Dies macht nochmals deutlich, dass Taxol-induzierte Apoptose nicht über den extrinsischen, sondern den intrinsischen Apoptoseweg verläuft.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente ergaben weiterhin, dass Bim-defiziente Zellen partiell, zumindest gegen niedrige Taxol-Konzentrationen, protektiert waren. Unter physiologischen Bedingungen wird Bim durch Assoziation mit Mikrotubuli sequestriert (Puthalakath *et al.*, 1999) und kann somit Bak und Bax nicht aktivieren. Nach Taxol-Behandlung wird diese Assoziation unterbrochen (Li *et al.*, 2005), so dass Bak und Bax aktiviert werden können. In diesem Fall scheint Bax bevorzugt aktiviert zu werden (Marani *et*

al., 2002), was auch die partielle Protektion Bax-defizienter Zellen erklären würde. Vermutlich ist daher Bim und nicht die Phosphorylierung von Bcl-2, nach Taxol-Behandlung, für die Aktivierung von Bax verantwortlich. Zusammengefasst konnte durch diese Experimente gezeigt werden, dass Taxol-induzierte Apoptose über den mitochondrialen Signalweg verläuft und abhängig von dessen Komponenten ist.

Die Inhibition von Apoptose ist ein entscheidender Faktor bei der Entstehung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika (Fischer *et al.*, 2007). Auf Grund aktueller Publikationen wird vermutet, dass z.B. die fehlende Expression von Caspasen, Zellen nicht vor Chemotherapeutika-induzierter Apoptose schützt, sondern eher den Wechsel zu einem alternativen, Caspase-unabhängigen Zelltod bedingt (Ekert *et al.*, 2004; Marsden *et al.*, 2004).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente in Jurkat T-Lymphozyten ergaben, dass der Verlust von Caspase-9, Zellen gegenüber Taxol-induzierter Apoptose protektiert. Übereinstimmend mit der Literatur bedingt die Langzeitbehandlung mit Taxol, auch in Caspase-9-defizienten Zellen den Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials und die Induktion eines alternativen, Caspase-unabhängigen Zelltodes. Dementsprechend war der Verlust von Caspase-9 in diesem Modellsystem nicht ausreichend, um den Zellen in Langzeitexperimenten einen Überlebensvorteil zu verleihen. Auch WT Zellen, die mit Q-VD-OPh behandelt wurden, zeigten vier Tage nach Taxol-Behandlung einen Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials und die Einleitung eines alternativen, Caspase-unabhängigen Zelltodes. Dieser wird in Jurkat-Zellen wahrscheinlich durch den Verlust der Mitochondrien-Funktion und die damit zusammenhängende Unfähigkeit, die ATP-Menge konstant zu halten, induziert.

Im Gegensatz zu diesem Modellsystem, waren embryonale Fibroblasten von Mäusen, in denen das *Apaf-1-* oder *Caspase-9-*Gen spezifisch deletiert ist, gegen Apoptose sogar nach Zugabe hoher Taxol-Konzentrationen protektiert. Der Verlust eines dieser Proteine reichte aus, um den Zellen auch nach längerer Taxol-Behandlung einen Überlebensvorteil zu verleihen. Sowohl Apaf-1- als auch Caspase-9-defiziente MEFs waren in der Lage wieder zu proliferieren. Dies ist wahrscheinlich nur möglich, weil in diesen Zellen, auch nach Langzeitbehandlung mit Taxol, das mitochondriale Transmembranpotential aufrechterhalten wird.

Ähnliche Beobachtungen wurden in sympathischen Neuronen oder in GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)-überexprimierenden HeLa-Zellen gemacht. Sind Caspasen blockiert, so können diese Zellen entweder die mitochondrialen Funktionen, trotz Cytochrom c Verlust, wieder reaktivieren oder die Energieversorgung durch verstärkte Glykolyse aufrechterhalten. (Martinou *et al.*, 1999; Deshmukh *et al.*, 2000; Colell *et al.*,

2007). Warum Jurkat-Zellen diese Fähigkeit nicht besitzen, ist noch unklar. Eine mögliche Erklärung wären Unterschiede in der Abhängigkeit vom Glukose-Metabolismus. Zusammenfassend kann man schließen, dass eine fehlende Aktivierung von Caspasen großen Einfluss auf die Tumortherapie hat, da vielen Tumorzellen wichtige proapoptotische Proteine fehlen oder zelluläre Caspase-Inhibitoren überexprimiert werden. Besonders Caspase-9 spielt dabei eine wichtige Rolle.

Da der Verlust von Caspase-9 oder Apaf-1 einen entscheidenden Einfluss auf die Resistenz gegenüber Taxol-induzierter Apoptose hat, stellt sich die Frage, ob diese Proteine genau wie z.B. Bcl-2 oder p53 zu den Tumor-Suppressoren gehören. Im Gegensatz zu klassischen Tumor-Suppressoren sind Mutationen im *Apaf-1*-oder *Caspase-9*-Gen in Tumoren selten. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Aktivierung des Apoptosoms nicht ausschließlich durch die Expression seiner Komponenten, sondern auch durch eine Vielzahl anderer Mechanismen reguliert wird. Eine Fehlregulation dieser Mechanismen kann in Tumoren häufig nachgewiesen werden. Beispielsweise weisen NSCLC-Zellen (*non small cell lung cancer*) eine gestörte Aktivierung des Apoptosoms auf, die aus der Überexpression des intrazellulären Caspase-9-Inhibitors XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*) resultiert (Krepela *et al.*, 2006; Krepela *et al.*, 2004). Auch das onkogene Fusionsprotein BCR-ABL, das mit dem Auftreten von chronischer myeloischer Leukämie in Patienten assoziiert ist, hat Einfluss auf die Bildung des Apoptosoms. Es induziert indirekt die Phosphorylierung von Apaf-1, die die Bindung an und damit die Aktivierung von Caspase-9 verhindert (Deming *et al.*, 2004).

Abgesehen von indirekten Effekten, die in Tumorzellen die Bildung und Aktivität des Apoptosoms und somit die Aktivierung von Caspase-9 verhindern, gibt es auch Beispiele in denen durch Inaktivierung des Apaf-1-Gens oder durch verringerte Apaf-1-Expression eine Induktion des intrinsischen Apoptosesignalweges nicht mehr möglich ist. Auch ältere Untersuchungen in denen Apaf-1^{-/-}- und Caspase-9^{-/-}-MEFs verwendet wurden zeigten, dass diese beiden Proteine das Potential eines Tumor-Suppressors besitzen. Genau wie p53^{-/-}-MEFs wurden Apaf-1- und Caspase-9-defiziente-Zellen nicht durch Überexpression von c-Myc (cellular myelocytomatosis viral oncogene) für Apoptose sensitiviert. In WT MEFs bedingt die erhöhte Expression dieses Onkogens dagegen die Induktion von Apoptose (Soengas et al., 1999). Der Verlust von Apaf-1 oder Caspase-9 ist demnach genau wie eine fehlende p53-Expression ausreichend, um in gesunden Zellen nach Überexpression eines Onkogens die Transformation zu Tumorzellen einzuleiten. Aktuelle Untersuchungen zeigen außerdem, dass die Überexpression einer dominanten Caspase-9-Mutante im Tiermodell das Wachstum von Tumoren begünstigt (Schmitt et al., 2002). Ob Caspase-9 und Apaf-1 tatsächlich zu den Tumor-Suppressor-Proteinen gehören, wird aber immer noch kontrovers diskutiert.

5.2 ER-Stress-induzierte Apoptose ist abhängig von Caspase-9 und ihrer Aktivierung im Apoptosom

ER-Stress führt zur Akkumulation ungefalteter Proteine im ER-Lumen und zur Induktion der sogenannten "*unfolded protein response*" (UPR). Der verantwortliche Signalweg dient der Wiederherstellung physiologischer Bedingungen. Ist dies nicht möglich, so wird als Folge Apoptose in Zellen eingeleitet (Szegezdi *et al.*, 2006).

Lange Zeit war unbekannt, welche zentralen Apoptosemodulatoren an der Induktion von Apoptose nach ER-Stress beteiligt sind. Es wurde vermutet, dass eine ER-spezifische Caspase-Kaskade existieren könnte, die unabhängig von den klassischen extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalwegen, die Einleitung von Zelltod vermittelt. Man vermutete, dass in diesem ER-gekoppelten Signalweg, Caspase-12 als apikale Initiatorcaspase fungiert. Durch sie soll dann die eigentlich mit dem intrinsischen Signalweg-assoziierte Caspase-9 direkt aktiviert werden, wodurch wiederum Effektorcaspasen wie Caspase-3 und -7 gespalten werden könnten (Rao *et al.*, 2001). Auch für Caspase-2, die am Golgi-Apparat lokalisiert ist, wurde eine zentrale Rolle während ER-Stress-induzierter Apoptose beschrieben (Dahmer, 2005; Mancini *et al.*, 2000).

Zumindest im humanen System kann Caspase-12 nicht die zentrale Initiatorcaspase nach ER-Stress sein. In Individuen kaukasischen und asiatischen Ursprungs ist im *Caspase-12*-Gen durch einen Nukleotidaustausch ein Stopcodon in Exon 4 entstanden, wodurch ein verkürztes und funktionell inaktives Protein generiert wird. Nur Menschen afrikanischen Ursprungs exprimieren das vollständige Caspase-12-Protein, dass allerdings ebenfalls katalytisch inaktiv ist (Saleh *et al.*, 2004). In aktuellen Publikationen konnte außerdem gezeigt werden, dass auch in der Ratte aktive Caspase-12 nur sich selbst, jedoch keine anderen Caspasen oder Substrate prozessieren kann (Roy *et al.*, 2008).

Caspase-4, die 48% Homologie zu Caspase-12 aufweist, war ebenfalls eine Caspase, von der man annahm, dass sie sowohl im humanen als auch im murinen System eine entscheidende Rolle während ER-Stress-induzierter Apoptose spielen könnte. Doch sowohl für Caspase-12 als auch für Caspase-4 konnte gezeigt werden, dass auch in ihrer Abwesenheit in Zellen Apoptose nach Behandlung mit ER-Stress-induzierenden Reagenzien eingeleitet wird (Obeng und Boise, 2005). Welche Caspase für die Apoptoseinduktion verantwortlich ist, ist demnach bislang ungeklärt.

ER-Stress-induzierte Apoptose bzw. ihre Fehlregulation ist ein zentraler Mechanismus, der an der Entstehung verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer (Delepine *et al.*, 2000; Hoozemans *et al.*, 2005; Unterberger *et a*., 2006), aber auch an der Genese des Diabetes mellitus (Delepine *et al.*, 2000) beteiligt ist. Ein besseres Verständnis dieses zellulären Vorgangs ist daher von enormer medizinischer Bedeutung. Es wird dazu beitragen, die damit assoziierten Erkrankungen genauer charakterisieren zu können und neue Behandlungskonzepte zu erstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die Rolle von Caspasen und besonders von Caspase-9 während ER-Stress-induzierter Apoptose eingehend untersucht. Caspase-9 ist die zentrale Initiatorcaspase des intrinsischen Apoptosesignalweges. Sie wird durch einen multimeren Apaf-1- und Cytochrom c-enthaltenden Komplex, das sogenannte Apoptosom, aktiviert. Mit Hilfe muriner embryonaler Fibroblasten (MEF), in denen das Caspase-9-Gen spezifisch deletiert ist, und Caspase-9-defizienter humaner Jurkat-T-Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass diese Caspase sowohl in der Maus als auch im Menschen der zentrale Regulator ER-Stress-induzierter Apoptose ist. Zellen ohne Caspase-9 zeigten selbst 72 h nach Behandlung mit den ER-Stress-induzierenden Reagenzien Thapsigargin, Brefeldin A und Tunicamycin weder DNA-Fragmentierung noch einen Verlust der Plasmamembranintegrität. Die Zellen waren also gegen Apoptose und andere Arten des Zelltodes protektiert.

In Caspase-9-defizienten MEFs waren weiterhin kein Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials und außerdem nur eine geringe Freisetzung von Cytochrom c nach Behandlung mit ER-Stress-induzierenden Reagenzien detektierbar. Caspase-9 agiert im Signalweg unterhalb der Mitochondrien, weshalb man trotz fehlender Caspase-9-Expression eine Induktion dieser beiden Apoptose-typischen Veränderungen der Mitochondrien erwarten würde. Da sie jedoch in Caspase-9-defizienten Zellen nicht nachweisbar sind, liegt die Vermutung nahe, dass Caspase-9 wahrscheinlich durch Aktivierung von Caspase-3 zu einer Signalverstärkung führt (Lakhani *et al.*, 2006). Die initial schwache Freisetzung von Cytochrom c führt zur Aktivierung von Caspase-9, wodurch wiederum Caspase-3 gespalten wird. Aktive Caspase-3 könnte dann durch Spaltung mitochondrialer Substrate (Ricci *et al.*, 2003) die Freisetzung von Cytochrom c und somit das apoptotische Signal verstärken. Dadurch könnte dann wiederum mehr Caspase-9 aktiviert werden. Wird Caspase-9, wie in den verwendeten MEFs, nicht exprimiert, so kann Caspase-3 nicht aktiviert werden, wodurch es zu keiner postmitochondrialen Amplifikation des apoptotischen Signals und damit lediglich zu einer verringerten Freisetzung von Cytochrom c kommt.

