

Optimierung der Strahlentherapie durch zielgerichtete Modulation von Apoptose- Signalwegen

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2007

vorgelegt von

Amelie Rübel

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2007

Dekan: Prof. Dr. L. Wesemann

1. Berichterstatter: Prof. Jendrossek

2. Berichterstatter: Prof. Duszenko

Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran, dass plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat.

Thorstein Bunde Veblen (1857-1929)
amerik. Soziologe und Ökonom

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen -----	IV
1.1 Einheiten -----	1
1.2 Stimuli -----	1
1.3 Sonstige -----	1
2. Einleitung -----	5
2.1 Apoptose und Krebstherapie -----	5
2.2 Apoptose - physiologische Bedeutung und Charakterisierung -----	6
2.3 Caspasen - zentrale Exekutoren des apoptotischen Programms - und ihre -----	8
Substrate -----	8
2.4 Die zwei Hauptsäulen der Apoptose -----	11
2.4.1 Der intrinsische Zelltodweg übers Mitochondrium (Abbildung 2.3)-----	11
2.4.2 Der extrinsische Zelltodweg über Aktivierung der Todesrezeptoren-----	14
2.5 Die Bedeutung des Mitochondriums für die Apoptose -----	17
2.5.1 Die Bcl-2-Proteinfamilie-----	17
2.5.2 Zusammenspiel der Bcl-2-Familienmitglieder am Mitochondrium-----	18
2.5.3 Die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium-----	20
2.6 Die Zellantwort nach ionisierender Strahlung -----	22
2.7 Der PI3K/Akt-Weg: Gegenspieler von Bestrahlung und Apoptose -----	24
2.8 Zellzyklusregulationen: -----	26
Rb – zwischen Leben, Tod und Differenzierung -----	26
2.9 Die Alkylphosphocholine ErPC und ErPC3 -----	28
2.10 TRAIL und ETR-2 -----	30
2.11 Zielsetzung -----	33
3. Material -----	34
3.1 Chemikalien und Reagenzien -----	34
3.2 Medien, Puffer und Lösungen -----	35
3.2.1 Zellkultur-----	35
3.2.2 Immunfluoreszenz-----	35
3.2.3 FACS-----	36
3.2.4 Koloniebildung-----	36
3.2.5 SDS-PAGE und WB-----	36
3.3 Antikörper, Liganden und small molecules -----	37
3.3.1 Antikörper zur Analyse im Western Blot-----	37
3.3.2 Antikörper zur Immunfluoreszenz-----	38
3.3.3 Antikörper und Liganden zur Stimulation von Zellen-----	39

3.3.4	Small molecules und Chemotherapeutika zur Stimulation von Zellen -----	39
3.4	Zelllinien-----	39
3.5	Größenstandards-----	40
3.6	Verbrauchsmaterial -----	40
3.7	Geräte -----	41
4.	Methoden-----	43
4.1	Zellkultur (ZK)-----	43
4.1.1	Kultivierung der Zellen -----	43
4.1.2	Einfrieren und Auftauen der Zellen -----	43
4.1.3	Mycoplasmen PCR -----	44
4.1.4	Zellzahlbestimmung-----	45
4.2	Behandlung der Zellen-----	45
4.2.1	Bestrahlung der Zellen -----	45
4.2.2	Stimulation der Zellen mit ErPC oder ErPC3-----	45
4.2.3	Stimulation der Zellen mit TRAIL oder ETR-2 -----	46
4.2.4	Kombinierte Behandlungsansätze -----	46
4.3	Immunfluoreszenz -----	46
4.3.1	Hoechst/PI-Färbung -----	46
4.3.2	H2AX-Focibildung -----	47
4.4	Koloniebildung -----	48
4.5	Isobologramm-Analysen-----	49
4.6	FACS-Analysen -----	50
4.6.1	Viabilität (PI-Exclusion)-----	51
4.6.2	Mitochondriales Membranpotential (TMRE)-----	51
4.6.3	Apoptose und Zellzyklus (Nicoletti) -----	52
4.6.4	Bax-Aktivierung -----	53
4.6.5	Oberflächenrezeptor-Expression von ETR-1 und ETR-2 -----	53
4.7	Western Blot -----	54
4.7.1	Herstellen von Zelllysaten-----	54
4.7.2	SDS-PAGE -----	54
4.7.3	Transfer -----	55
4.7.4	Entwicklung -----	56
4.7.5	Strippen und Reproben eines Western Blots-----	57
4.8	Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNA-----	57
5.	Ergebnisse-----	59
5.1	Die Alkylphosphocholine ErPC sowie ErPC3 und ihre Wirkung auf Glioblastom-/Astrozytomzellen nach Kombinationsbehandlung mit IR -----	59
5.1.1	ErPC und ErPC3 induzieren Apoptose in humanen Gliomzellen -----	59
5.1.2	Die malignen Gliomzelllinien T98G, A172 und U87MG sind resistent gegenüber strahleninduzierter Apoptose -----	61
5.1.3	ErPC und ErPC3 steigern die zytotoxische Wirkung ionisierender Strahlung auf maligne Gliomzellen -----	62

5.1.4	Isobologramm-Analysen zur Beurteilung der Effizienz kombinierter Behandlungsansätze -----	68
5.1.5	Die Kombinationswirkung aus IR und ErPC bzw. IR und ErPC3 im Koloniebildungstest (Kobi) -----	69
5.1.6	Normalgewebstoxizität von ErPC und ErPC3 -----	71
5.2	Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Kombinationsbehandlung im Glioblastommodell -----	72
5.2.1	Genauere Differenzierung des Zelltods nach kombinierter Behandlung mit IR und ErPC/ErPC3 -----	72
5.2.2	Caspasen-Aktivierung und PARP-Spaltung nach IR und ErPC -----	74
5.2.3	Rolle des Mitochondriums für die erhöhte Effizienz der Kombination -----	75
5.2.4	Mögliche Regulatoren oberhalb des Mitochondriums -----	78
5.2.5	ErPC und die kombinierte Behandlung beeinflussen Zellzyklusproteine -----	80
5.2.6	ErPC3 verstärkt die strahleninduzierte Foci-Bildung von γ -H2AX -----	81
5.3	ErPC3 und Bestrahlung im Jurkat-Lymphoma-Modell -----	84
5.3.1	Verifizierung der Zellsysteme im Western Blot -----	84
5.3.2	ErPC3 und kombinierte Behandlung induzieren hocheffizient Apoptose in Jurkat vector Zellen -----	85
5.3.3	Bcl-2-Überexpression kann die Wirkung der kombinierten Behandlung hemmen aber nicht vollständig blocken -----	86
5.3.3.1	Der Einfluss einer Bcl-2-Überexpression auf den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials -----	86
5.3.3.2	Der Einfluss einer Bcl-2-Überexpression auf die Caspasen-Aktivierung -----	87
5.3.4	Veränderungen pro- und anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine nach Kombinationsbehandlung in Jurkat vector und Bcl-2 Zellen -----	88
5.3.5	Veränderungen oberhalb des Mitochondriums durch Überexpression von Bcl-2 -----	90
5.3.6	Der Einfluss einer Überexpression an Bcl-2 auf Rb und den Zellzyklus -----	91
5.3.7	ErPC3 und kombinierte Behandlung induzieren hocheffizient Apoptose in Bak-positiven JCAM -----	94
5.3.8	Das Fehlen von Bax und Bak blockt die Wirkung der Kombinationsbehandlung fast vollständig -----	95
5.3.8.1	Der Einfluss des defekten mitochondrialen Zelltodwegs auf die Apoptose-Induktion nach Stimulation mit ErPC3 oder kombinierter Behandlung -----	95
5.3.8.2	Das Fehlen von Bax und Bak und der damit verbundene Einfluss auf die Caspasen-Aktivierung -----	96
5.3.9	Veränderungen pro- und anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine nach Kombinationsbehandlung in Bak-positiven und Bak-negativen JCAM -----	97
5.3.10	Puma wird sehr früh nach Behandlung induziert und später abgebaut -----	99
5.3.11	Veränderungen oberhalb des Mitochondriums -----	100
5.3.12	Bax-Bak-Defizienz und ihr Einfluss auf den Zellzyklus -----	101
5.3.13	Verifizieren des JCAM-Zellsystems durch siRNA-Versuche -----	102
5.4	Kombinationseffekte von TRAIL und Bestrahlung in Jurkat-Lymphomzellen -----	105
5.4.1	TRAIL und ETR-2 induzieren effizient und scheinbar unabhängig vom mitochondrialen Zelltodweg Apoptose in Bak-positiven und -negativen JCAM ---	106
5.4.2	Die kombinierte Wirkung aus IR und TRAIL bzw. IR und ETR-2 ist zumindest teilweise abhängig vom Mitochondrium -----	108