Auch die Aktivierung von Effektorcaspasen kann weder in Caspase-9^{-/-}-MEFs noch in Caspase-9-defizienten Jurkat-T-Lymphozyten detektiert werden. Das bedeutet, dass Caspase-9 vermutlich die einzige Initiatorcaspase ist, die nach ER-Stress die Aktivierung von Effektorcaspasen und somit die Induktion von Apoptose bedingt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die Aktivierung von Caspase-9 nicht, wie ursprünglich angenommen (Morishima *et al.*, 2002), an eine ER-Stress-spezifische Caspase-Kaskade gekoppelt ist, da nach ER-Stress keine Effektorcaspase-Aktivität in Caspase-9^{-/-}

MEFs detektiert werden konnte. Somit ist keine andere Caspase-Kaskade aktiv, die die Aktivierung von Caspase-3 und die Induktion von Apoptose bedingt.

Alle Experimente wurden auch in Apaf-1-defizienten Mausfibroblasten durchgeführt. Apaf-1 ist, wie bereits erwähnt, eine der zentralen Komponenten des Apoptosoms, das im intrinsischen Apoptoseweg für die Aktivierung von Caspase-9 verantwortlich ist. Zellen ohne Apaf-1-Expression wiesen, genau wie Caspase-9^{-/-}-MEFs, weder Caspase-Aktivierung noch DNA-Fragmentierung auf. Beide Komponenten des intrinsischen Apoptosesignalweges sind so entscheidend für die Induktion von Zelltod nach ER-Stress, dass ihr Fehlen Zellen auch nach Langzeitbehandlung einen Überlebensvorteil verleiht. Caspase-9- und Apaf-1-defiziente MEFs konnten nach Thapsigargin-Behandlung weiter proliferieren und sind somit noch vital.

Auch für Caspase-2 wurde eine wichtige Rolle während ER-Stress-induzierter Apoptose beschrieben (Dahmer, 2005). Caspase-9-defiziente Jurkat-T-Lymphozyten zeigten, nach Thapsigargin-Behandlung, keine Caspase-2-Aktivierung. Es ist daher denkbar, dass der protektive Effekt, der nach Verlust der Caspase-9-Expression beobachtet wurde, auf die fehlende Caspase-2-Aktivierung in diesen Zellen zurückzuführen ist.

Um dies zu untersuchen, wurden embryonale Fibroblasten von Mäusen, in denen das *Caspase-2*-Gen spezifisch deletiert ist, verwendet. Erste Experimente deuteten darauf hin, dass Caspase-2 tatsächlich in die Induktion von Apoptose nach ER-Stress involviert ist. Caspase-2^{-/-}-MEFs wiesen, wie Caspase-9^{-/-}-MEFs, bis zu 72 h nach Behandlung mit ER-Stress-induzierenden Reagenzien keine DNA-Fragmentierung auf. Auch der Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials war in Zellen ohne Caspase-2 inhibiert.

Interessanterweise konnte dennoch auch in diesen Zellen die Freisetzung von Cytochrom c detektiert werden. Dies war überraschend, da beschrieben wurde, dass Caspase-2 im Signalweg oberhalb der Mitochondrien agieren würde und an der Freisetzung von Cytochrom c nach Chemotherapeutika-Behandlung maßgeblich beteiligt sei (Lassus *et al.*, 2002). Der zu Grunde liegende Mechanismus soll auf der Caspase-2-abhängigen Spaltung des *BH3-only Proteins* Bid basieren, welches dann, durch Interaktion, die Aktivierung von Bak und Bax ermöglichen würde (Guo *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2005). Dadurch käme es letztendlich zur Freisetzung von Cytochrom c und zur Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges.

Um dies genauer zu untersuchen, wurden Bid-defiziente MEFs verwendet. Würde der beschriebene Signalweg auch für ER-Stress-induzierende Reagenzien zu treffen, so wäre zu erwarten, dass Zellen ohne Bid-Expression resistent gegen ER-Stress-induzierte Apoptose sind. Allerdings zeigte sich, dass ER-Stress-induzierende Reagenzien in Bid^{-/-}-MEFs zu gleichen Prozentsätzen wie in WT Zellen Apoptose induzieren. Das bedeutet, dass weder

Bid noch seine Caspase-2-abhängige Spaltung eine wesentliche Rolle während ER-Stressinduzierter Apoptose spielen.

Warum also ist in Caspase-2-defizienten Zellen selbst 72 h nach Behandlung mit ER-Stressinduzierenden Reagenzien keine DNA-Fragmentierung detektierbar? Um dies zu klären, wurde die Induktion von Zelltod mittels Messung der Plasmamembranintegrität untersucht. Dabei zeigte sich, dass Caspase-2^{-/-}-MEFs zwar gegen apoptotische DNA-Fragmentierung, nicht aber gegen die Induktion von Zelltod protektiert sind. Auch in Caspase-2^{-/-}-MEFs wird Zelltod induziert, wenn auch nicht zu gleichen Prozentsätzen wie in WT Zellen. Auch in Langzeit-Experimenten zeigte sich, dass der Verlust von Caspase-2 Zellen nach Thapsigargin-Behandlung keinen Überlebensvorteil verleiht.

Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass Caspase-2 in der Caspase-Kaskade unterhalb von Caspase-9 agiert. Dies würde auch erklären, weshalb Caspase-2 in Caspase-9-defizienten Jurkat-T-Lymphozyten nicht aktiviert wurde. Caspase-9 kann in Zellen den Verlust von Caspase-2 kompensieren. Dafür spricht auch, dass Zellen ohne Caspase-2-Expression nach längeren Behandlungszeiträumen ebenfalls DNA-Fragmentierung aufweisen. Ferner wird auch Caspase-3 in diesen Zellen, im Vergleich zum Wildtyp allerdings verzögert, aktiviert. Die verzögerte Induktion von DNA-Fragmentierung in Caspase-2^{-/-}-MEFs lässt vermuten, dass diese Caspase zwar nicht essentiell für ER-Stress-induzierte Apoptose ist, jedoch an einer Verstärkung des Signals beteiligt ist.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse eindeutig, dass Caspase-9 der zentrale Mediator ER-Stress-induzierter Apoptose ist. Weiterhin ist ihre Apoptosom-abhängige Aktivierung absolut essentiell, so dass die Aktivierung durch eine andere Signalkaskade endgültig ausgeschlossen werden kann. Caspase-2 hingegen spielt nur eine untergeordnete Rolle. Sie wird in der Signalkaskade unterhalb von Caspase-9 aktiviert und dient der Verstärkung des apoptotischen Signals. Ihr Verlust wird allerdings langfristig durch Caspase-9 kompensiert, so dass Zellen ohne Caspase-2-Expression lediglich verzögert Apoptose nach ER-Stress einleiten.

Es wurde beschrieben, dass neben Apoptose auch Autophagie nach Behandlung mit ER-Stress-induzierenden Reagenzien, eingeleitet werden kann (Yorimitsu et al., 2006). Besonders in Apoptose-inkompetenten Zellen ist dies von großer Bedeutung, weil Autophagie einen alternativen Zelltod bedingen kann. Es wurde gezeigt, dass der Verlust von Apaf-1 in Neuronen während der embryonalen Entwicklung und nach Verletzungen, durch Induktion von autophagischem Zelltod kompensiert wird (Oppenheim et al., 2008). Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Inhibition von Caspasen in Mammakarzinom-Zellen während einer Radionuklidtherapie, zur Induktion von autophagischem Zelltod führt (Cao et al., 2006). Andererseits könnte die Induktion von

96

Autophagie durch Aufrechterhaltung der Energie- und Nährstoffversorgung, auch am Überleben Apoptose-inkompetenter Zellen beteiligt sein (Ogata *et al.*, 2006). Aktuellen Publikationen zufolge führt die Inhibition von Caspasen durch z-VAD-fmk nur zur Induktion von Nekrose, wenn gleichzeitig Autophagie inhibiert wurde. Zellen, in denen Autophagie induziert wird, überlebten dagegen (Wu *et al.*, 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in den Caspase-9- und Apaf-1defizienten MEFs nach Behandlung mit ER-Stress-induzierenden Reagenzien Autophagie induziert wird. In WT Zellen wird dagegen Apoptose eingeleitet. Deshalb kann die Induktion von Autophagie in diesen Zellen nur nach Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh beobachtet werden. Auf Grund der Tatsache, dass sowohl Caspase-9^{-/-}-und Apaf-1^{-/-}-MEFs als auch WT Zellen die mit Q-VD-OPh versetzt wurden, die Behandlung mit ER-Stressinduzierenden Reagenzien überleben und sogar zum Teil die Proliferation wieder aufnehmen können, liegt die Vermutung nahe, dass Autophagie hier eine eher protektive Funktion ausübt. Durch Abbau zellulärer Materialen kann die Energie- und Nährstoffversorgung von Zellen auch während eines Translationsstopps, wie er nach ER-Stress durch die UPR induziert wird, aufrechterhalten werden.

5.3 Bei fehlender Expression der Bcl-2-Proteine Bak und Bax führt Thapsigargin-Behandlung zu nekrotischem Zelltod

ER-Stress-induzierte Apoptose durch intrinsischen. wird den mitochondrialen Apoptosesignalweg vermittelt. Dieser Signaltransduktionsweg wird durch die Familie der Bcl-2-Proteine reguliert, die sich in pro- und antiapoptotische Mitglieder teilt. Eine Überexpression antiapoptotischer Bcl-2-Proteine ist ein häufiger Befund bei humanen Tumoren und korreliert hier mit einer Resistenz gegen Chemotherapeutika, die Apoptose über den Mitochondrien-vermittelten Signalweg induzieren. Dagegen ist die Expression proapoptotischer Mitglieder dieser Familie, wie z.B. den Multidomänenproteinen Bax und Bak, in Malignomen oft erniedrigt. Verringerte oder fehlende Bak/Bax-Expression führt ebenfalls zu Chemoresistenz von Tumoren. Aufgrund der im Wesentlichen redundanten Funktion der beiden Proteine wurde dieser Zusammenhang erst im Modell der doppelten "Knockout"-Maus deutlich: Während Bax- oder Bak-Einzel-knockout-Mäuse keinen Phänotyp zeigten, der auf Apoptosedefekte hinwies, sind Bax/Bak-Doppel-knockout-Mäuse durch multiple Defekte in Entwicklungs-assoziierter Apoptose gekennzeichnet, die mit einer hohen perinatalen Sterblichkeit verbunden sind. Überlebende Mäuse weisen, bedingt durch zu geringe Zelltodraten, außerdem eine fehlerhafte Gewebehomöostase auf. Bax/Bak-defiziente Zellen, die aus Embryonen dieser Mäuse gewonnen wurden, waren hoch resistent gegen eine Vielzahl getesteter Chemotherapeutika, wie z.B. Taxol, Etoposid oder Doxorubicin (Lindsten *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2001; Janssen *et al.*, 2007).

Einigen Publikationen zufolge wird vermutet, dass die proapoptotischen Proteine Bak und Bax auch an der Induktion von Apoptose nach ER-Stress beteiligt sind (Wei *et al.*, 2001; Hetz *et al.*, 2006). Ferner wurde beobachtet, dass der Verlust beider Proteine nicht nur die Einleitung von Apoptose, sondern die UPR beeinträchtigt. Dafür soll die Interaktion von Bak und Bax mit der zytosolischen Domäne des ER-Membranrezeptors IRE1 verantwortlich sein.

In Bak/Bax-defizienten Zellen wird der ER-Membranrezeptor nicht mehr aktiviert und die Übertragung des apoptotischen Signals vom ER auf die Mitochondrien ist gestört. Damit wird die Resistenz Bak/Bax^{-/-}-Zellen gegenüber ER-Stress-vermittelter Apoptose erklärt (Hetz *et al.*, 2006). Der wesentliche Teil der Experimente wurde allerdings lediglich mit dem N-Glykosylierungsinhibitor Tunicamycin durchgeführt. Ferner wurde vorwiegend Apoptose und nicht andere Arten des Zelltodes untersucht. Auch ein Inhibitor der SERCA-Pumpe, Thapsigargin, ist in der Lage ER-Stress zu induzieren. Mechanistisch unterscheiden sich die beiden Reagenzien, dennoch ging man bislang davon aus, dass ihre zellulären Auswirkungen ähnlich sind.