5.4.3	Die Caspasen-Aktivierung nach IR, TRAIL, ETR-2 und den kombinierten Behandlungen in Abhängigkeit des intrinsischen Zelltodweges-----	111
5.4.4	Die Induktion des Zelltods nach Hemmung von Bak in den Bak-positiven JCAM -----	113
5.5	Steigerung der Wirkeffizienz durch kombinierte Behandlungsansätze aus IR, TRAIL und ErPC3 – <i>in vitro</i> Untersuchungen an Jurkat-Lymphomzellen-----	115
6.	<i>Diskussion</i> -----	118
6.1	ErPC und ErPC3 in kombinierter Wirkung mit Bestrahlung -----	118
6.2	Zum Wirkmechanismus der kombinierten Therapie-----	120
6.2.1	Die Bedeutung der Apoptose für die kombinierte Wirkung aus IR und ErPC bzw. ErPC3 -----	120
6.2.2	Die Bedeutung des Mitochondriums für die kombinierte Wirkung aus IR und ErPC bzw. ErPC3-----	121
6.2.3	Die Bedeutung der Bcl-2 Familie für die kombinierte Wirkung aus IR und ErPC bzw. ErPC3-----	123
6.2.4	Regulationsmechanismen oberhalb des Mitochondriums: Die Bedeutung von PKB/Akt -----	128
6.2.5	Einflüsse auf den Zellzyklus nach kombinierter Behandlung-----	134
	I. Rb – an der Schnittstelle zwischen Zellzyklus und Apoptose -----	134
	II. p27 ^{Kip1} -----	137
6.2.6	γ H2AX - Kombinationseffekte der Focibildung nach IR und ErPC3 -----	138
6.3	TRAIL und Bestrahlung-----	141
6.4	Die Dreifachbehandlung aus Bestrahlung, TRAIL und ErPC3 -----	145
6.5	Ausblick-----	146
7.	<i>Zusammenfassung</i> -----	148
8.	<i>Literaturverzeichnis</i> -----	150
9.	<i>Zusätzliche Abbildungen</i> -----	158
	<i>Danksagung</i> -----	160

1. Abkürzungen

1.1 Einheiten

μF	Mikrofarad
Gy	Gray
μM	Mikromolar
MV	Megavolt

1.2 Stimuli

TRAIL	TNF-related Apoptosis Inducing Ligand
ETR-2	Lexatumumab, agonistischer monoklonaler humaner Antikörper, der gegen den TRAIL-Rezeptor 2 gerichtet ist
ErPC	Erucylphosphocholin
ErPC3	Erucylphosphohomocholin, Erufosine
5-FU	5-Fluorouracil

1.3 Sonstige

AA	Acrylamid
AIF	Apoptosis inducing factor
ALP	Alkyllysophospholipid
ANT	Adenine-nucleotide translocator
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
APC	Alkylphosphocholin
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM and RAD3-related
Bad	Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 Antagonist/Killer
Bax	Bcl-2-associated X protein

Bcl-2	B-cell lymphoma gene 2
Bcl-xL	Large Splicevariante des Bcl-x-Gens
Bcl-xS	Kurze Splicevariante des Bcl-x-Gens
Bid	BH-3 interacting domain death agonist
BSA	Bovines Serumalbumin
CAD	Caspase activated DNase
Caspase	<u>C</u> ysteine-dependent <u>a</u> spartate specific <u>p</u> rotease
CARD	Caspase-recruitment-domain
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
CD95L/ FasL	CD95 Ligand, bzw. Fas Ligand
cdk	cyclin dependent kinase
C. elegans	Caenorhabditis elegans
Chk1/2	Cell cycle checkpoint kinases 1/2
CICD	Caspase-independent cell death
CypD	Cyclophilin D
Cyt c	Cytochrom c
DD	death domain
DED	death effector domain
DIABLO	Direct IAP binding protein with low pI
DISC	Death inducing signalling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR	Death Receptor (z.B. DR3, DR4, DR5, DR6)
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EndoG	Endonuclease G
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FADD	Fas-associated protein with death domain
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
FLICE	FADD-like IL-1 β converting enzyme
FLIP	FLICE inhibitory protein
FSC	Forward Scatter
HK	Hexokinase
HR	Homologe Rekombination

IAP	Inhibitor of apoptosis protein
IR	Bestrahlung (Ionizing Radiation)
MAC	Mitochondrial apoptosis-induced channel
MetOH	Methanol
mTOR	mammalian target of rapamycin
NHA	Normal human astrocytes (Normalgewebsastrozyten)
P	Phospho
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly-(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat Buffered Saline
PDK1	Phosphoinositid-dependent kinase 1
PH	Pleckstrin homology
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-4,5-trisphosphat
PKB	Proteinkinase B
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
PTP	Permeability transition pore
R	Rezeptor
RIP	receptor-interacting protein
ROS	Reactive oxygen species
SAPK/JNK	Stress activated protein kinase/C-Jun N-terminal kinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Smac	Second mitochondria-derived activator of Caspase
SSC	Sideward Scatter
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMRE	Tetramethylrhodamin-ethylester-perchlorat
TNF	Tumor necrosis factor
TRADD	TNF Receptor-associated protein with death domain
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UE	Untereinheit
VDAC	Voltage-dependent anion channel
WB	Western Blot

zVAD-FMK	Benzyloxy-valine-alanine-aspartate-O-methyl-fluoromethylketon
ZK	Zellkultur

2. Einleitung

2.1 Apoptose und Krebstherapie

Ionisierende Strahlung als Basis der Strahlentherapie ist eine von drei Standardbehandlungen gegen Krebs und kommt bei ca. 60 % aller Krebspatienten zum Tragen (Perez, 2004). Neuere Erfolge in der Bildgebung des Tumors und verbesserter Zielfokussierung der Strahlung (Bernier et al., 2004; Suit, 2002; Webb, 2000) sowie Optimierung durch fraktionierte Bestrahlung konnten die Behandlungserfolge deutlich verbessern (Fu et al., 2000; Turrisi et al., 1999). Dennoch können zahlreiche Tumore durch Strahlentherapie allein nur schlecht kontrolliert werden und bei Patienten, die an malignen Gliomen leiden (dies gilt insbesondere für die besonders schwere Manifestation des Glioblastoma multiforme), scheitern bis heute selbst kombinierte Behandlungsansätze aus Operation, Strahlentherapie und aggressiver Chemotherapie (Brandes, 2003; Reardon and Wen, 2006). Wegen der hohen intrinsischen Resistenz maligner Gliome gegen DNA-schädigende Substanzen sowie dem Unvermögen zahlreicher Chemotherapeutika, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, sind an neuen Substanzen bis heute nur Temozolomide und Irinotecan für die Kombinationstherapie mit Bestrahlung zugelassen (Stewart, 2002; Stupp et al., 2002). Das Problem bei malignen Gliomen besteht vielfach darin, dass sich die einzelnen Tumorzellen durch Mutationen in einigen Genen auszeichnen, die das Absterben der Zellen erschweren und das Überleben bzw. die Zellteilung fördern. So kommt es einerseits zum Verlust des Tumorsuppressors p53 und/oder erhöhter Expression seines Antagonisten mdm2. Andererseits können erhöhte Proteinlevel an anti-apoptotischem Bcl-2 zu Apoptoseresistenz führen (Holland, 2001; Maher et al., 2001). Außerdem wird häufig als Folge einer Überexpression des Wachstumsfaktorrezeptors EGFR bzw. der Expression eines konstitutiv aktiven EGFR eine deregulierte Aktivität des PKB/Akt-Wegs beobachtet. Diese fördert das Überleben der Tumorzellen und inhibiert die Apoptose durch Hemmung pro-apoptotischer Proteine (Haas-Kogan et al., 1998; Song et al., 2005; Vivanco and Sawyers, 2002). Da fehlregulierte Apoptose- und Überlebenssignalwege zu einer Resistenz der Tumorzellen gegenüber Behandlung führen können, stellen sie ein wichtiges Ziel für potentielle neue Substanzen in der Tumorthherapie dar.

2.2 Apoptose – physiologische Bedeutung und Charakterisierung

Apoptose steht für ein in eukaryotischen Zellen angelegtes Selbstmordprogramm, bei dem in Vielzellern einzelne Zellen ohne Beeinträchtigung des Gesamtorganismus beseitigt werden können. Der Begriff Apoptose setzt sich aus den griechischen Wörtern „apo“ und „ptosis“ zusammen, was soviel bedeutet wie das Herabfallen der Blätter im Herbst. Dabei wird der bildliche Vergleich gezogen, dass es in einem Vielzeller oft zum Wohle des Gesamtorganismus notwendig ist, dass einzelne Zellen absterben, so wie es für Bäume energetisch günstiger ist ohne ihre Blätter zu überwintern. Als wichtiger Gegenspieler zur Proliferation ist die Apoptose bedeutend für die Kontrolle über Zellzahl, Größe und Form von Gewebsstrukturen innerhalb eines Organismus und schützt diesen außerdem vor entarteten oder virusbefallenen Zellen. Während der embryonalen Entwicklung dient die Apoptose vor allem der Rückbildung verschiedener Gewebe wie z.B. bei der Ausbildung des Müller-Ganges/Wolff-Ganges beim männlich/weiblich determinierten Keim (Jacobson et al., 1997), bei der Entstehung der Finger und Zehen (Milligan et al., 1995), bei der Entwicklung des Nervensystems (Raff et al., 1993; Vaux and Korsmeyer, 1999) sowie auch bei der Eliminierung „falscher“ Antikörper/T-Zellrezeptoren (Jacobson et al., 1997). Im adulten Organismus besteht die Aufgabe der Apoptose insbesondere in der Zellzahlregulierung zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase, was vor allem bei hohem Zelldurchsatz von Bedeutung ist (z.B. Haut, Magen-Darm-Trakt, kernhaltige Blutzellen). Ebenso wichtig ist die Beseitigung nicht mehr benötigter T-Zellen zum Abklingen einer Immunantwort (Brunner et al., 1995; Combadiere et al., 1998; Dhein et al., 1995) sowie die Eliminierung von Tumorzellen oder sonstig entarteter/virusbefallener Zellen (Duvall and Wyllie, 1986; Thompson, 1995). Eine gestörte Apoptose-Regulation kann daher Ursache vieler Erkrankungen sein (Fadell et al., 1999; Hetts, 1998). So wird eine krankhaft erhöhte Apoptoserate u.a. mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Beutler, 2001), neurodegenerativen Erkrankungen (Yuan and Yankner, 2000), Leberschäden (Kanzler and Galle, 2000; Patel et al., 1998) sowie AIDS (Cloyd et al., 2001; Corasaniti et al., 2001) in Zusammenhang gebracht. Diabetes mellitus (Hui et al., 2004), manche Autoimmunerkrankungen (Lupus erythematoses, Rheumatoide Arthritis) (Fischer and Schulze-Osthoff, 2005) sowie verschiedene maligne Erkrankungen wie Leukämien, Lymphome und Karzinome (Igney and Krammer, 2002), werden hingegen auf eine verminderte Apoptoserate zurückgeführt. Daher dient bei diesen malignen Erkrankungen u.a. die Apoptose als Target für zielgerichtete Therapien.

Die Reize, die in einer Zelle Apoptose auslösen, sind ebenso unterschiedlich wie die Möglichkeiten der verschiedenen Apoptosewege. Allerdings sind die morphologischen

Charakteristika apoptotischer Zellen untereinander unabhängig von Stimulus und Signalweg sehr ähnlich (Arends and Wyllie, 1991; Kerr et al., 1972) (Abbildung 2.1).

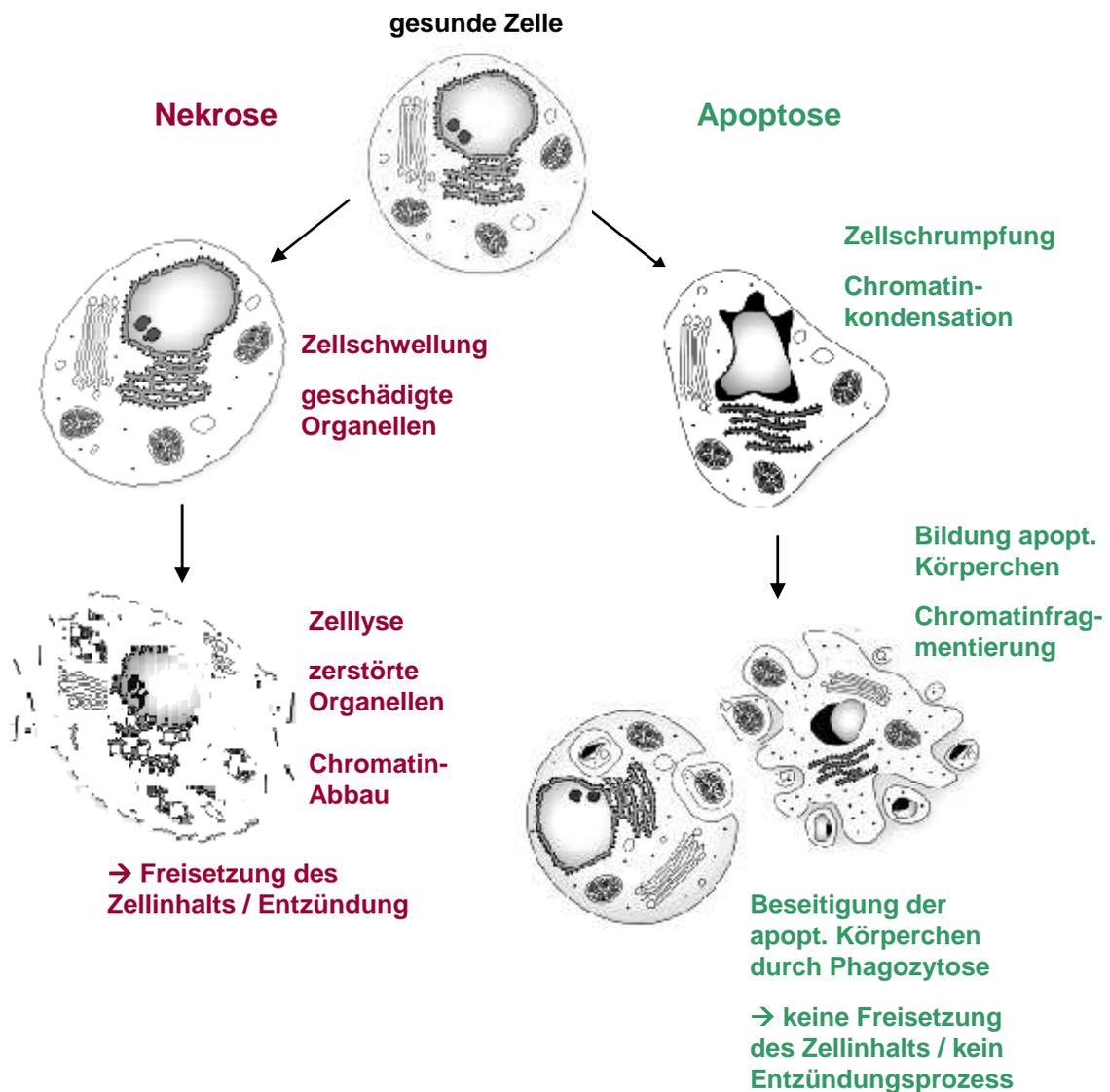


Abbildung 2.1 Morphologische Veränderungen der Zelle im Rahmen von Apoptose und Nekrose (modifiziert nach Kerr, 1972)

Bei der Apoptose schrumpft die Zelle und der Zellkern wird kondensiert und fragmentiert. Anschließend wird die Zelle in apoptotische Körperchen zerlegt und durch Phagozyten abgeräumt. Bei der Nekrose hingegen schwillt die Zelle an und platzt schließlich, wobei die zerstörten Organellen und abgebautes Chromatin sowie sonstige Zellinhalte freigesetzt werden. Daher kommt es bei der Nekrose im Gegensatz zur Apoptose auch zu Entzündungsprozessen im umliegenden Gewebe.