Um zu überprüfen, ob der Verlust von proapoptotischem Bak und Bax tatsächlich gegenüber ER-Stress-induziertem Zelltod protektiert, wurden in dieser Arbeit embryonale Fibroblasten von Mäusen, in denen das Bak- und Bax-Gen spezifisch deletiert ist, verwendet. Erste Experimente bestätigten, dass diese Zellen im Vergleich zu WT MEFs tatsächlich gegenüber Tunicamycin resistent waren. Thapsigargin hingegen führte zur massiven Induktion von Zelltod auch in Zellen denen Bak und Bax fehlten. Ferner bedingte der Verlust der proapoptotischen Bcl-2-Proteine nur nach Tunicamycin-, nicht aber nach Thapsigargin-Überlebensvorteil. Behandlung einen langfristigen Bereits aus den ersten durchflusszytometrischen Untersuchungen konnte man schließen, dass zwar beide Reagenzien zur Einleitung der UPR führen, sich jedoch in ihrem Wirkungsmechanismus, zumindest in Bak/Bax^{-/-}-MEFs, unterscheiden. Im Gegensatz zu Tunicamycin induzierte Thapsigargin auch in der Abwesenheit von Bak und Bax Zelltod.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde weiterhin untersucht, ob Caspasen in Bak/Bax-defizienten Zellen nach Behandlung mit Thapsigargin oder Tunicamycin aktiviert werden. Durch den Einsatz des Caspase-Inhibitors Q-VD-OPh wurde außerdem überprüft, ob der in den Bak/Bax^{-/-}-MEFs detektierte Zelltod Caspase-abhängig ist. Interessanterweise zeigte sich, dass Caspasen zwar in beiden Zelllinien aktiviert werden, sie allerdings nur in WT MEFs, jedoch nicht in Zellen ohne Bak und Bax eine Rolle während der Induktion von Zelltod nach ER-Stress spielen. In Bak/Bax^{-/-}-MEFs handelt es sich nicht wie in WT Zellen um Apoptose, sondern um eine Caspase-unabhängige Form des Zelltodes.

98

Dadurch könnte auch der beobachtete Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials und die Freisetzung von Cytochrom c in Bak/Bax^{-/-}-MEFs erklärt werden. Eigentlich ist diese Beobachtung erstaunlich, da die Poren, die nach Induktion von Apoptose durch Oligomerisierung von Bak und Bax gebildet werden, bislang der einzige, bekannte Mechanismus zur Freisetzung von Cytochrom c ist (Korsmeyer et al., 2000; Shimizu et al., 1999). Da es sich in den Bak/Bax^{-/-}-MEFs jedoch wahrscheinlich nicht um apoptotischen Zelltod handelt, werden beide eigentlich Apoptose-typischen Merkmale vermutlich noch durch einen anderen, Bak- und Bax-unabhängigen Mechanismus ausgelöst. Sowohl die Freisetzung von Cytochrom С als auch Verlust des mitochondrialen der Transmembranpotentials konnte nach Tunicamycin-Behandlung nur in den WT, nicht aber in Bak/Bax^{-/-}-MEFs, beobachtet werden.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse deutlich, dass Tunicamycin und Thapsigargin zwar beide ER-Stress induzieren, sich allerdings in ihrer Wirkungsweise und ihrem Potential Zelltod einzuleiten unterscheiden. Während Tunicamycin in Zellen ausschließlich Apoptose induziert, scheint Thapsigargin in Bak/Bax^{-/-}-Zellen eine andere Form des Zelltodes auszulösen. Dagegen sind diese Zellen gegen Tunicamycin protektiert. Ein Grund für diese Unterschiede ist vermutlich die Tatsache, dass Thapsigargin, durch Inhibition der SERCA-Pumpe, neben der Induktion der UPR, zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration ([nM] \rightarrow [mM]) führt. Dauerhaft hohe Ca²⁺-Konzentrationen bedingen bereits alleine die Induktion von Zelltod (Tombal *et al.*, 2000).

Das Potential Bak/Bax^{-/-}-MEFs abzutöten resultiert demnach sehr wahrscheinlich aus dem Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER-Lumen. Dies würde auch den Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials und die Freisetzung von Cytochrom c in Bak/Bax^{-/-}-Zellen erklären: Auf Grund der Aktivität des in der Mitochondrienmembran lokalisiertem Na⁺/Ca²⁺-Ionenaustauschers akkumulieren hohe Ca²⁺-Konzentration in der mitochondriale Matrix, wodurch es zur Öffnung der MPT (mitochondrial permeability transition)-Pore in der inneren Mitochondrienmembran kommt. Durch diese Öffnung gelangen lösliche Substanzen (≤ 1,5 kDa) und Wasser in die Matrix. Sowohl in WT als auch in Bak/Bax^{-/-}-MEFs führt dies zunächst zum Anschwellen der mitochondrialen Matrix und später zum Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta \Psi_m$). In WT Zellen kann ein Zerreißen der äußeren Mitochondrienmembran auf Grund zu starker Anschwellung und Ausdehnung der Matrix wahrscheinlich durch die Oligomerisierung von Bak und Bax und der dabei in der äußeren Mitochondrienmembran entstehenden Poren verhindert werden. Durch sie kann sowohl Ca²⁺ als auch Wasser zurück ins Zytoplasma fließen (Dong *et al.*, 2006). Dadurch bleiben die Mitochondrien intakt und Apoptose wird durch Aktivierung des intrinsischen Signalweges induziert.

Bak/Bax^{-/-}-Zellen gehen dagegen nekrotisch zugrunde, weil die vollständige Zerstörung der Form Die Mitochondrien eine regulierte des Zelltodes nicht mehr zulässt. elektronenmikroskopischen Aufnahmen unterstützen diese Hypothese. Dort zeigt sich, dass die Bak/Bax^{-/-}-MEFs Nekrose-typische Merkmale aufweisen. Die Zellen sind entweder stark angeschwollen oder bereits geplatzt, was man anhand der zerstörten Plasmamembran erkennen kann. Ein Großteil der Mitochondrien der Bak/Bax-defizienten Zellen ist nicht mehr intakt. Ursache dieser nekrotischen Veränderungen kann, neben dem mechanischem Zerreißen der äußeren Mitochondrienmembran durch den Einstrom von Wasser in die mitochondriale Matrix, auch eine Ca²⁺-vermittelte Aktivierung von Hydrolasen, wie z.B. Phospholipase A2 (PLA2) oder C (PLC) sein. Diese Enzyme schädigen sowohl Plasma- als auch Mitochondrienmembranen.

Die WT-Zellen weisen hingegen Apoptose-typische Merkmale wie Chromatin-Kondensation auf. Jedoch ist auch in Zellen, denen die beiden proapoptotischen Proteine fehlen, DNA-Fragmentierung detektierbar. In Bak/Bax^{-/-}-MEFs ist diese größtenteils Caspase-unabhängig und lässt sich ebenfalls durch den Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER-Lumen erklären. Durch erhöhte Ca²⁺-Konzentrationen werden Ca²⁺-abhängige Endonukleasen aktiviert, die vermutlich auch für die Spaltung von DNA nach Thapsigargin-Behandlung verantwortlich sind (Dong *et al.*, 2006). Das könnte auch erklären, warum in Bak/Bax^{-/-}-Zellen DNA-Fragmentierung nur geringfügig durch Inhibition von Caspasen reduziert werden kann. Lediglich die Behandlung mit dem zellpermeablen Ca²⁺-Chelator BAPTA-AM bedingt in Bak/Bax^{-/-}-MEFs sowohl die Reduktion von DNA-Fragmentierung als auch eine Inhibition von Zelltod. Dadurch wird die Hypothese, dass die erhöhte Ca²⁺-Konzentration für die Induktion von Zelltod in den Bak/Bax^{-/-}-MEFs verantwortlich ist, weiter unterstützt.

Zusammengefasst verdeutlichen diese Untersuchungen, dass Thapsigargin auch in Zellen, denen die proapoptotischen Proteine Bak und Bax fehlen, Zelltod induzieren kann. Diese Untersuchungen unterstreichen das therapeutische Potential des Reagenzes. Schon seit längerem wird ein Einsatz bei Androgen-unabhängigem Prostatakrebs untersucht und diskutiert (Furuya *et al.*, 1994). Thapsigargin hat nicht nur den Vorteil, dass es hochspezifisch in sehr geringen Konzentrationen (IC₅₀= 30 nM) wirkt, sondern auch nicht proliferierende Zellen tötet (Thastrup *et al.*, 1990; Isaacs, 2005).

Thapsigargin wirkt nicht Zelltyp-spezifisch, weshalb eine systemische Verabreichung hoch toxisch wäre. Denmeade *et al.* (2003) haben jedoch einen eleganten Lösungsansatz gefunden: Eine inaktive Proform von Thapsigargin wurde an ein Transportpeptid gekoppelt. Das Reagenz kann nur nach Freisetzung durch proteolytische Spaltung in Zellen gelangen. Das entwickelte Transportpeptid wird spezifisch von der Serinprotease PSA (Prostataspezifisches Antigen), die an der Oberfläche aller Prostatakrebszellen exprimiert wird, prozessiert. Die Protease spaltet das Peptid und aktiviert den Vorläufer, wodurch

Thapsigargin nur im extrazellulären Bereich von Prostatazellen, nicht aber im Blutstrom, aktiv ist.

Solche Therapieansätze und die Tatsache, dass Thapsigargin ein sehr wirksames Reagenz ist, könnten auch den Einsatz in der Bekämpfung anderer Krebsarten ermöglichen. Im Gegensatz zu gängigen Chemotherapeutika (Rampino *et al.*, 1997; Kondo *et al.*, 2000) wird das Wirkungsspektrum nicht durch den Verlust der Expression oder der Aktivität von Bak und Bax eingeschränkt. Auch in Bak/Bax^{-/-}-Zellen wird Zelltod induziert. Weiterhin sollte demnach auch die Überexpression von Bcl-2, die häufig in Tumoren zufinden ist und zu Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika-Behandlung führt (Hanahan und Weinberg, 2000), keinen Einfluss auf Thapsigargin-induzierten Zelltod haben.


6. Zusammenfassung

Die Wirksamkeit klassischer Chemotherapeutika, die in Zellen Apoptose auslösen, ist in hohem Maße abhängig von der Integrität der jeweiligen induzierten apoptotischen Signaltransduktionswege. Die Inaktivierung von Apoptose-induzierenden Signalwegen stellt jedoch einen entscheidenden Selektionsvorteil für maligne Tumore während der Genese dar. Daher sind Defekte wesentlicher Komponenten dieser Signaltransduktionswege ein häufiger Befund in humanen Tumoren und können zur Resistenz dieser Tumore gegen eine konventionelle Chemotherapie führen. Eine genaue Kenntnis der ablaufenden, molekularen Prozesse könnte zur Entwicklung spezifischer Strategien zur Umgehung von Tumorresistenzen genutzt werden. In der vorgelegten Arbeit wurden daher die zellulären Signaltransduktionsprozesse unter Behandlung mit Taxol und Thapsigargin untersucht.

6.1 Mechanismus des Taxol-induzierten Zelltodes

Taxol gehört zu den Mikrotubuli-interferierenden Chemotherapeutika und induziert Apoptose in Tumorzellen. Das Chemotherapeutikum wird daher seit längerer Zeit in der Behandlung von Ovarialkarzinomen, fortgeschrittenen Mammakarzinomen und fortgeschrittenen, nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (*non small cell lung cancer*, NSCLC) eingesetzt. Häufig wird eine Resistenz von Tumoren gegenüber Chemotherapeutika durch eine Fehlregulation apoptotischer Signalwege und der beteiligten Modulatoren bedingt. Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, den Mechanismus der Taxol-induzierten Apoptose aufzuklären und zentrale Komponenten zu identifizieren. Dazu wurden Modellsysteme verwendet, in denen apoptotische Schlüsselproteine auf Grund spezifischer Gen-Deletionen nicht mehr exprimiert werden.

Früherer Studien liessen vermuten, dass Taxol-induzierte Apoptose Caspase-10-abhängig sei. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch mit Hilfe verschiedener zellulärer Modellsysteme, in denen Caspase-10 nicht exprimiert wird, eindeutig nachgewiesen werden, dass Taxol Apoptose unabhängig von Caspase-10 induziert. Mit Hilfe durchflusszytometrischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Zellen, trotz fehlender Caspase-10-Expression, nach Taxol-Behandlung charakteristische Apoptose-Merkmale wie z.B. DNA-Fragmentierung, die Exposition von Phosphatidylserin und den Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials aufwiesen. Auch Caspase-10defiziente MCF-7 Mammakarzinomzellen wurden durch Taxol-Behandlung effizient eliminiert. Eine Rekonstitution dieser Zellen mit Caspase-10 erhöhte die Sensitivität für Taxol nicht weiter.

Für die Aktivierung von Caspase-10 und ihrem funktionellen Homolog, der Caspase-8, ist das Adapterprotein FADD erforderlich. FADD- und Caspase-8-defiziente Jurkat-T-Lymphozyten waren jedoch ebenso sensitiv für Taxol wie Wildtyp (WT) Zellen. Auch wiesen diese Zellen nach Taxol-Behandlung apoptotische Charakteristika auf. Mittels Western Blot-Analysen konnte eine Aktivierung von Caspase-3 nachgeweisen werden, die kennzeichnend für die Effektorphase der Apoptose ist. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass der extrinsische Apoptosesignalweg und seine zentralen Modulatoren, Caspase-10 bzw. -8 und FADD, keinen Einfluss auf die Induktion von Zelltod nach Taxol-Behandlung haben.