Während der Apoptose schrumpft die Zelle und löst sich von ihrer Umgebung ab. Gleichzeitig kommt es zur Kondensierung und Fragmentierung des Chromatins sowie zum Anschwellen der äußeren Mitochondrienmembran, während die Organellen hingegen intakt bleiben (Kerr et al., 1972; Vander Heiden et al., 1997). Im weiteren Verlauf der Apoptose

kommt es zur Freisetzung pro-apoptotischer Proteine aus dem Mitochondrium (Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997) mit darauffolgender Caspasenaktivierung sowie zu einer Externalisierung von Phosphatidylserin an die Außenseite der Plasmamembran (Fadok and Henson, 2003). Außerdem wird die DNA internukleosomal gespalten, wobei Bruchstücke aus Vielfachen von 185bp entstehen, die die typische DNA-Fragmentierung nach Apoptose darstellen (Arends et al., 1990; Wyllie, 1980). Nach der Fragmentierung des Zellkerns zerfällt die Zelle in die sogenannten apoptotischen Körperchen, membranumschlossene Vesikel mit Zellorganellen und Kernfragmenten. Diese werden von benachbarten Zellen oder Makrophagen (angelockt z.B. durch die Externalisierung von Phosphatidylserin als „Eat-me“ Signal) erkannt und phagozytiert, so dass eine Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe ausbleibt (Duvall and Wyllie, 1986; Fadok et al., 1992; Savill and Fadok, 2000).

Der Apoptose lässt sich als weitere wichtige Zelltodform die Nekrose entgegensetzen, bei der es nach starken äußeren Reizen zum Verlust der Membranintegrität kommt. Dadurch schwillt die Zelle an und ihre Organellen werden geschädigt. Schließlich platzt die Zelle auf und ihr Inhalt wird in die Umgebung freigesetzt, was mit Entzündungsprozessen infolge einer Immunantwort einhergeht (Farber, 1994; Kanduc et al., 2002) (Abbildung 2.1).

Außer Apoptose und Nekrose gibt es jedoch noch weitere Zelltodformen wie nekroseartigen programmierten Zelltod (PCD, Programmed Cell Death), Apoptose-ähnlichen PCD, Autophagie oder mitotische Katastrophe (Bröker et al., 2005; Jaattela, 2004).

2.3 Caspasen - zentrale Exekutoren des apoptotischen Programms - und ihre Substrate

Die Bezeichnung „Programmierter Zelltod“ beinhaltet prinzipiell alle aktiv von der Zelle geregelten Formen eines Zelltods. Dementsprechend stellt die Apoptose eine spezifische Form des programmierten Zelltods dar, die sich morphologisch und biochemisch von anderen aktiven Zelltodformen unterscheidet. Ein wesentliches Merkmal, mit dem man die Apoptose von anderen Zelltodvarianten abgrenzt, ist u.a. die Aktivierung der Caspasen, spezieller Proteasen mit einem Cystein-Rest im aktiven Zentrum und Substratspezifität für Spaltung nach Aspartat. Die Geschichte der Caspasen begann mit der Entdeckung des *C.elegans* ced-3 Gens, dessen Produkt, die Cystein-Protease Ced-3, entscheidend ist für die Eliminierung somatischer Zellen während der Entwicklung des Nematoden *C.elegans* (Ellis and Horvitz, 1986). Als erstes humanes Ced-3 Homolog wurde 1993 das humane Interleukin-1 β -Konversionsenzym (ICE) entdeckt, das später in Caspase 1 umbenannt wurde (Miura et al., 1993; Yuan et al., 1993). Bis heute wurden 11 humane Caspasen identifiziert,

die Caspasen 1 bis 10 sowie Caspase 14 (Alnemri et al., 1996; Pistritto et al., 2002). Das initial als Caspase 13 bezeichnete Protein stellte sich später als bovines Homolog von Caspase 4 dar (Koenig et al., 2001) und die Caspasen 11 und 12 repräsentieren murine Proteine, die sehr wahrscheinlich homolog zu den humanen Caspasen 4 und 5 sind (Degterev et al., 2003). Es sind jedoch nicht alle Caspasen an der Regulation der Apoptose beteiligt und so sind die Caspasen 1, 5 und 11 als Cytokin-prozessierende Proteasen bei der Regulation von Entzündungsprozessen involviert (Ghayur et al., 1997; Kuida et al., 1995; Li et al., 1995), während der Caspase 14 wahrscheinlich eine Rolle bei der Keratinozyten-differenzierung zukommt (Eckhart et al., 2000a; Eckhart et al., 2000b; Lippens et al., 2000). Die verbleibenden apoptotischen Caspasen werden in zwei weitere Subgruppen unterteilt, die Initiatorcaspasen (Caspasen 2, 8, 9 und 10) mit langer N-terminaler Prodomäne und die Effektorcaspasen (Caspasen 3, 6 und 7) mit kurzer Prodomäne (Nicholson and Thornberry, 1997; Strasser et al., 2000) (Abbildung 2.2). Im Apoptose-Signalweg stehen die Initiatorcaspasen klassischerweise oberhalb der Effektorcaspasen und übertragen ihre Aktivierung sozusagen auf diese Exekutoren, wobei über Spaltung derer Substrate der typische apoptotische Phänotyp erzeugt wird (Zhivotovsky, 2003).

Caspasen werden als Zymogene in enzymatisch inaktiver Proform synthetisiert (Thornberry and Lazebnik, 1998), bestehend aus einer N-terminalen Prodomäne, einer großen Untereinheit (UE) von ca. 20 kDa sowie einer kleinen UE von ca. 10 kDa. Die beiden UE sind durch eine kurze Verbindungsregion verknüpft, in der sich eine Aspartat-Schnittstelle befindet (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004) (Abbildung 2.2). Nach Abspaltung der Prodomäne sowie Trennung der beiden Untereinheiten bilden diese ein Heterodimer, welches sich mit einem zweiten Heterodimer zur aktiven Caspase zusammenfindet (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004). Die Aktivierung der beiden Caspase-Subgruppen erfolgt nun auf verschiedene Weisen: Initiatorcaspasen aktivieren sich in der Regel autokatalytisch. Sie besitzen deshalb im Vergleich zu den Effektorcaspasen eine erhöhte Grundaktivität und liegen als Monomere im Zytoplasma vor (Boatright et al., 2003). Über ihre N-terminalen Rekrutierungsdomänen (Abbildung 2.2) können sie an Proteine von Aktivierungsplattformen binden, was schließlich zu ihrer Aktivierung beiträgt. Im Fall der Caspasen 8 und 10 handelt es sich um die DED (death effector domain) Domäne, mit der die Proteasen über den Adapter FADD (Fas associated death domain) an Zelltodrezeptoren in der Zytoplasmamembran binden und dabei über den Prozess der „induzierten Proximität“ autoproteolytisch aktiviert werden (Muzio et al., 1998; Salvesen and Dixit, 1999). Die Aktivierung der Caspase 9 erfolgt ebenfalls autokatalytisch im zytosolischen Molekülkomplex Apoptosom, mit dem die Caspase über ihre CARD (caspase-recruitment domain) Domäne interagieren kann (Pop et al., 2006; Strasser et al., 2000).

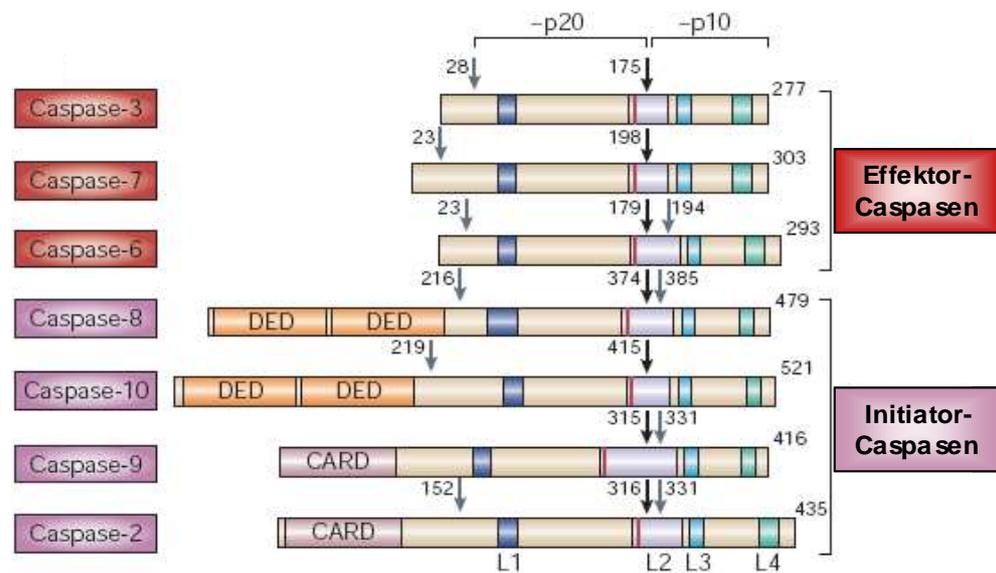


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung der humanen apoptotischen Caspasen

(modifiziert nach Riedl, 2004)

Die humanen Caspasen werden in Initiatorcaspasen (lila) und Effektorcaspasen (rot) unterteilt. Sie bestehen aus einer großen (p20) und einer kleinen Untereinheit (p10) sowie einer N-terminalen Prodomäne, die bei den Initiatorcaspasen deutlich größer ausfällt und die Rekrutierungsdomäne DED (death effector domain) oder CARD (caspase-recruitment domain) enthält. Die 4 Oberflächenloops L1-L4 der Caspasen bilden das catalytische Zentrum des Enzyms mit dem für die Caspasen spezifischen aktiven Cysteinrest am Anfang von L2. Die p20- und p10-Untereinheiten (UE) bilden zusammen das Caspase-Monomer, die Spaltstelle zwischen den beiden UE ist durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Die grau markierten Pfeile zeigen potentielle Angriffspunkte der Caspasen durch Inhibitorproteine der Apoptose (IAPs), von denen man annimmt, dass sie die Aktivität der Caspase beeinflussen.

Die Effektorcaspasen hingegen besitzen keine Rekrutierungsdomänen. Für Ihre Aktivierung ist eine proteolytische Prozessierung notwendig, die über die aktivierten Initiatorcaspasen erfolgt (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004).

Im Verlauf der Apoptose kommt es zur Spaltung zahlreicher zellulärer Proteine durch Caspasen (Fischer et al., 2003). Die funktionelle Bedeutung dieser Prozessierung ist nicht für jedes einzelne Caspasensubstrat bekannt, in der Summe gehen sie jedoch mit Zellschrumpfung, Kernfragmentierung, Auflösung des Zytoskeletts und Bildung von vesikulären Zellfragmenten inklusive Phosphatidylserinexternalisation als „Eat-me“-Signal einher (Stroh and Schulze-Osthoff, 1998).

Als eines der ersten Substrate wurde das über Caspase 3 geschnittene DNA-Reparaturenzym PARP (Poly-ADP-ribose-Polymerase) identifiziert (Tewari et al., 1995), das durch die Spaltung inaktiviert wird und somit nicht mehr bei einer Bereinigung eventuell aufgetretener DNA-Schäden mitwirken könnte. Außerdem werden u.a. Strukturproteine wie Fodrin (Janicke et al., 1998; Martin et al., 1995) und Lamine (Buendia et al., 1999; Rao et al., 1996) zerlegt, was die typische Schrumpfung der Zelle während der Apoptose verursacht.

Die Aktivierung der Endonuklease CAD (Caspasenaktivierte DNase) erfolgt über Caspase 3-abhängige Spaltung der inhibitorischen Untereinheit ICAD (Sakahira et al., 1998). Die aktive Nuklease spaltet die DNA daraufhin zwischen den Nukleosomen, wobei die für die Apoptose typischen Spaltfragmente von ca. 180 bp Länge entstehen.

2.4 Die zwei Hauptsäulen der Apoptose

In humanen Zellen existieren verschiedene Signalwege, über die Apoptose ausgelöst werden kann. Dabei gibt es zwei Hauptwege, den extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweg, zwischen denen auch Rückkopplungsschleifen existieren sowie weitere Nebenwege der Apoptose, von denen bis dato weder die tatsächliche Bedeutung für den Gesamteffekt noch die genauen Signalwege vollständig erforscht sind.

DNA-Schäden, Zellzyklusdefekte, Entzug von Wachstumsfaktoren oder sonstige massive Stresssituationen lösen in der Zelle typischerweise den intrinsischen bzw. mitochondrialen Zelltodweg aus, was die Aktivierung der Initiatorcaspase 9 zur Folge hat. Der extrinsische Apoptoseweg, auch Todesrezeptorweg genannt, wird über die Familie der Todesrezeptoren vermittelt, wobei es zur Rekrutierung und Aktivierung der Initiatorcaspasen 8 und 10 kommt. Ein ebenfalls wichtiger Sensor für zellulären Stress ist das Endoplasmatische Retikulum (ER). Hierbei scheint es zumindest zwei getrennte Mechanismen zu geben, über die Apoptose ausgelöst werden kann, die „unfolded protein response“ sowie ein Ca^{2+} -Efflux aus dem ER (Ferri and Kroemer, 2001).

Außerdem von Bedeutung ist die Bildung von Ceramid aus Sphingolipiden der Zellmembran durch das Enzym saure Sphingomyelinase nach Bestrahlung oder anderen zellulären Stressfaktoren (Kolesnick and Fuks, 2003; Santana et al., 1996), was ebenfalls zur Apoptose-Induktion führt.

2.4.1 Der intrinsische Zelltodweg übers Mitochondrium (Abbildung 2.3)

Stimuli wie zellulärer Stress, Hypoxie, ionisierende Strahlung oder Behandlung mit Chemotherapeutika führen zur Aktivierung pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine. Als Folge dessen kommt es zur Freisetzung Apoptose-fördernder Faktoren wie Cytochrom c (Cyt c), Smac/DIABLO und AIF aus dem Mitochondrium ins Zytoplasma (Kluck et al., 1997; Verhagen et al., 2000). Dies geht oft mit einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials einher (Cory et al., 2003).

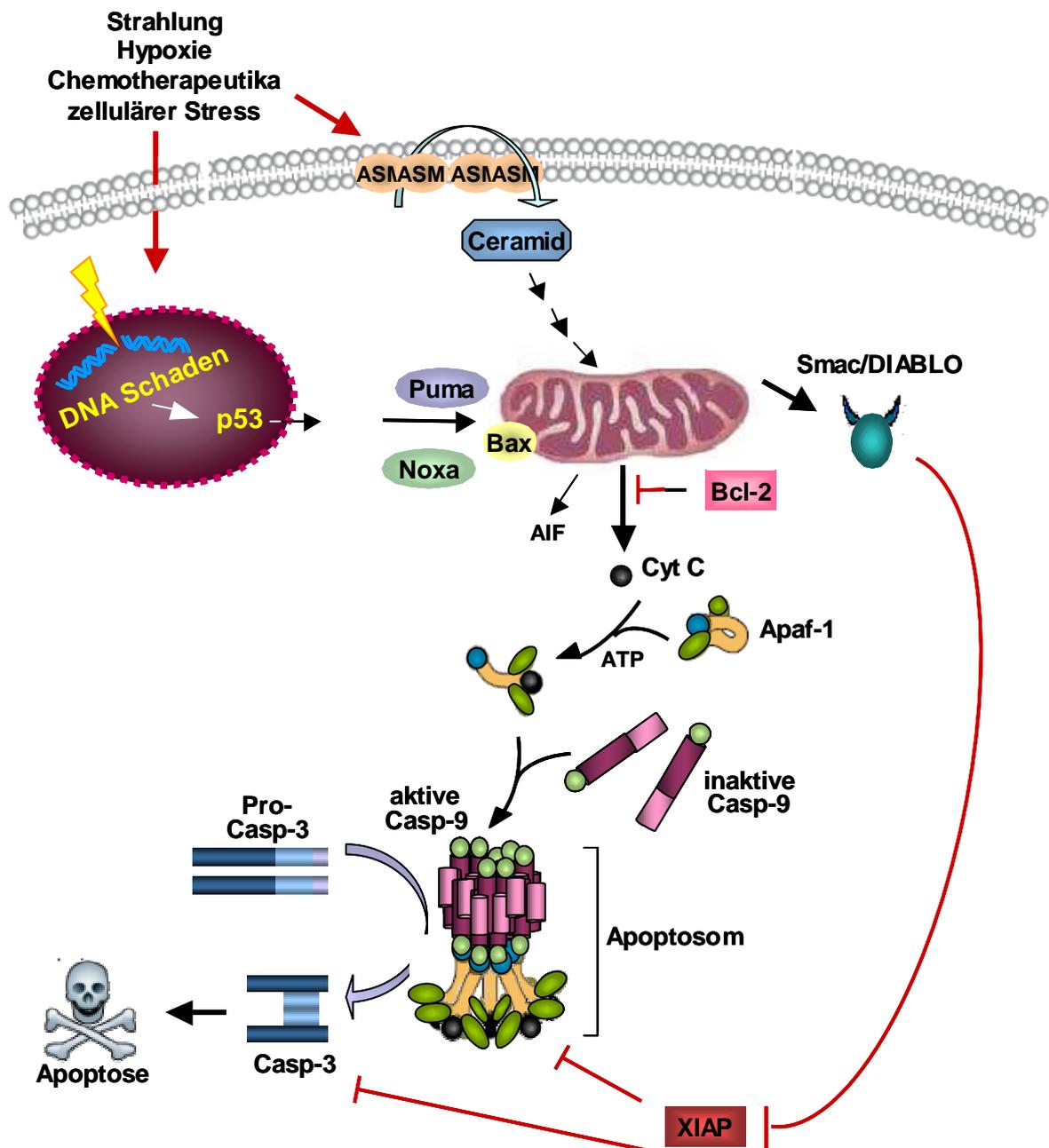


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung des intrinsischen Zelltodwegs