Die hier durchgeführten Untersuchungen ergaben hingegen, dass Taxol-vermittelte Apoptose über den intrinsischen Signalweg verläuft. Caspase-9 konnte als zentraler Regulator Taxol-induzierter Apoptose identifiziert werden. Zelluläre Modelle, denen die Caspase-9-Expression fehlte, waren resistent gegen Taxol. In durchflusszytometrischen Untersuchungen wiesen diese Zellen nach Behandlung mit dem Chemotherapeutikum weder DNA-Fragmentierung noch einen Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials oder Phosphatidylserin-Exposition auf. Auch die Aktivierung der Effektorcaspase-3 konnte in Zellen ohne Caspase-9-Expression nicht detektiert werden. Caspase-9 wird nach Induktion des intrinsischen Signalweges im Apoptosom aktiviert. Eine der zentralen Komponenten des Apoptosoms ist Apaf-1. Auch Apaf-1-defiziente Zellen waren in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen resistent gegenüber Taxol. Dies bestätigt die zentrale Rolle der Caspase-9 im Taxol-vermittelten Signaltransduktionsweg. Obwohl fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass nach Taxol-Behandlung auch in Apaf-1- und Caspase-9-defizienten Zellen die charakteristische Bildung multipolarer Spindeln zu beobachten war, konnte Zelltod, in Abwesenheit der beiden zentralen Apoptosemodulatoren, nicht induziert werden. Klonogenitäts-Tests zeigten außerdem, dass Apaf-1^{-/-}-und Caspase-9^{-/-}-MEFs eine Behandlung mit Taxol nicht nur überlebten, sondern sogar die Proliferation wieder aufnehmen konnten. Dies zeigt, dass eine Inaktivierung von Caspasen ausreichend ist, um Tumoren einen Überlebensvorteil unter Chemotherapie mit Taxol zu verleihen.

Die entscheidende Bedeutung des intrinsischen Apoptosesignalweges für Taxol-vermittelte Apoptose konnte hier auf Grund einer Regulation des induzierten Zelltodes durch Proteine der Bcl-2-Familie bestätigt werden. Die Familie der Bcl-2-Proteine teilt sich in pro- und antiapoptotische Mitglieder, die die Freisetzung apoptogener Substanzen wie z.B. Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien, regulieren. Bisher nahm man an, dass die proapoptotischen Bcl-2-Proteine Bak und Bax hierbei redundante Funktionen übernehmen. Während Taxol-induzierter Apoptose zeigte sich jedoch, dass Zellen ohne Bak-Expression sehr sensitiv auf eine Taxol-Behandlung reagierten, während Bax-defiziente Zellen partiell protektiert waren. Dies konnte in durchflusszytometrischen Untersuchungen des induzierten Zelltodes, der DNA-Fragmentierung sowie der Reduktion des mitochondrialen Transmembranpotentials, insbesondere nach Behandlung mit niedrigen Taxol-Konzentrationen, nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Bak-defizienten oder WT Zellen konnten Bax-defiziente Zellen nach kurzzeitiger Taxolbehandlung außerdem die Proliferation wieder aufnehmen. Dies macht deutlich, dass Taxol Apoptose über einen Bax-kontrollierten Signalweg induziert, der durch Bak nicht vollständig kompensiert werden kann.

Bak und Bax werden durch *BH3-only Proteine* der Bcl-2-Familie aktiviert. Dazu gehört Bim, das unter physiologischen Bedingungen mit den Mikrotubuli assoziiert ist und erst nach Apoptoseinduktion aus dieser Bindung freigesetzt wird. In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch eine fehlende Expression von Bim Zellen partiell vor Taxolinduzierter Apoptose protektiert. Bim und Bax sind daher wichtige Komponenten des Signaltransduktionsweges, der nach Taxol-Behandlung zur Induktion von Zelltod führt.

6.2 ER-Stress-induzierte Apoptose ist abhängig von Caspase-9 und ihrer Aktivierung im Apoptosom

In eukaryontischen Zellen ist das endoplasmatische Retikulum (ER) der Ort an dem Transmembran- und sezernierte Proteine synthetisiert, in ihre native Konformation gefaltet, posttranslational modifiziert und schließlich zu ihrem endgültigem Bestimmungsort transportiert werden. Daher muss im ER ein Millieu aufrechterhalten werden, dass diese Prozesse optimal unterstützt. Wird dieses Millieu entscheidend verändert, z.B. wenn Calcium-Konzentrationen sich ändern, posttranslationale Modifikationsmechanismen gestört sind oder neu gebildete Proteine schneller in das ER-Lumen eindringen als sie prozessiert werden, so erzeugt dies eine Stresssituation für das ER. ER-Stress führt zur Induktion koordinierter Signaltransduktionswege, die unter dem Begriff *"unfolded protein response"* (UPR) zusammengefasst werden. Bei milden Stresssituationen dient die UPR der Wiederherstellung physiologischer Bedingungen im ER. Nach gravierender Störung der ER-Physiologie kann die UPR allerdings auch Apoptose durch noch nicht genau charakterisierte Signaltransduktionswege initiieren.

Frühen Studien zu Folge sollte eine am ER lokalisierte Caspase, Caspase-12, eine für ER-Stress spezifische Signalkaskade aktivieren. Dies konnte jedoch in neueren Studien nicht reproduziert werden. Es konnte hingegen gezeigt werden, dass murine Zellen ohne Caspase-12-Expression nicht gegen ER-Stress protektiert waren. Biochemische Studien demonstrierten außerdem, dass Caspase-12 eine auf Autoproteolyse beschränkte Aktivität aufweist und keine anderen Caspasen prozessiert. Im humanen System ist Caspase-12 funktionell inaktiv. Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass Caspase-12 eine wesentliche Rolle im ER-Stress-induziertem Zelltod spielt. Der tatsächlich verantwortliche Signaltransduktionsweg war daher noch unklar. Um den Mechanismus ER-Stress-induzierter Apoptose zu klären, wurden Zellmodelle eingesetzt, denen die Expression wichtiger Apoptoseregulatoren fehlt. In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass ER-Stress-induzierte Apoptose nicht, wie bisher angenommen, über eine ER-spezifische Caspase-Kaskade, sondern über den intrinsischen, mitochondrialen Signalweg vermittelt wird. Durch Experimente in zellulären Modellsystemen ohne Caspase-9-Expression wurde deutlich, dass diese Caspase der zentrale Initiator von Apoptose nach ER-Stress ist. Nach Behandlung mit ER-Stress-induzierenden Reagenzien wiesen sowohl humane als auch murine Caspase-9-defiziente Zellen in durchflusszytometrischen Untersuchungen keinerlei Apoptose-typische Veränderungen wie z.B. DNA-Fragmentierung, die Exposition von Phosphatidylserin oder den Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials auf. Dies traf auch auf Zellen zu, die auf Grund einer fehlenden Apaf-1-Expression kein Apoptosom ausbilden können. Daraus lässt sich folgern, dass Caspase-9 nach ER-Stress durch das Apoptosom und nicht durch eine ER-Stress-spezifische Caspase-Kaskade aktiviert wird. Biochemische Analysen der Caspase-Aktivität sowie Immunpräzipitationen aktivierter Caspasen demonstrierten außerdem, dass in Caspase-9- und Apaf-1-defizienten Zellen keine weitere Caspase-Aktivierung nach Behandlung mit ER-Stress-induzierenden Reagenzien nachweisbar ist.

Frühere Untersuchungen liessen vermuten, dass auch Caspase-2 eine Rolle bei der Induktion von Zelltod nach ER-Stress spielt. Durch Untersuchungen von Caspase-2defizienten Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass fehlende Caspase-2-Expression nicht vollständig gegen ER-Stress protektiert. Das Einsetzen des Zelltodes war jedoch im Vergleich zu WT Zellen deutlich verzögert. Es wurde vermutet, dass Caspase-2 nach ER-Stress Apoptose durch die aktivierende Spaltung des Substrates Bid, ein BH3-only Protein der Bcl-2-Familie, initiiert. Bid kann die proapoptotischen Proteine Bax und Bak vermutlich direkt aktivieren und so die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien verursachen. In Caspase-2^{-/-}-Zellen ist die Cytochrom c-Freisetzung nach ER-Stress jedoch nicht beeinträchtigt. Außerdem konnte hier gezeigt werden, dass Zellen, die kein Bid exprimieren, nicht gegen ER-Stress geschützt sind. Das Auftreten charakteristischer, biochemischer Merkmale der Apoptose ist in Caspase-2^{-/-}-Zellen verzögert. Enzymatische Tests demonstrierten, dass die Effektorcaspase-3 in Caspase-2-defizienten Zellen erst spät aktiviert wird. Auch DNA-Fragmentierung konnte in Caspase-2^{-/-}-MEFs erst nach viertägiger Behandlung nachgewiesen werden, während dies in WT Zellen bereits nach zwei Tagen zu detektieren war. Diese Ergebnisse deuten an, dass Caspase-2 einer an Amplifizierungsschleife der Caspase-9-vermittelten Apoptose beteiligt ist.

6.3 Bei fehlender Expression der Bcl-2-Proteine Bak und Bax führt Thapsigargin-Behandlung zu nekrotischem Zelltod

Gravierender ER-Stress, der nicht mehr behoben werden kann, führt, vergleichbar mit den meisten klassischen Chemotherapeutika, zur Induktion von Apoptose über den intrinsischen, mitochondrialen Signalweg. Die Transduktion des Signals über diesen Weg wird durch Mitglieder der Bcl-2-Familie reguliert, die sich aus pro- und antiapoptotischen Proteinen zusammensetzt. Sowohl eine Überexpression antiapoptotischer Proteine dieser Familie, wie z.B. Bcl-2, als auch eine reduzierte Expression proapoptotischer Faktoren, wie z.B. Bax und Bak, kann ursächlich an der Entstehung von Resistenzen von Tumoren gegen chemotherapeutische Behandlung beteiligt sein. Ziel dieser Arbeit war es daher zu überprüfen, ob diese Proteinfamilie auch bei der Apoptoseinduktion durch ER-Stress-induzierende Reagenzien eine wichtige Rolle spielt.

Es wurde bereits gezeigt, dass eine fehlende Expression von Bak und Bax Zellen vor der Induktion von Apoptose nach Behandlung mit Tunicamycin, einem Inhibitor der posttranslationalen Proteinglykosylierung, protektiert. Dies führte zu der Annahme, dass Bak/Bax^{-/-}-Zellen, die gegen die meisten Chemotherapeutika resistent sind, auch allgemein gegen ER-Stress-induzierende Agenzien protektiert sind.

In der hier vorgelegten Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass Bak/Bax^{-/-}-Zellen bei Behandlung mit Thapsigargin, einem spezifischen Inhibitor der ER SERCA-ATPasen, effizient eliminiert werden können. Die Aktivität der SERCA-ATPasen ist für die Aufrechterhaltung der ER-Ca²⁺-Homöostase von wesentlicher Bedeutung. Die Thapsigarginvermittelte Inhibition der SERCA-Pumpen bedingt den Ausstrom von Ca2+ aus dem ER-Lumen ins Zytoplasma. Durch Aufnahme von Ca²⁺ in die Mitochondrien wird dem lokalen Anstieg der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration entgegen gewirkt. Auf Grund der Aktivität des in der Mitochondrienmembran lokalisiertem Na⁺/Ca²⁺-Ionenaustauschers akkumulieren hohe Ca²⁺-Konzentration in der mitochondriale Matrix, wodurch es zur Öffnung der MPT (mitochondrial permeability transition)-Pore in der inneren Mitochondrienmembran kommt. Durch diese Öffnung gelangen lösliche Substanzen (\leq 1.5 kDa) und Wasser in die Matrix. Sowohl in WT als auch in Bak/Bax^{-/-}-MEFs führt dies zunächst zum Anschwellen der mitochondrialen Matrix und später zum Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta \Psi_m$). In WT Zellen kann ein Zerreißen der äußeren Mitochondrienmembran auf Grund zu starker Anschwellung und Ausdehnung der Matrix wahrscheinlich durch die Oligomerisierung von Bak und Bax und der dabei in der äußeren Mitochondrienmembran entstehenden Poren verhindert werden. Durch sie kann sowohl Ca²⁺ als auch Wasser zurück ins Zytoplasma fließen. Dadurch bleiben die Mitochondrien intakt und Apoptose wird durch Aktivierung des intrinsischen Signalweges induziert.

Bak/Bax^{-/-}-Zellen gehen dagegen nekrotisch zugrunde, weil die vollständige Zerstörung der Mitochondrien eine regulierte Form des Zelltodes nicht mehr zulässt.

Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten, dass die erhöhte zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentrationen in Bak/Bax^{-/-}-MEFs tatsächlich für die Induktion von Zelltod nach Thapsigargin-Behandlung verantwortlich ist. Zellen, die mit Thapsigargin und dem zellpermeablen Ca²⁺-Chelator BAPTA-AM behandelt wurden, zeigten eine erhöhte Überlebensrate.

Der Thapsigargin-induzierte Zelltod konnte nur in WT Zellen nicht jedoch in Bak/Baxdefizienten Zellen durch den Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh inhibiert werden. In Bak/Bax^{-/-}-MEFs induziert Thapsigargin daher einen Caspase-unabhängigen Zelltod. Eine morphologische Analyse dieser Zellen mittels Elektronenmikroskopie zeigte Anzeichen von akutem ER-Stress, wie z.B. einem erweitertem ER und dem Auftreten von Autophagosomen. Außerdem traten charakteristische Merkmale des nekrotischen Zelltodes, u.a. stark angeschwollene Mitochondrien und eine teilweise zerstörte Plasmamembran.

Bak/Bax^{-/-}-Zellen gehen nekrotisch zugrunde, weil die Zerstörung der Mitochondrien eine regulierte Form des Zelltodes nicht mehr zulässt. Ursache dieser nekrotischen Veränderungen kann, neben dem mechanischem Zerreißen der äußeren Mitochondrienmembran durch den Einstrom von Wasser in die Mitochondrienmatrix, auch eine Ca²⁺-vermittelte Aktivierung von Hydrolasen, wie z.B. Phospholipase A₂ (PLA₂) oder C (PLC) sein. Diese Enzyme schädigen sowohl Plasma- als auch Mitochondrienmembranen.

Obwohl sowohl Thapsigargin als auch Tunicamycin ER-Stress induzieren, unterscheiden sich folglich beide Substanzen deutlich in ihrer Abhängigkeit von Bak und Bax bei der Induktion des Zelltodes.



7. Summary

7.1 Mechanisms of taxol-induced cell death

Taxane derivatives such as taxol elicit their antitumor effects, at least in part, by induction of apoptosis, but the underlying mechanisms are incompletely understood. In this thesis, different cellular models with deficiencies in key regulators of apoptosis were employed to elucidate the molecular mechanism of taxol-induced cell death.

Apoptosis by taxol was previously reported to depend on the activation of the initiator caspase-10 in the death receptor-mediated extrinsic pathway. In this study, however, it could be demonstrated that taxol kills murine embryonic fibroblasts (MEFs) devoid of caspase-10 expression. Furthermore, human tumor cell lines deficient in caspase-10 or its functional homolog, caspase-8, were similarly sensitive towards taxol than wildtype cells. Even cells lacking the adapter protein FADD, that is crucial for the activation of both caspase-10 and -8, could be efficiently eliminated by taxol. Hence, taxol-induced cell death is clearly independent of the death receptor pathway.

In contrast, the lack of apaf-1 or caspase-9, key components of the apoptosome and regulators of the mitochondrial pathway, not only entirely protected against taxol-induced apoptosis, but could even confer clonogenic survival, depending on the cell type and drug concentration. Thus, taxol triggers apoptosis not through caspase-10, but via caspase-9 activation at the apoptosome.

This conclusion was further supported by the fact that taxol-induced apoptosis was regulated by Bcl-2 proteins, a family of pro- and antiapoptotic proteins controlling the release of apoptogenic factors, like cytochrome c, from the mitochondria in the intrinsic apoptotic pathway. Cells overexpressing antiapoptotic Bcl-2 or cells doubly deficient in the proapoptotic proteins Bak and Bax were entirely resistant to taxol-induced apoptosis. Interestingly, also the single knockout of Bax, but not that of Bak, conferred partial resistance, suggesting a particular role of Bax that has previously been assumed to be only a functionally redundant homolog of Bak. Furthermore, loss of the proapoptotic BH3-only Bcl-2 protein Bim partially protected cells from taxol-induced death. The proapoptotic Bim protein is normally sequestered by binding to microtubules. Upon stabilization of microtubules by taxol this binding is lost. Released Bim can then probably directly activate Bax and Bak to mediate apoptosis. In conclusion, these findings suggest a particular role of the Bcl-2 proteins Bim and Bax as mediators in the cell death pathway activated by taxol.

7.2 ER stress-induced apoptosis depends on caspase-9 and its activation by the apoptosome

In eukaryotic cells the endoplasmic reticulum (ER) is the site where secretory and transmembrane proteins are synthesized, folded into their native conformation, posttranslationally modified and delivered to their final destination. Therefore, the ER has to provide and maintain an optimal environment for protein folding and disulfide bond formation. The physiological state of the ER lumen can be perturbed, for instance, when the influx of nascent proteins exceeds the processing capacity, when posttranslational protein modification fails or when calcium concentrations are altered. ER stress like this activates coordinated signal transduction pathways collectively termed the unfolded protein response (UPR). The UPR restores ER homeostasis after mild insults. However, in response to severe stress the UPR can also trigger apoptosis.

The molecular mechanism underlying ER stress-induced apoptosis, however, is still largely unknown. Early studies suggested an activation of a caspase cascade by the ER localized caspase-12. More recent studies, however, could not reproduce this finding and demonstrated that murine cells devoid of caspase-12 expression were not resistant against ER-induced apoptosis. Caspase-12 of rodent origin was shown to be catalytically restricted to autoproteolysis and could not cleave any other caspase *in vitro*. Due to a single nucleotide polymorphism (SNP) humans express either a truncated version consisting only of the catalytically inactive prodomain of caspase-12 or, more rarely, a full length protein that seems to be also proteolytically inactive and does not sensitize to ER stress. A role of caspase-12 as in initiator caspase starting a caspase cascade in response to ER stress, therefore, seems to be unlikely.

Thus, to elucidate the mechanism of ER stress-induced cell death, cellular models lacking the expression of key apoptosis regulators were employed in this study. Murine embryonic fibroblasts devoid of caspase-9 expression, the key initiator caspase activated in the apoptosome in response to mitochondrially triggered apoptosis, were completely protected against various ER stress-inducing agents. Thapsigargin, an inhibitor of ER Ca²⁺ transporters, the SERCA ATPases, as well as tunicamycin, an inhibitor of posttranslational protein glycosylation and brefeldin A, an inhibitor of vesicle transport from the ER to the Golgi complex, all efficiently induced apoptotic cell death in the corresponding wildtype MEFs. The mode of death was confirmed to be apoptosis by flow cytometric detection of characteristical DNA fragmentation, decrease of the mitochondrial membrane potential and by detection of caspase activity employing a fluorescence-based approach using fluorescence-coupled caspase substrates. Consistently, similar results were obtained with apaf-1^{-/-}-MEFs, deficient in apoptosome formation. Compared to caspase-9^{-/-}-MEFs, cells devoid of apaf-1 expression

were equally resistant to ER stress mediated by thapsigargin, brefeldin A or tunicamycin. Deficiency in either caspase-9 or apaf-1 furthermore inhibited the release of cytochrome c from the mitochondria. Interestingly, no residual caspase activity could be measured in cells lacking caspase-9 or apaf-1 expression in response to ER stress, making it highly unlikely, that another caspase cascade could be involved. That these findings were not restricted only to murine cells could be demonstrated employing human Jurkat T cells deficient in caspase-9 expression and a respective reconstituted cell line. Similarly, caspase-9 deficient cells were not sensitive to ER stress-mediated apoptosis, whereas their reconstituted counterparts were efficiently killed. Importantly, by immunoprecipitation of active caspases employing a biotin conjugated substrate, it could be clearly demonstrated that the activation of other caspases was absolutely dependent on caspase-9. Therefore, in response to ER stress caspase-9 acts as the main initiator caspase. Furthermore, in contrast to a previous publication the results show that caspase-9 is not activated by another upstream caspase, but by the formation of the apoptosome. The lack of caspase-9 or apaf-1 even conferred clonogenic survival after exposure to the ER stress-inducing chemotherapeutic thapsigargin.

Previously, it has been assumed that caspase-2 might be involved in ER stress-induced apoptosis. However, as demonstrated here, the loss of caspase-2 only delayed death, but did not protect the cells. Furthermore, caspase-2 has been suggested to be involved in the release of cytochrome c from the mitochondria by cleavage-mediated activation of the proapoptotic BH3-only protein Bid. Nevertheless, cytochrome c release was not diminished in caspase-2^{-/-} cells compared to wildtype cells in response to ER stress. The occurrence of other biochemical traits of apoptosis like the decrease of the mitochondrial membrane potential or DNA fragmentation were clearly decelerated, but not prevented. Therefore, caspase-2 is probably involved in an amplification loop accelerating caspase-9-mediated apoptosis in response to ER stress.

7.3 Loss of the proapoptotic Bcl-2 proteins Bak and Bax alters the ER stress-induced mode of cell death from apoptosis to necrosis

Similar to classical chemotherapeutic treatment, severe ER stress that cannot be resolved leads to apoptosis by the intrinsic, mitochondrial pathway. Signal transduction via this pathway is closely regulated by members of the Bcl-2 family of proteins that includes proand antiapoptotic members. Overexpression of antiapoptic proteins of this family, like Bcl-2, as well as decreased expression of proapoptotic factors, like Bax and Bak, can be causally involved in the resistance of tumors to conventional chemotherapeutic agents.

Likewise, double knockout (DKO) cells from mice deficient in expression of Bak and Bax have been shown to be resistant to ER stress-mediated apoptosis induced by tunicamycin,

an inhibitor of N-linked glycosylation. This has led to the generalized assumption that Bak/Bax^{-/-} cells that are protected against a wide variety of stress stimuli activating the mitochondrial apoptotic pathway would be similarly resistant to different ER stress-inducing agents.

In this study, however, it could be demonstrated employing murine embryonic fibroblasts (MEFs) derived from Bak/Bax-DKO mice that Bak/Bax^{-/-} cells are, in contrast, efficiently killed by ER stress mediated by thapsigargin, a specific inhibitor of ER SERCA-pumps. Importantly, whereas calcium overload of mitochondria inflicted by thapsigargin treatment led to apoptosis induction in wildtype cells, Bak/Bax^{-/-} cells were killed by a caspase-independent cell death as could be confirmed by flow cytometric analysis of cell death in the presence of the caspase inhibitor Q-VD-OPh. Whereas this inhibitor clearly protected wildtype cells from thapsigargin-induced death, Bak/Bax^{-/-} cells were still efficiently eliminated. The observed decrease in the mitochondrial membrane potential of Bak/Bax^{-/-} cells was similarly not inhibitable by Q-VD-OPh and therefore also caspase-independent. Morphological analysis of these cells employing electron microscopy (EM) revealed signs of acute ER stress, like a dilated ER and the appearance of autophagosomes. Grossly swollen mitochondria, a clumped, but not condensed chromatin, and interruptions of the plasma membrane continuity indicated a necrotic cell death. This was apparently caused by an increase in intracellular Ca²⁺-levels, due to thapsigargin-mediated inhibition of the SERCA-ATPases because simultaneous treatment of the cells with thapsigargin and the Ca2+-chelator BAPTA-AM decreased the percentage of dead cells. In normal cells a large gradient of Ca²⁺ exists across the ER membrane, with concentrations reaching millimolar levels in the ER lumen and about 10.000 fold lower concentrations in the cytoplasm (10-100 nm). This gradient is maintained by the SERCA-ATPases that transport Ca²⁺ into the ER consuming ATP. Thapsigargin is a specific inhibitor of SERCA-pumps and elicits ER stress by a slow depletion of ER Ca²⁺levels. The subsequent elevation of cytoplasmic Ca²⁺-concentrations is buffered by a rapid mitochondrial Ca2+-uptake. If cytoplasmic Ca2+ elevation is lasting, the mitochondrial permeability transition pore (MPT) in the inner mitochondrial membrane is opened. The MPT allows the influx of solutes (< 1,5 kDa) and water and leads to the swelling of the mitochondrial matrix. Under severe stress this pore is permanent and can lead to either apoptotic or necrotic death by a mechanism that is not yet fully clarified. In the present study, thapsigargin induced apoptotic death in wildtype and necrotic death in cells that have no expression of Bak and Bax, indicating a decisive role of these proteins in apoptosis induction upon MPT triggering. Upon activation, Bak and Bax can oligomerize in the outer mitochondrial membrane and mediate the release of apoptogenic factors, like cytochrome c, from the intermembrane space probably by pore formation. This leads to the rapid execution of apoptosis. In Bak/Bax doubly deficient cells the formation of apoptogenic pores is

impaired, therefore apoptosis is blocked. The ensuing necrotic death could be due to (1) a rupture of the outer mitochondrial membrane due to excessive swelling of the matrix, and/or (2) an activation of hydrolases like phospholipase A_2 (PLA₂) or C (PLC), that deconstruct the plasmalemmal as well as the mitochondrial membranes. Measurements of the mitochondrial membrane potential, however, indicated that the loss of ATP production preceded the loss of plasma membrane integrity in Bak/Bax^{-/-} cells.

In contrast, Bak/Bax^{-/-} MEFs were completely protected from cell death induced by tunicamycin indicating that these two ER stress-inducing reagents activate different cell death signaling pathways. Concluding, thapsigargin-derived drugs might present powerful alternative tools to eliminate Bak/Bax-deficient tumors that are highly resistent to conventional chemotherapy.