Strahlung, Behandlung mit Chemotherapeutika oder sonstige zelluläre Stresssituationen können den intrinsischen Apoptoseweg induzieren. Dabei kommt es über Signalwege nach DNA-Schäden oder Ceramidfreisetzung aus der Zellmembran zur Aktivierung von Mitgliedern der Bcl-2 Familie. Dies hat Veränderungen am Mitochondrium zur Folge, die in die Freisetzung von Cytochrom c, AIF und Smac/DIABLO münden. Cytosolisches Cytochrom c bildet mit mehreren Apaf-1 und Procaspase 9 Proteinen das Apoptosom, an dem die Prozessierung der Caspase 3 erfolgt. Aktive Caspase 3 löst schließlich durch die Spaltung ihrer Substrate die typischen Apoptoseveränderungen der Zelle aus. Die Aktivierung der Caspasen 3 und 9 kann durch zytosolisches XIAP gehemmt werden, ein Prozess, der wiederum durch Smac/DIABLO aus dem Mitochondrium verhindert werden kann.

Freigesetztes Cyt c kann an das Adapterprotein Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) binden und unter ATP-Spaltung dessen Oligomerisierung einleiten (Li et al., 1997; Saleh

et al., 1999). Bei Apaf-1 wird nämlich im inaktiven Zustand die N-terminale CARD-Domäne im Molekül durch andere Strukturen (WD40 repeats) verdeckt. Erst die Bindung von Cyt c ermöglicht die Freisetzung dieser Domäne an die Oberfläche und eine Bindung von ATP unter Hydrolyse zu ADP verhindert eine erneute Verdeckung der CARD-Domäne (Adrain et al., 1999). Am entstandenen oligomeren Apaf-1-Komplex werden nun Caspase 9 Proteine über homophile Wechselwirkungen zwischen den CARD-Domänen von Apaf-1 und Procaspase 9 rekrutiert, wobei das sogenannte Apoptosom, ein hochmolekularer Komplex der Größe von ca. 700 kDa, entsteht (Cain et al., 2000; Zou et al., 1999). Die im Apoptosom gebundene Caspase 9 interagiert mit einem weiteren Caspase 9 Protein aus dem Zytoplasma infolgedessen es nach dem Prinzip der induzierten Proximität zur autoinduzierten Prozessierung und damit Aktivierung der Caspase 9 kommt (Pop et al., 2006; Salvesen and Dixit, 1999). Dabei kann die Caspase 9 zwar autoproteolytisch gespalten werden, muss aber nicht, denn auch in ungespaltener Form ist die Caspase 9 als Dimer nach konformationsbedingten Umlagerungen im Molekül aktiv (Bao and Shi, 2007; Riedl and Salvesen, 2007). Dies ist sehr wahrscheinlich wegen der langen Linkerverbindungen zwischen den Untereinheiten im Protein möglich. Der Apoptosomkomplex ist allerdings für die volle katalytische Aktivität der Caspase 9 essentiell (Rodriguez and Lazebnik, 1999).

Die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 und somit die Auslösung der Caspasen-Kaskade geschieht ebenfalls am Apoptosom. Sie beginnt höchstwahrscheinlich mit einer Rekrutierung der Effektorcaspasen ans Apoptosom über die WD40 repeats von Apaf-1 (Cain et al., 1999) und mündet in der Prozessierung der Caspasen mit Spaltung ihrer Linker-Region durch die im Apoptosom aktive Caspase 9.

Die beim Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ebenfalls freigesetzten Smac/DIABLO Proteine binden an die Caspaseninhibitoren IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) und hemmen dadurch deren anti-apoptotische Aktivität (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000). Die IAPs bilden eine evolutionär konservierte Gruppe von Apoptose-Inhibitoren zu deren humanen Mitgliedern u.a. XIAP, survivin, livin, c-IAP1 und 2 sowie NAIP zählen (Vaux and Silke, 2005). XIAP kann die Caspasen 3,7 und 9 über direkte Wechselwirkung inhibieren (Deveraux and Reed, 1999; Deveraux et al., 1997) und hemmt dadurch die Caspasen-Kaskade. Durch Ausschüttung von Smac/DIABLO aus dem Mitochondrium kann dies verhindert werden und die Apoptose-Induktion ungehindert stattfinden (Du et al., 2000) (Abbildung 2.3).

Das aus dem Mitochondrium entlassene AIF (Apoptosis inducing factor) Protein transloziert in den Zellkern und fördert dort eine grobe Fragmentierung der DNA als ersten Schritt einer Caspasen-unabhängigen Form der Apoptose (Daugas et al., 2000).

2.4.2 Der extrinsische Zelltodweg über Aktivierung der Todesrezeptoren

Die Familie der Todesrezeptoren ist zuständig für die Vermittlung des extrinsischen Apoptosewegs. Dabei wird nach Bindung des passenden Liganden ein toxisches Signal generiert und ins Zellinnere weitergeleitet. Die Todesrezeptoren bilden eine Untergruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie und bestehen aus bislang sechs Familienmitgliedern (Abbildung 2.4), dem CD95/Fas/Apo-1 (Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992), TNF-R1 (Brockhaus et al., 1990), TRAMP/DR3/APO-3 (Chinnaiyan et al., 1996; Kitson et al., 1996), TRAIL-R1/DR4/APO-2 und TRAIL-R2/DR5 (MacFarlane et al., 1997; Pan et al., 1997b) sowie DR6 (Pan et al., 1998). Allen Familienmitgliedern ist eine intrazelluläre Death Domain (DD) gemeinsam, die wegen der möglichen Rekrutierung von Adapterproteinen essentiell für die Weiterleitung des zytotoxischen Signals ist (Itoh and Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993). Außerdem besitzen alle Todesrezeptoren Cystein-reiche extrazelluläre Domänen, die für die Bindung ihrer Liganden entscheidend sind (Smith et al., 1994).

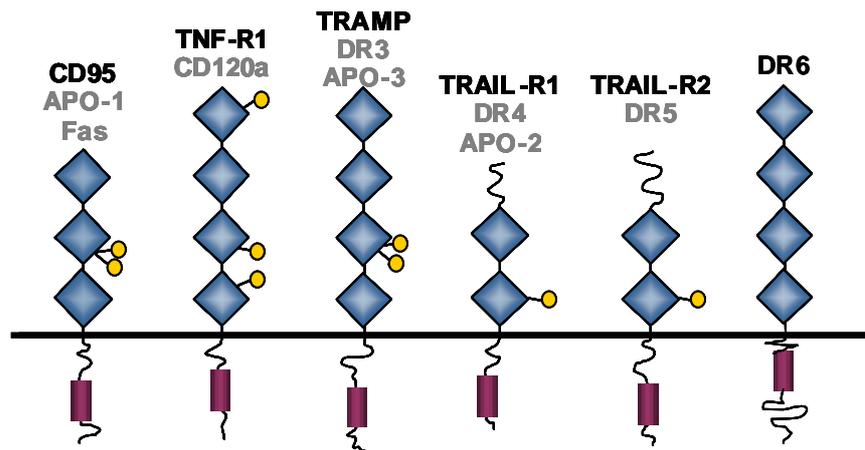


Abbildung 2.4 Schematische Darstellung der Todesrezeptoren

(modifiziert nach Schulze-Osthoff, 1998)

Die Hauptmerkmale, die die dargestellten Mitglieder der Todesrezeptoren zu einer Familie zusammenfassen, sind mehrere Cystein-reiche extrazelluläre Domänen (blaue Rauten), eine Transmembranregion sowie eine intrazelluläre Death Domain DD (roter Zylinder). Über die Cystein-reichen Domänen wird die Interaktion mit den Rezeptor-Liganden reguliert, während die DD für die Weiterleitung der zytotoxischen Signale ins Zellinnere zuständig sind.