8. Literaturverzeichnis

- Abraham, R. T., und Weiss, A. (2004). Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. Nat Rev Immunol *4*, 301-308.
- Alappat, E. C., Feig, C., Boyerinas, B., Volkland, J., Samuels, M., Murmann, A. E., Thorburn, A., Kidd, V. J., Slaughter, C. A., Osborn, S. L., Winoto, A., Tang, W. J., und Peter, M. E. (2005). Phosphorylation of FADD at serine 194 by CKlalpha regulates its nonapoptotic activities. Mol Cell *19*, 321-332.
- Alappat, E. C., Volkland, J., und Peter, M. E. (2003). Cell cycle effects by C-FADD depend on its C-terminal phosphorylation site. J Biol Chem 278, 41585-41588.
- Armstrong, R. C., Aja, T., Xiang, J., Gaur, S., Krebs, J. F., Hoang, K., Bai, X., Korsmeyer, S. J., Karanewsky, D. S., Fritz, L. C., und Tomaselli, K. J. (1996). Fas-induced activation of the cell death-related protease CPP32 Is inhibited by Bcl-2 and by ICE family protease inhibitors. J Biol Chem 271, 16850-16855.
- Bartsch, V. (2005). Assault on the mitotic spindle. The action mechanism of taxane. Pharm Unserer Zeit *34*, 104-108.
- Basu, A., und Haldar, S. (1998). Microtubule-damaging drugs triggered bcl2 phosphorylationrequirement of phosphorylation on both serine-70 and serine-87 residues of bcl2 protein. Int J Oncol *13*, 659-664.
- Baudhuin, P. (1966). Lysosomes and cellular autophagy. Brux Med 46, 1059-1070.
- Beneke, S., und Burkle, A. (2007). Poly(ADP-ribosyl)ation in mammalian ageing. Nucleic Acids Res 35, 7456-7465.
- Bergeron, L., Perez, G. I., Macdonald, G., Shi, L., Sun, Y., Jurisicova, A., Varmuza, S., Latham, K. E., Flaws, J. A., Salter, J. C., Hara, H., Moskowitz, M. A., Li, E., Greenberg, A., Tilly, J. L., und Yuan, J. (1998). Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. Genes Dev 12, 1304-1314.
- Bernales, S., McDonald, K. L., und Walter, P. (2006). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. PLoS Biol *4*, e423.
- Biswas, R. S., Cha, H. J., Hardwick, J. M., und Srivastava, R. K. (2001). Inhibition of druginduced Fas ligand transcription and apoptosis by Bcl-XL. Mol Cell Biochem 225, 7-20.
- Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D. C., Tarlinton, D. M., Kay, T. W., Kontgen, F., Adams, J. M., und Strasser, A. (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. Science 286, 1735-1738.
- Bouillet, P., Purton, J. F., Godfrey, D. I., Zhang, L. C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J. M., und Strasser, A. (2002). BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. Nature *415*, 922-926.
- Buytaert, E., Callewaert, G., Hendrickx, N., Scorrano, L., Hartmann, D., Missiaen, L., Vandenheede, J. R., Heirman, I., Grooten, J., und Agostinis, P. (2006a). Role of

endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. Faseb J 20, 756-758.

- Buytaert, E., Callewaert, G., Vandenheede, J. R., und Agostinis, P. (2006b). Deficiency in apoptotic effectors Bax and Bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum. Autophagy *2*, 238-240.
- Cao, C., Subhawong, T., Albert, J. M., Kim, K. W., Geng, L., Sekhar, K. R., Gi, Y. J., und Lu, B. (2006). Inhibition of mammalian target of rapamycin or apoptotic pathway induces autophagy and radiosensitizes PTEN null prostate cancer cells. Cancer Res 66, 10040-10047.
- Cecconi, F., Alvarez-Bolado, G., Meyer, B. I., Roth, K. A., und Gruss, P. (1998). Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. Cell *94*, 727-737.
- Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T. A., March, C. J., Kronheim, S. R., Druck, T., Cannizzaro, L. A., et al. (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. Science 256, 97-100.
- Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., Colman, P. M., Day, C. L., Adams, J. M., und Huang, D. C. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. Mol Cell *17*, 393-403.
- Cheung, H. H., Lynn Kelly, N., Liston, P., und Korneluk, R. G. (2006). Involvement of caspase-2 and caspase-9 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: a role for the IAPs. Exp Cell Res *312*, 2347-2357.
- Clarke, P. G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. Anat Embryol (Berl) *181*, 195-213.
- Colell, A., Ricci, J. E., Tait, S., Milasta, S., Maurer, U., Bouchier-Hayes, L., Fitzgerald, P., Guio-Carrion, A., Waterhouse, N. J., Li, C. W., Mari, B., Barbry, P., Newmeyer, D. D., Beere, H. M., und Green, D. R. (2007). GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. Cell *129*, 983-997.
- Compton, S. J., und Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. Anal Biochem *151*, 369-374.
- Cory, S., Huang, D. C., und Adams, J. M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. Oncogene 22, 8590-8607.
- Dahmer, M. K. (2005). Caspases-2, -3, and -7 are involved in thapsigargin-induced apoptosis of SH-SY5Y neuroblastoma cells. J Neurosci Res *80*, 576-583.
- Day, T. W., Najafi, F., Wu, C. H., und Safa, A. R. (2006). Cellular FLICE-like inhibitory protein (c-FLIP): a novel target for Taxol-induced apoptosis. Biochem Pharmacol *71*, 1551-1561.
- Delepine, M., Nicolino, M., Barrett, T., Golamaully, M., Lathrop, G. M., und Julier, C. (2000). EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. Nat Genet 25, 406-409.

- Deming, P. B., Schafer, Z. T., Tashker, J. S., Potts, M. B., Deshmukh, M., und Kornbluth, S. (2004). Bcr-Abl-mediated protection from apoptosis downstream of mitochondrial cytochrome c release. Mol Cell Biol 24, 10289-10299.
- Denmeade, S. R., Jakobsen, C. M., Janssen, S., Khan, S. R., Garrett, E. S., Lilja, H., Christensen, S. B., und Isaacs, J. T. (2003). Prostate-specific antigen-activated thapsigargin prodrug as targeted therapy for prostate cancer. J Natl Cancer Inst *95*, 990-1000.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., und Martinou, J. C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. J Cell Biol 144, 891-901.
- Deshmukh, M., Kuida, K., und Johnson, E. M., Jr. (2000). Caspase inhibition extends the commitment to neuronal death beyond cytochrome c release to the point of mitochondrial depolarization. J Cell Biol *150*, 131-143.
- Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J. M., und Venkatachalam, M. A. (2006). Calcium in cell injury and death. Annu Rev Pathol *1*, 405-434.
- Ekert, P. G., Read, S. H., Silke, J., Marsden, V. S., Kaufmann, H., Hawkins, C. J., Gerl, R., Kumar, S., und Vaux, D. L. (2004). Apaf-1 and caspase-9 accelerate apoptosis, but do not determine whether factor-deprived or drug-treated cells die. J Cell Biol 165, 835-842.
- Engels, I. H., Totzke, G., Fischer, U., Schulze-Osthoff, K., und Janicke, R. U. (2005). Caspase-10 sensitizes breast carcinoma cells to TRAIL-induced but not tumor necrosis factor-induced apoptosis in a caspase-3-dependent manner. Mol Cell Biol 25, 2808-2818.
- Ferri, K. F., und Kroemer, G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. Nat Cell Biol *3*, E255-263.
- Fingar, D. C., und Blenis, J. (2004). Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. Oncogene 23, 3151-3171.
- Fischer, U., Janicke, R. U., und Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. Cell Death Differ *10*, 76-100.
- Fischer, U., und Schulze-Osthoff, K. (2005). New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. Pharmacol Rev *57*, 187-215.
- Fischer, U., Janssen, K., und Schulze-Osthoff, K. (2007). Cutting-edge apoptosis-based therapeutics: a panacea for cancer? BioDrugs *21*, 273-297.
- Friesen, C., Herr, I., Krammer, P. H., und Debatin, K. M. (1996). Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. Nat Med 2, 574-577.
- Furuya, Y., Lundmo, P., Short, A. D., Gill, D. L., und Isaacs, J. T. (1994). The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgenindependent prostatic cancer cells induced by thapsigargin. Cancer Res 54, 6167-6175.

- Gao, Z., Shao, Y., und Jiang, X. (2005). Essential roles of the Bcl-2 family of proteins in caspase-2-induced apoptosis. J Biol Chem 280, 38271-38275.
- Garcia-Calvo, M., Peterson, E. P., Leiting, B., Ruel, R., Nicholson, D. W., und Thornberry, N. A. (1998). Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. J Biol Chem 273, 32608-32613.
- Giampietri, C., Petrungaro, S., Coluccia, P., Antonangeli, F., Paone, A., Padula, F., De Cesaris, P., Ziparo, E., und Filippini, A. (2006). c-Flip(L) is expressed in undifferentiated mouse male germ cells. FEBS Lett *580*, 6109-6114.
- Gillies, R. J., Didier, N., und Denton, M. (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. Anal Biochem *159*, 109-113.
- Gillissen, B., Essmann, F., Graupner, V., Starck, L., Radetzki, S., Dorken, B., Schulze-Osthoff, K., und Daniel, P. T. (2003). Induction of cell death by the BH3-only Bcl-2 homolog Nbk/Bik is mediated by an entirely Bax-dependent mitochondrial pathway. Embo J 22, 3580-3590.
- Gonzalez-Polo, R. A., Boya, P., Pauleau, A. L., Jalil, A., Larochette, N., Souquere, S., Eskelinen, E. L., Pierron, G., Saftig, P., und Kroemer, G. (2005). The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. J Cell Sci *118*, 3091-3102.
- Gozuacik, D., und Kimchi, A. (2007). Autophagy and cell death. Curr Top Dev Biol 78, 217-245.
- Green, K. A., Naylor, M. J., Lowe, E. T., Wang, P., Marshman, E., und Streuli, C. H. (2004). Caspase-mediated Cleavage of Insulin Receptor Substrate. J Biol Chem 279, 25149-25156.
- Gross, A., McDonnell, J. M., und Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Dev *13*, 1899-1911.
- Guo, Y., Srinivasula, S. M., Druilhe, A., Fernandes-Alnemri, T., und Alnemri, E. S. (2002). Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. J Biol Chem 277, 13430-13437.
- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G. S., Henderson, J. T., Woo, M., Soengas, M. S., Elia, A., de la Pompa, J. L., Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S. A., Lowe, S. W., Penninger, J. M., und Mak, T. W. (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. Cell *94*, 339-352.
- Haldar, S., Chintapalli, J., und Croce, C. M. (1996). Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. Cancer Res *56*, 1253-1255.

Hanahan, D., und Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. Cell 100, 57-70.

- Hazan, R., Levine, A., und Abeliovich, H. (2004). Benzoic acid, a weak organic acid food preservative, exerts specific effects on intracellular membrane trafficking pathways in Saccharomyces cerevisiae. Appl Environ Microbiol *70*, 4449-4457.
- Hetz, C., Bernasconi, P., Fisher, J., Lee, A. H., Bassik, M. C., Antonsson, B., Brandt, G. S., Iwakoshi, N. N., Schinzel, A., Glimcher, L. H., und Korsmeyer, S. J. (2006).
 Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. Science *312*, 572-576.

- Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y., und Tohyama, M. (2004). Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. J Cell Biol *165*, 347-356.
- Hoozemans, J. J., Veerhuis, R., Van Haastert, E. S., Rozemuller, J. M., Baas, F., Eikelenboom, P., und Scheper, W. (2005). The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol *110*, 165-172.
- Hoyer-Hansen, M., und Jaattela, M. (2007). Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. Cell Death Differ *14*, 1576-1582.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., und Ohsumi, Y. (2000). A ubiquitinlike system mediates protein lipidation. Nature 408, 488-492.
- Isaacs, J. T. (2005). New strategies for the medical treatment of prostate cancer. BJU Int 96 *Suppl 2*, 35-40.
- Itoh, N., und Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. J Biol Chem 268, 10932-10937.
- Janicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., und Porter, A. G. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. J Biol Chem 273, 9357-9360.
- Janssen, K., Pohlmann, S., Janicke, R. U., Schulze-Osthoff, K., und Fischer, U. (2007). Apaf-1 and caspase-9 deficiency prevents apoptosis in a Bax-controlled pathway and promotes clonogenic survival during paclitaxel treatment. Blood *110*, 3662-3672.
- Juo, P., Kuo, C.J., Yuan, J., und Blenis J. (1998) Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. Curr Biol *8*, 1001-1008.
- Juo, P., Woo, M.S., Kuo, C.J., Signorelli, P, Biemann, H.P., Hannun, Y.A und Blenis, J. (1999) FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas. Cell Growth Differ 10, 797-804.
- Kepp, O., Rajalingam, K., Kimmig, S., und Rudel, T. (2007). Bak and Bax are non-redundant during infection- and DNA damage-induced apoptosis. Embo J *26*, 825-834.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., und Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer *26*, 239-257.
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H. C., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., Hsieh, J. J., und Cheng, E. H. (2006). Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. Nat Cell Biol 8, 1348-1358.
- Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., und Ashkenazi, A. (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. J Biol Chem 276, 46639-46646.

- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., und Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. Dev Cell 5, 539-545.
- Knudson, C. M., Tung, K. S., Tourtellotte, W. G., Brown, G. A., und Korsmeyer, S. J. (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. Science *270*, 96-99.
- Kondo, S., Shinomura, Y., Miyazaki, Y., Kiyohara, T., Tsutsui, S., Kitamura, S., Nagasawa, Y., Nakahara, M., Kanayama, S., und Matsuzawa, Y. (2000). Mutations of the bak gene in human gastric and colorectal cancers. Cancer Res *60*, 4328-4330.
- Korsmeyer, S. J., Wei, M. C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K. J., und Schlesinger, P. H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. Cell Death Differ 7, 1166-1173.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M. J., Fenton, W., und Reed, J. C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. Cancer Res 53, 4701-4714.
- Krammer, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. Nature 407, 789-795.
- Krepela, E., Prochazka, J., Liul, X., Fiala, P., und Kinkor, Z. (2004). Increased expression of Apaf-1 and procaspase-3 and the functionality of intrinsic apoptosis apparatus in non-small cell lung carcinoma. Biol Chem *385*, 153-168.
- Krepela, E., Prochazka, J., Fiala, P., Zatloukal, P., und Selinger, P. (2006). Expression of apoptosome pathway-related transcripts in non-small cell lung cancer. J Cancer Res Clin Oncol *132*, 57-68.
- Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M. V., Malorni, W., Knight, R. A., Piacentini, M., Nagata, S., und Melino, G. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. Cell Death Differ *12 Suppl 2*, 1463-1467.
- Kuida, K., Haydar, T. F., Kuan, C. Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M. S., Rakic, P., und Flavell, R. A. (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. Cell 94, 325-337.
- Lakhani, S. A., Masud, A., Kuida, K., Porter, G. A., Jr., Booth, C. J., Mehal, W. Z., Inayat, I., und Flavell, R. A. (2006). Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. Science *311*, 847-851.
- Lassus, P., Opitz-Araya, X., und Lazebnik, Y. (2002). Requirement for caspase-2 in stressinduced apoptosis before mitochondrial permeabilization. Science *297*, 1352-1354.
- Lauber, K., Bohn, E., Krober, S. M., Xiao, Y. J., Blumenthal, S. G., Lindemann, R. K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., Xu, Y., Autenrieth, I. B., Schulze-Osthoff, K., Belka, C., Stuhler, G., und Wesselborg, S. (2003). Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. Cell *113*, 717-730.
- Leavitt, R., Schlesinger, S., und Kornfeld, S. (1977). Tunicamycin inhibits glycosylation and multiplication of Sindbis and vesicular stomatitis viruses. J Virol *21*, 375-385.

- Leistner, E. (2005). Drugs from nature. The biology of taxane Pharm Unserer Zeit 34, 98-103.
- Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S., und Korsmeyer, S. J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. Cancer Cell *2*, 183-192.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., und Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell *91*, 479-489.
- Li, R., Moudgil, T., Ross, H. J., und Hu, H. M. (2005). Apoptosis of non-small-cell lung cancer cell lines after paclitaxel treatment involves the BH3-only proapoptotic protein Bim. Cell Death Differ *12*, 292-303.
- Liang, X. H., Kleeman, L. K., Jiang, H. H., Gordon, G., Goldman, J. E., Berry, G., Herman, B., und Levine, B. (1998). Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. J Virol 72, 8586-8596.
- Lindsten, T., Ross, A. J., King, A., Zong, W. X., Rathmell, J. C., Shiels, H. A., Ulrich, E., Waymire, K. G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V. M., Adelman, D. M., Simon, M. C., Ma, A., Golden, J. A., Evan, G., Korsmeyer, S. J., MacGregor, G. R., und Thompson, C. B. (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. Mol Cell *6*, 1389-1399.
- Ling, Y. H., Tornos, C., und Perez-Soler, R. (1998). Phosphorylation of Bcl-2 is a marker of M phase events and not a determinant of apoptosis. J Biol Chem 273, 18984-18991.
- Lipp, H. P., und Bokemeyer, C. (2005). The action and toxicity of taxanes. Pharm Unserer Zeit *34*, 128-137.
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., und Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. Cell *86*, 147-157.
- Lum, J. J., Bauer, D. E., Kong, M., Harris, M. H., Li, C., Lindsten, T., und Thompson, C. B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. Cell *120*, 237-248.
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., und Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol *8*, 741-752.
- Majno, G., und Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol *146*, 3-15.
- Mancini, M., Machamer, C. E., Roy, S., Nicholson, D. W., Thornberry, N. A., Casciola-Rosen, L. A., und Rosen, A. (2000). Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. J Cell Biol *149*, 603-612.
- Marani, M., Tenev, T., Hancock, D., Downward, J., und Lemoine, N. R. (2002). Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. Mol Cell Biol 22, 3577-3589.

- Marsden, V. S., Ekert, P. G., Van Delft, M., Vaux, D. L., Adams, J. M., und Strasser, A. (2004). Bcl-2-regulated apoptosis and cytochrome c release can occur independently of both caspase-2 and caspase-9. J Cell Biol *165*, 775-780.
- Martinou, I., Desagher, S., Eskes, R., Antonsson, B., Andre, E., Fakan, S., und Martinou, J. C. (1999). The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event. J Cell Biol *144*, 883-889.
- McDowell, W., und Schwarz, R. T. (1988). Dissecting glycoprotein biosynthesis by the use of specific inhibitors. Biochimie *70*, 1535-1549.
- Misumi, Y., Misumi, Y., Miki, K., Takatsuki, A., Tamura, G., und Ikehara, Y. (1986). Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. J Biol Chem *261*, 11398-11403.
- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., und Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. J Cell Sci *116*, 1679-1688.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M., und Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. Nature *395*, 395-398.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhisa, T., Ohsumi, Y., und Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. J Cell Biol *152*, 657-668.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., und Yasuhiko, Y. (2002). An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome cindependent activation of caspase-9 by caspase-12. J Biol Chem 277, 34287-34294.
- Newmeyer, D. D., und Ferguson-Miller, S. (2003). Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. Cell *112*, 481-490.
- Newton, K., Harris, A. W., Bath, M. L., Smith, K. G., und Strasser, A. (1998). A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. Embo J *17*, 706-718.
- Nguyen, D. M., und Hussain, M. (2007). The role of the mitochondria in mediating cytotoxicity of anti-cancer therapies. J Bioenerg Biomembr *39*, 13-21.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., und Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J Immunol Methods *139*, 271-279.
- Obeng, E. A., und Boise, L. H. (2005). Caspase-12 and caspase-4 are not required for caspase-dependent endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. J Biol Chem 280, 29578-29587.
- Ofir, R., Seidman, R., Rabinski, T., Krup, M., Yavelsky, V., Weinstein, Y., und Wolfson, M. (2002). Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent. Cell Death Differ 9, 636-642.

- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., Shiosaka, S., Hammarback, J. A., Urano, F., und Imaizumi, K. (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. Mol Cell Biol *26*, 9220-9231.
- Oppenheim, R. W., Blomgren, K., Ethell, D. W., Koike, M., Komatsu, M., Prevette, D., Roth, K. A., Uchiyama, Y., Vinsant, S., und Zhu, C. (2008). Developing postmitotic mammalian neurons in vivo lacking Apaf-1 undergo programmed cell death by a caspase-independent, nonapoptotic pathway involving autophagy. J Neurosci 28, 1490-1497.
- Pardo, J., Urban, C., Galvez, E. M., Ekert, P. G., Muller, U., Kwon-Chung, J., Lobigs, M., Mullbacher, A., Wallich, R., Borner, C., und Simon, M. M. (2006). The mitochondrial protein Bak is pivotal for gliotoxin-induced apoptosis and a critical host factor of Aspergillus fumigatus virulence in mice. J Cell Biol *174*, 509-519.
- Park, S. J., Wu, C. H., Gordon, J. D., Zhong, X., Emami, A., und Safa, A. R. (2004). Taxol induces caspase-10-dependent apoptosis. J Biol Chem 279, 51057-51067.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., und Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1dependent autophagy. Cell *122*, 927-939.
- Perkins, C., Kim, C. N., Fang, G., und Bhalla, K. N. (1998). Overexpression of Apaf-1 promotes apoptosis of untreated and paclitaxel- or etoposide-treated HL-60 cells. Cancer Res *58*, 4561-4566.
- Perkins, C. L., Fang, G., Kim, C. N., und Bhalla, K. N. (2000). The role of Apaf-1, caspase-9, and bid proteins in etoposide- or paclitaxel-induced mitochondrial events during apoptosis. Cancer Res *60*, 1645-1653.
- Peter, M. E., und Krammer, P. H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. Cell Death Differ 10, 26-35.
- Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaart, E. F., Meijer, A. J., und Codogno, P. (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. J Biol Chem *275*, 992-998.
- Puthalakath, H., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M., und Strasser, A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. Mol Cell *3*, 287-296.
- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J. C., und Perucho, M. (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. Science 275, 967-969.
- Rao, R. V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Ellerby, L. M., Ellerby, H. M., und Bredesen, D. E. (2001). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. J Biol Chem 276, 33869-33874.
- Rao, R. V., Castro-Obregon, S., Frankowski, H., Schuler, M., Stoka, V., del Rio, G., Bredesen, D. E., und Ellerby, H. M. (2002). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. J Biol Chem 277, 21836-21842.

- Rasmussen, U., Broogger Christensen, S., und Sandberg, F. (1978). Thapsigargine and thapsigargicine, two new histamine liberators from Thapsia garganica L. Acta Pharm Suec *15*, 133-140.
- Razandi, M., Pedram, A., Merchenthaler, I., Greene, G. L., und Levin, E. R. (2004). Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. Mol Endocrinol *18*, 2854-2865.
- Reed, J. C., Doctor, K., Rojas, A., Zapata, J. M., Stehlik, C., Fiorentino, L., Damiano, J., Roth, W., Matsuzawa, S., Newman, R., Takayama, S., Marusawa, H., Xu, F., Salvesen, G., und Godzik, A. (2003). Comparative analysis of apoptosis and inflammation genes of mice and humans. Genome Res *13*, 1376-1388.
- Ricci, J. E., Gottlieb, R. A., und Green, D. R. (2003). Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. J Cell Biol *160*, 65-75.
- Roy, S., Sharom, J. R., Houde, C., Loisel, T. P., Vaillancourt, J. P., Shao, W., Saleh, M., und Nicholson, D. W. (2008). Confinement of caspase-12 proteolytic activity to autoprocessing. Proc Natl Acad Sci U S A.
- Sagara, Y., und Inesi, G. (1991). Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca2+ transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations. J Biol Chem 266, 13503-13506.
- Sakahira, H., Enari, M., und Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. Nature *391*, 96-99.
- Saleh, M., Vaillancourt, J. P., Graham, R. K., Huyck, M., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Steinberg, M. H., Nolan, V., Baldwin, C. T., Hotchkiss, R. S., Buchman, T. G., Zehnbauer, B. A., Hayden, M. R., Farrer, L. A., Roy, S., und Nicholson, D. W. (2004). Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. Nature 429, 75-79.
- Samraj, A. K., Sohn, D., Schulze-Osthoff, K., und Schmitz, I. (2007). Loss of caspase-9 reveals its essential role for caspase-2 activation and mitochondrial membrane depolarization. Mol Biol Cell *18*, 84-93.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., und Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. Embo J 17, 1675-1687.
- Schmitt, C. A., Fridman, J. S., Yang, M., Baranov, E., Hoffman, R. M., und Lowe, S. W. (2002). Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. Cancer Cell *1*, 289-298.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., und Peter, M. E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. Eur J Biochem 254, 439-459.
- Searle, J., Kerr, J. F., und Bishop, C. J. (1982). Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. Pathol Annu *17 Pt 2*, 229-259.
- Shimizu, S., Narita, M., und Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. Nature *399*, 483-487.