Außer den Todesrezeptoren besitzen auch ihre Liganden CD95L (Ligand für CD95-R), TNF- α (Ligand für TNF-R1), TRAIL (Ligand für TRAIL-R1 und TRAIL-R2) und TWEAK (Ligand für TRAMP-R) untereinander strukturelle Homologien, weswegen sie in der TNF-Superfamilie zusammengefasst werden (Hymowitz et al., 2000). Alle Liganden bestehen aus drei identischen Untereinheiten und können so als Homotrimer bei Bindung an die Todesrezeptoren deren Oligomerisierung bewirken (Banner et al., 1993; Beutler and van Huffel, 1994).

Da das CD95-Rezeptor-System bisher am besten untersucht worden ist, wird im folgenden der extrinsische Apoptoseweg (Abbildung 2.5) beispielhaft an diesem Rezeptor erläutert: Über die Bindung des trimeren CD95-Liganden an seinen Rezeptor leitet er dessen Multimerisierung ein, was ein Clustern der Death Domänen zur Folge hat (Nagata and Golstein, 1995). Anschließend kann das Adapterprotein FADD (Fas-associated death domain protein) über homophile Wechselwirkungen seiner DD an den CD95-Rezeptorkomplex binden. Der dabei entstandene Großkomplex wird als DISC (death inducing signaling complex) bezeichnet. Mittels seiner zweiten Interaktionsdomäne DED (death effector domain) ist FADD in der Lage, Pro-Caspase 8 oder 10 zu binden (Kischkel et al., 1995). Am DISC werden infolge dessen mehrere Proscaspase 8/10-Moleküle rekrutiert und einander räumlich angenähert. Dies ist trotz geringer initialer katalytischer Aktivität der Caspasen 8 und 10 ausreichend, um über den Mechanismus der induzierten Proximität eine weitere autoproteolytische Prozessierung und Aktivierung der Caspasen auszulösen (Martin et al., 1998; Muzio et al., 1998). Aktive Caspase 8 spaltet dann Caspase 3, worauf es zur Aktivierung des apoptotischen Programms kommt.

Über Caspase 8 wird jedoch ebenfalls eine Verbindung zum mitochondrialen Zelltodweg hergestellt. Die aktive Caspase 8 kann Bid in tBid (truncated Bid) spalten, welches durch Aktivierung von Bax und Bak die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium bewirkt (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Auf diese Weise kann eine Verstärkung des Todesrezeptorwegs über das Mitochondrium erreicht werden, die insbesondere bei Stimuli mit schwacher initialer Caspase 8 Aktivierung von entscheidender Bedeutung für die Gesamtantwort der Zelle ist (Rudner et al., 2005).

Die extrinsische Signalübertragung der Apoptose kann auf verschiedenen Ebenen negativ beeinflusst werden. Zum einen gibt es neben den oben erwähnten sechs Todesrezeptoren noch die sogenannten Decoy-Rezeptoren, die ebenso zur TNF-Superfamilie zählen. Sie besitzen ebenfalls Cystein-reiche extrazelluläre Domänen, über die sie Liganden binden können, ihnen fehlt jedoch die intrazelluläre DD zur Signalweiterleitung (Ashkenazi and Dixit, 1998; Schulze-Osthoff et al., 1998). Dadurch können sie pro-apoptotische Signale abfangen und die Gesamtantwort der Apoptose negativ modulieren (Pan et al., 1997a; Sheridan et al., 1997).

Außer diesem extrazellulären Eingriff in die rezeptorvermittelten Signalwege besteht eine weitere Regulationsmöglichkeit intrazellulär über das Protein FLIP (FLICE inhibitory protein) (Thome et al., 1997). Hierbei handelt es sich um ein Protein, das große Homologien zur Caspase 8 aufweist. Durch seine DED-Domäne kann es an Caspase 8 binden, im Gegensatz zur Caspase besitzt es jedoch lediglich eine verkürzte bzw. katalytisch inaktive Caspasendomäne (Roth and Reed, 2004; Tschopp et al., 1998). Dadurch können FLIPs an

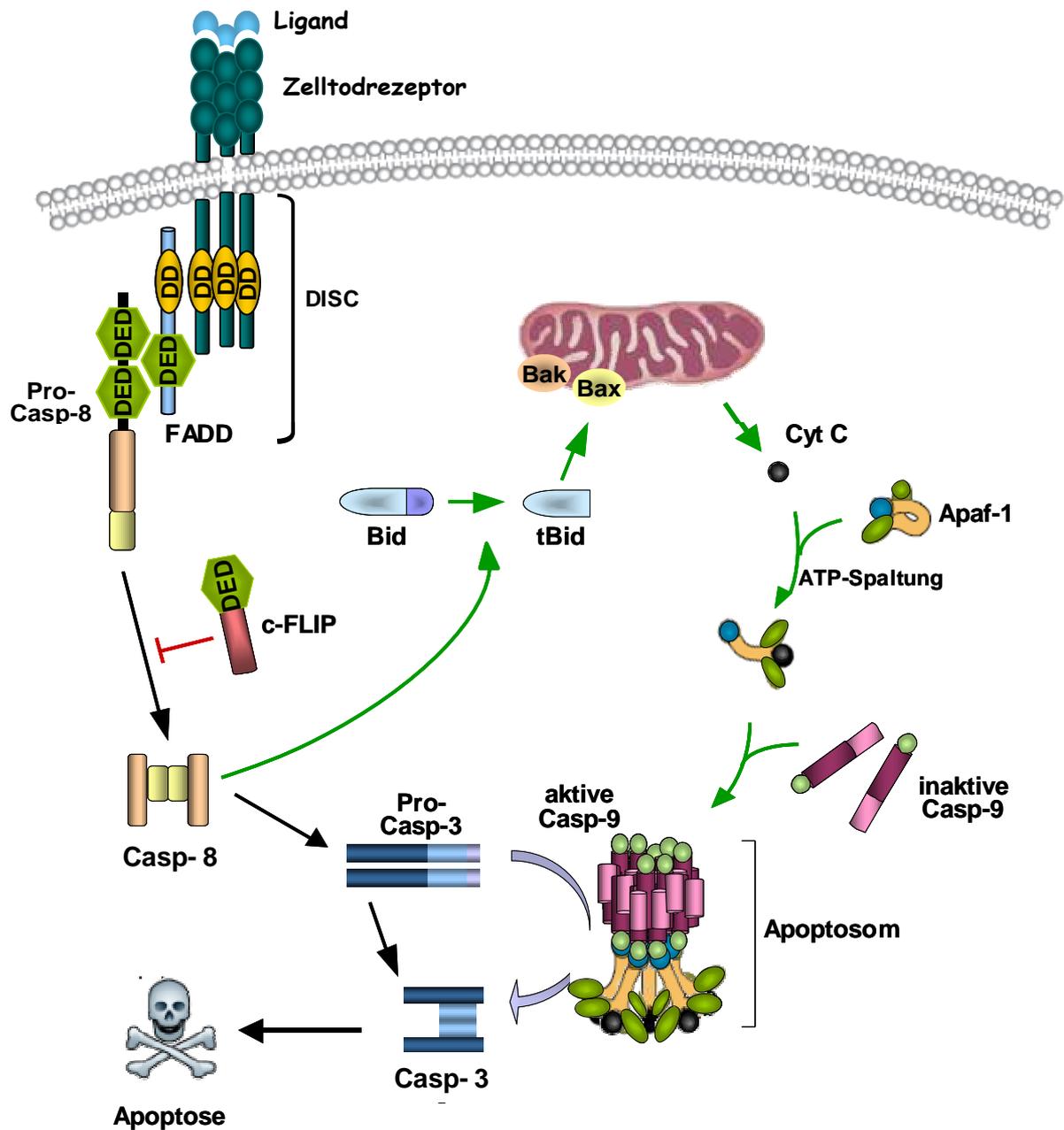


Abbildung 2.5 Schematische Darstellung des extrinsischen Zelltodwegs

Der extrinsische Zelltodweg wird über die Familie der Todesrezeptoren eingeleitet. Durch Bindung des Liganden an seinen Rezeptor wird eine Trimerisierung von Rezeptoren ausgelöst und über die DD (death domain) das Adaptormolekül FADD rekrutiert. Dabei entsteht der sog. Death inducing signaling complex (DISC). Mittels der DED Domäne von FADD zieht DISC Pro-Caspase 8 Proteine an den Rezeptorkomplex heran, die nach dem Prinzip der induzierten Proximität aktiviert werden. Aktive Caspase 8 initiiert durch Prozessierung der Caspase 3 anschließend die Caspasen-Kaskade und stellt außerdem über Spaltung von Bid eine Verbindung zum mitochondrialen Zelltodweg her. tBid veranlasst über Aktivierung von Bax und Bak am Mitochondrium ein Austreten von Cytochrom c, wodurch der extrinsische Zelltodweg über die mitochondriale Feedback-Schleife verstärkt werden kann. Die Aktivierung der Caspase 8 am DISC kann durch das Protein cFLIP inhibiert werden.