- Shintani, T., und Klionsky, D. J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. Science *306*, 990-995.
- Soengas, M. S., Alarcon, R. M., Yoshida, H., Giaccia, A. J., Hakem, R., Mak, T. W., und Lowe, S. W. (1999). Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. Science 284, 156-159.
- Srivastava, R. K., Mi, Q. S., Hardwick, J. M., und Longo, D. L. (1999). Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 96, 3775-3780.
- Strasser, A., O'Connor, L., und Dixit, V. M. (2000). Apoptosis signaling. Annu Rev Biochem 69, 217-245.
- Sugawara, K., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Mizushima, N., Ohsumi, Y., und Inagaki, F. (2004). The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of Saccharomyces cerevisiae Atg8. Genes Cells 9, 611-618.
- Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., und Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. EMBO Rep 7, 880-885.
- Takatsuki, A., Arima, K., und Tamura, G. (1971). Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin. J Antibiot (Tokyo) *24*, 215-223.
- Tamura, G., Ando, K., Suzuki, S., Takatsuki, A., und Arima, K. (1968). Antiviral activity of brefeldin A and verrucarin A. J Antibiot (Tokyo) *21*, 160-161.
- Tan, T. T., Degenhardt, K., Nelson, D. A., Beaudoin, B., Nieves-Neira, W., Bouillet, P., Villunger, A., Adams, J. M., und White, E. (2005). Key roles of BIM-driven apoptosis in epithelial tumors and rational chemotherapy. Cancer Cell 7, 227-238.
- Teckman, J. H., und Perlmutter, D. H. (2000). Retention of mutant alpha(1)-antitrypsin Z in endoplasmic reticulum is associated with an autophagic response. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279, G961-974.
- Teitz, T., Wei, T., Valentine, M. B., Vanin, E. F., Grenet, J., Valentine, V. A., Behm, F. G., Look, A. T., Lahti, J. M., und Kidd, V. J. (2000). Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. Nat Med 6, 529-535.
- Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R., und Dawson, A. P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca2+ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca2(+)-ATPase. Proc Natl Acad Sci U S A *87*, 2466-2470.
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J., und et al. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. Nature 356, 768-774.
- Timmer, J. C., Enoksson, M., Wildfang, E., Zhu, W., Igarashi, Y., Denault, J. B., Ma, Y., Dummitt, B., Chang, Y. H., Mast, A. E., Eroshkin, A., Smith, J. W., Tao, W. A., und Salvesen, G. S. (2007). Profiling constitutive proteolytic events in vivo. Biochem J 407, 41-48.
- Timmer, J. C., und Salvesen, G. S. (2007). Caspase substrates. Cell Death Differ 14, 66-72.

- Tombal, B., Weeraratna, A. T., Denmeade, S. R., und Isaacs, J. T. (2000). Thapsigargin induces a calmodulin/calcineurin-dependent apoptotic cascade responsible for the death of prostatic cancer cells. Prostate *43*, 303-317.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., und Croce, C. M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. Science *228*, 1440-1443.

Tsujimoto, Y., und Shimizu, S. (2000). Bcl-2 family: life-or-death switch. FEBS Lett 466, 6-10.

- Unterberger, U., Hoftberger, R., Gelpi, E., Flicker, H., Budka, H., und Voigtlander, T. (2006). Endoplasmic reticulum stress features are prominent in Alzheimer disease but not in prion diseases in vivo. J Neuropathol Exp Neurol *65*, 348-357.
- von Haefen, C., Wieder, T., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K., Dorken, B., und Daniel, P. T. (2003). Paclitaxel-induced apoptosis in BJAB cells proceeds via a death receptorindependent, caspases-3/-8-driven mitochondrial amplification loop. Oncogene 22, 2236-2247.
- Walsh, C. M., Wen, B. G., Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Dixit, V. M., und Hedrick, S. M. (1998). A role for FADD in T cell activation and development. Immunity *8*, 439-449.
- Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., und McPhail, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia. J Am Chem Soc 93, 2325-2327.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., und Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. Science 292, 727-730.
- Wieder, T., Essmann, F., Prokop, A., Schmelz, K., Schulze-Osthoff, K., Beyaert, R., Dorken, B., und Daniel, P. T. (2001). Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of Blymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. Blood 97, 1378-1387.
- Willis, S. N., Fletcher, J. I., Kaufmann, T., van Delft, M. F., Chen, L., Czabotar, P. E., Ierino, H., Lee, E. F., Fairlie, W. D., Bouillet, P., Strasser, A., Kluck, R. M., Adams, J. M., und Huang, D. C. (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. Science *315*, 856-859.
- Wu, Y. T., Tan, H. L., Huang, Q., Kim, Y. S., Pan, N., Ong, W. Y., Liu, Z. G., Ong, C. N., und Shen, H. M. (2008). Autophagy Plays a Protective Role during zVAD-Induced Necrotic Cell Death. Autophagy 4.
- Wuytack, F., Raeymaekers, L., und Missiaen, L. (2002). Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. Cell Calcium *32*, 279-305.
- Wyllie, A. H. (1997). Apoptosis: an overview. Br Med Bull 53, 451-465.
- Yamamoto, K., Ichijo, H., und Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. Mol Cell Biol *19*, 8469-8478.
- Yamin, T. T., Ayala, J. M., und Miller, D. K. (1996). Activation of the native 45-kDa precursor form of interleukin-1-converting enzyme. J Biol Chem 271, 13273-13282.

- Yin, X. M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K. A., und Korsmeyer, S. J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. Nature 400, 886-891.
- Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., und Klionsky, D. J. (2006). Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. J Biol Chem *281*, 30299-30304.
- Zeghouf, M., Guibert, B., Zeeh, J. C., und Cherfils, J. (2005). Arf, Sec7 and Brefeldin A: a model towards the therapeutic inhibition of guanine nucleotide-exchange factors. Biochem Soc Trans *33*, 1265-1268.
- Zha, J., Weiler, S., Oh, K. J., Wei, M. C., und Korsmeyer, S. J. (2000). Posttranslational Nmyristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. Science *290*, 1761-1765.
- Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N. H., und Winoto, A. (1998). Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. Nature 392, 296-300.
- Zong, W. X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q. C., Yuan, J., und Thompson, C. B. (2003). Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. J Cell Biol *162*, 59-69.
- Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., und Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. Cell *90*, 405-413.



9. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Afc	Amino-4-trifluoromethylcumarin
Ala	Alanin
Amc	Aminomethylcumarin
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	ADP-ribosylation factor
AS	Aminosäure
Asp	Aspartat
ATF6	activating transcription factor 6
Atg	autophagy related gene
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	Bcl-2 antagonist killer
BAPTA	1,2-bis-(o-Aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraaceticacid,
	tetraacetoxymethyl ester
Bax	Bcl-2 associated protein X
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-x _L	Bcl-2-like 1 large
Beclin-1	coiled-coil, myosin like Bcl-2 interacting protein
BH	Bcl-2-Homologie
Bid	BH3-interacting death agonist
Bik	Bcl-2-interacting killer
Bim	Bcl-2-interacting mediator of cell death
BSA	Rinderserumalbumin
CAD	caspase-activated DNase
CARD	Caspase-Rekrutierungs-Domäne
CD	cluster of differentiation
с-Мус	cellular myelocytomatosis viral oncogene
C-Terminus	Carboxylterminus
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DD	Todesdomäne, <i>death domain</i>
DED	Todeseffektordomäne, death effector domain
DiOC	3,3'-Dihexyloxacarbocyaniniodid
DISC	death inducing signaling complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DMSO	Dimethylsulfoxid
DR	Todesrezeptor, death receptor
DTT	Dithiothreitol
elF2α	eukaryotic translation initiation factor 2α
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence activated cell sorter
FADD	FAS-associated death domain protein
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanine nucleotide exchange factor
Glu	Glutamin
GRP78	glucose-regulated protein 78 kDa
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
His	Histidin
IAP	inhibitor of apoptosis
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ICE	Interleukin-1β-converting enzym
IF	Immunfluoreszenz
lle	Isoleucin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid
IRE1	inositol-requiring enzym 1
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KolP	Koimmunpräzipitation
LC3	microtubule-associated protein 1 light chain 3
min	Minute
MPT	mitochondrial permeability transition pore
mTor	mammalian target of rapamycin
mRNA	Boten (messenger)-Ribonukleinsäure
NAD⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NF-κB	nuclear factor kappa-B

Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NSCLC	non small cell lung cancer
N-Terminus	Aminoterminus
P58 ^{IPK}	inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-
	activated protein kinase
PARP	Poly(ADP-ribose)polymerase
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phosphatidylethanolamin
PERK	pancreatic ER-kinase (PRK)-like ER-kinase
PS	Phosphatidylserin
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PI	Propidiumiodid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q-VD-OPh	Quinolyl-Val-Asp-Methyldifluorophenoxy-Methylketon
RIP	receptor interacting protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SERCA	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
sXBP1	spliced XPB1
tBid	trunkiertes Bid
Thr	Threonin
ТМ	Transmembrandomäne
TNF α	tumor necrosis factor α
TNF/NGF-Rezeptor	tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor
TNF-R1	tumor necrosis factor-receptor 1
TRADD	TNF-R1 associated death domain protein
TRAF2	TNF-receptor associated factor 2
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor
UPR	unfolded protein response
UV-Strahlung	Ultraviolettstrahlung
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
XBP1	X box binding protein 1
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid

XIAP

X-linked Inhibitor of apoptosis protein



10. Anhang

Lebenslauf

Katja Janßen 20.10.1980	geboren in Mülheim an der Ruhr
1987-1991	Städtische Gemeinschaftsgrundschule an der Schlägelstrasse, Mülheim (Ruhr)
1991-2000	Karl-Ziegler-Gymnasium, Mülheim (Ruhr) Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
2000-2005	Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf Diplomarbeit am Institut für molekulare Medizin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff Abschluss: Diplom (Note: <i>"Ausgezeichnet"</i>) Thema: <i>"</i> Induktion von Zelltod durch das virale Protein Apoptin."
2005-2008	Promotionsarbeit an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf am Institut für Molekulare Medizin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff

Kongressbeiträge

Janssen K., Hofmann T. G., Jans D. A., Hay R. T., Schulze-Osthoff K. and Fischer U. "Cell death induced by the viral protein Apoptin is modulated by Bcl-2 family members and Apaf-1-dependent"

13th Euroconference on Apoptosis, Oktober 2005, Budapest, Ungarn

Fischer U., **Janssen K**., Stroh C. and Schulze-Osthoff K. "Caspase-8 and Caspase-10 have unique and overlapping substrate specificties" 13th Euroconference on Apoptosis, Oktober 2005, Budapest, Ungarn

Janssen K., Fischer U., Burek M., Los M. and Schulze-Osthoff K. "Apoptin is modified by SUMO conjugation and targeted to Promyelocytic Leukemia Protein Nuclear Bodies"

6th international Euroconference on Mechanisms of cell death and diseases. Advances in therapeutic intervention and drug development, Oktober 2006, Cascais, Portugal

Publikationen

2008 **Janssen K**., Niemann M. T., Schulze-Osthoff K. and Fischer U. "Loss of proapoptotic Bak and Bax causes a switch from apoptotic to necrotic cell death in response to ER stress" (in Vorbereitung)

Janssen K., Niemann M. T., Mehlhorn H., Schulze-Osthoff K. and Fischer U. "Apoptosis incompetent cells survive upon ER stress by the induction of autophagy" (in Vorbereitung)

Pohlmann S., Samraj A., **Janssen K**., and Schulze-Osthoff K. "Role of the tyrosine kinase Lck in T-cell apoptosis" (in Vorbereitung)

2007 Fischer U., **Janssen K**. and Schulze-Osthoff K. "Does caspase inhibition promote clonogenic tumor growth"? Cell Cycle 6:3048-53

> Fischer U., **Janssen K**. and Schulze-Osthoff K. "Cutting-edge apoptosis-based therapeutics: a panacea for cancer?" BioDrugs 21:273-97

Janssen K., Pohlmann S., Schulze-Osthoff K. and Fischer U. "Apaf-1 and caspase-9 deficiency prevents apoptosis in a Bax-controlled pathway and promotes clonogenic survival during paclitaxel treatment" Blood 110:3662-72.

 Janssen K., Hofmann T. G., Jans D. A., Hay R. T., Schulze-Osthoff K. and Fischer U.
 "Apoptin is modified by SUMO conjugation and targeted to Promyelocytic Leukemia Protein Nuclear Bodies" Oncogene 26:1557-66
Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Katja Janßen

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. K. Schulze-Osthoff für die Möglichkeit, in seinem Institut die Doktorarbeit anzufertigen, sowie für die interessante Aufgabenstellung und die Betreuung der Arbeit.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. H. Mehlhorn, der die Betreuung dieser Arbeit übernommen hat.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Ute Fischer für die intensive wissenschaftliche und experimentelle Anleitung während der gesamten Arbeit bedanken. Für die motivierenden Worte und die unendliche Geduld bin ich sehr dankbar.

Bei Marion Nissen bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die große Hilfe bei der Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Mathis Niemann und Sibylle Horn für die gute Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und das äußerst angenehme Laborklima.

Ganz besonderer Dank gilt Stephan Pohlmann, der mich durch alle Höhen und Tiefen des Doktorandenalltags begleitet hat.

Außerdem möchte ich mich bei Charlotte Lindenblatt und Frank Eßman für die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Medizin für ihre stetige Hilfsbereitschaft und ein gutes Arbeitsklima.

Bei Nana Ueffing und Katja Gotthardt möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und Hilfe während des gesamten Studiums, der Diplomarbeit und der Promotion bedanken.

Der wohl größte Dank gilt meinen Eltern und Großeltern, die mich in jeder Situation unterstützt haben und denen deshalb diese Arbeit gewidmet ist.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen meinen Freunden für die Unterstützung und das Verständnis bedanken, insbesondere bei Sabrina Gehrmann, die mir nicht nur während der Anfertigung dieser Arbeit beigestanden hat.