Caspase 8 Proteine am DISC binden und so deren Aktivierung verhindern (Irmeler et al., 1997; Kataoka, 2005).

2.5 Die Bedeutung des Mitochondriums für die Apoptose

2.5.1 Die Bcl-2-Proteinfamilie

Die Familie der Bcl-2 Proteine zählt mittlerweile über 20 Mitglieder (Walensky, 2006) und lässt sich in zwei funktionelle Gruppen einteilen, die pro-apoptotisch wirksamen sowie die anti-apoptotisch wirksamen Familienmitglieder. Dabei werden die pro-apoptotischen Proteine nach ihrer Struktur in zwei weitere Gruppen differenziert, die Multidomän-Proteine und die BH3-only Proteine (Cory et al., 2003). Allen Mitgliedern der Familie gemeinsam ist die Anwesenheit von bis zu 4 Bcl-2-Homologie-Domänen (BH1-4) je Protein und obwohl sich die Aminosäuresequenz der einzelnen Proteine abgesehen von den BH2-Domänen deutlich unterscheidet, haben doch alle eine ähnliche Tertiärstruktur (Lalier et al., 2007).

Zu den anti-apoptotischen Mitgliedern der Familie zählen neben den bisher am besten untersuchten Proteinen Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w und Mcl-1 auch A1/Bfl-1, Boo/Diva und NRH/NRH-13. Mit Ausnahme von Mcl-1 und A1, die lediglich die Domänen BH1 bis BH3 besitzen, zeichnen sich alle anderen anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine durch alle vier BH-Domänen aus (Strasser, 2005; Walensky, 2006) (Abbildung 2.6). Die zelluläre Funktion der anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine ist die Inhibierung der Multidomän-pro-apoptotischen Bcl-2 Proteine sowie die Inhibierung verschiedener BH3-only Proteine in gesunden Zellen, um das Überleben der Zelle zu gewährleisten (Certo et al., 2006; Willis and Adams, 2005). In die Gruppe der Multidomän-pro-apoptotischen Proteine gehören bisher Bax, Bak und Bok, wobei die Expression von letzterem wahrscheinlich auf reproduktive Organe beschränkt ist (Hsu et al., 1997). Die Proteine dieser Subgruppe besitzen die Domänen BH1 bis BH3 und einen C-terminalen hydrophoben Schwanz. Man nimmt mittlerweile an, dass die wesentliche Aufgabe dieser Proteine bei der Apoptose-Induktion in der Bildung von Poren besteht, über die pro-apoptotische Faktoren aus dem Mitochondrium ins Zytoplasma entlassen werden können (siehe Abschnitt 2.4.3). Die letzte Untergruppe wird schließlich von den BH3-only Proteinen gebildet, einer sehr heterogenen Gruppe, die sich abgesehen von der für die apoptotische Funktion essentiellen BH3-Domäne in ihrer Sequenz stark voneinander unterscheiden (Willis and Adams, 2005). Manche der BH3-Proteine verfügen zusätzlich zu ihrer BH3-Region noch über eine Transmembrandomäne im Protein (siehe Abbildung 2.6).

Die BH3-only Gruppe zählt mittlerweile 14 Mitglieder, unter denen die Proteine Bid, Bad, Bim, Puma, Noxa, Bik, Blk, Bmf und Bnip3 sind (Walensky, 2006). Ihre Funktion liegt in der auf Apoptose ausgerichteten Modulation der inhibierenden Wirkung von anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinen auf Bak und Bax (Adams and Cory, 2007; Willis et al., 2007). Dafür wurden verschiedene Modelle entworfen, auf die im nächsten Kapitel näher eingegangen wird.

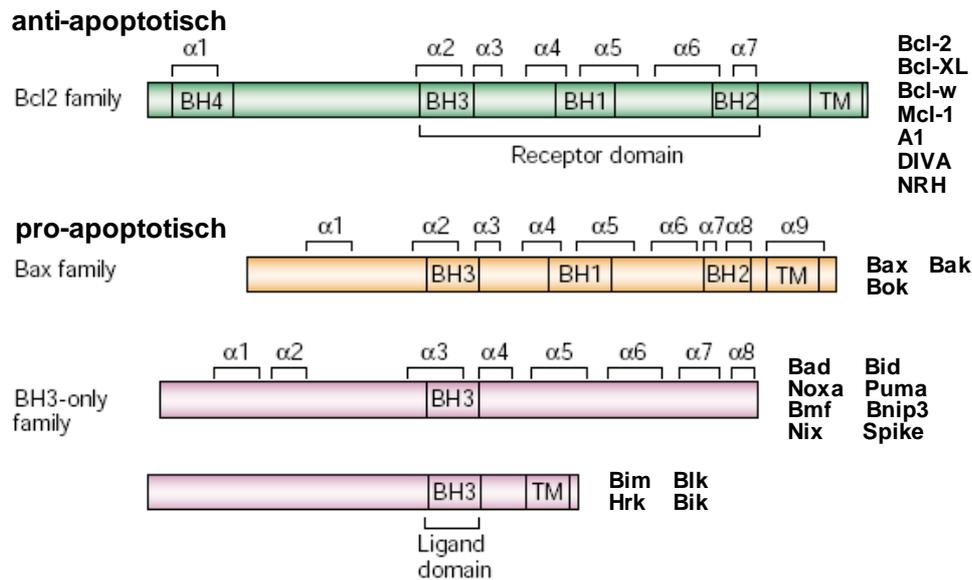


Abbildung 2.6 Schematische Darstellung der Bcl-2 Familie

(modifiziert nach Cory und Adams, 2002)

Die Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie unterscheiden sich durch die Anzahl ihrer BH-Domänen. So besitzen die anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine meist 4 BH-Domänen, mit Ausnahme von Mcl-1 und A1, denen die BH4 Domäne fehlt. Die pro-apoptotischen Proteine der Bax-Familie tragen die BH-Domänen 1 bis 3, während die Untergruppe der BH3-only Proteine lediglich eine BH3-Domäne aufweist. Einige der BH3-only Proteine verfügen zusätzlich über eine Transmembrandomäne im C-terminalen Proteinbereich.

2.5.2 Zusammenspiel der Bcl-2-Familienmitglieder am Mitochondrium

Für die Interaktion der Bcl-2 Proteine zur Apoptoseregulation gib es zwei Hauptmodelle, das „direct activation“ Modell und das „displacement“ Modell. Beides sind sehr gute Entwürfe, die jeweils zahlreiche erfasste Teilaspekte berücksichtigen, aber dennoch nicht alle Beobachtungen restlos erklären können.

Das „direct activation“ Modell (Certo et al., 2006; Kuwana et al., 2005; Letai et al., 2002) (Abbildung 2.7 A) basiert auf der Idee, dass Bax und Bak alleine inaktiv sind und durch sogenannte Aktivatoren aktiviert werden müssen. Als solche kommen lediglich die BH3-only Proteine Bim und Bid in Frage, obwohl Puma möglicherweise ebenfalls diese Funktion übernehmen kann (Cartron et al., 2004). Die BH3-only Aktivatoren sind jedoch im Normalfall von anti-apoptotischen Mitgliedern der Familie durch Bindung besetzt und können somit Bak und Bax nicht aktivieren. Damit ist das Überleben der Zelle gesichert. Im Zuge der Apoptose müssen die Aktivator-BH3-only Proteine also freigesetzt werden und das geschieht über die sogenannten Sensitizer. Die Gruppe der Sensitizer-BH3s setzt sich aus den restlichen BH3-only Proteinen Bad, Bik, Noxa, Puma, Bmf, Bnip3 und Hrk zusammen. Diese ersetzen die Aktivatoren an der Bindestelle der anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine. Dadurch werden Bim

bzw. Bid frei und können so Bak bzw. Bax zur Oligomerisierung anregen. Die Multidomänproteine Bax und Bak funktionieren in diesem Modellsystem redundant (Wei et al., 2001). Der Hauptunterschied des „displacement“ Modell (Leu et al., 2004; Willis and Adams, 2005; Willis et al., 2007) (Abbildung 2.7 B) besteht in der Annahme, dass Bak und Bax allein grundsätzlich aktiv sind. Um im Normalfall das Überleben der Zelle zu sichern, müssen sie deshalb inaktiviert werden, weswegen sie kontinuierlich durch Bindung an anti-apoptotische

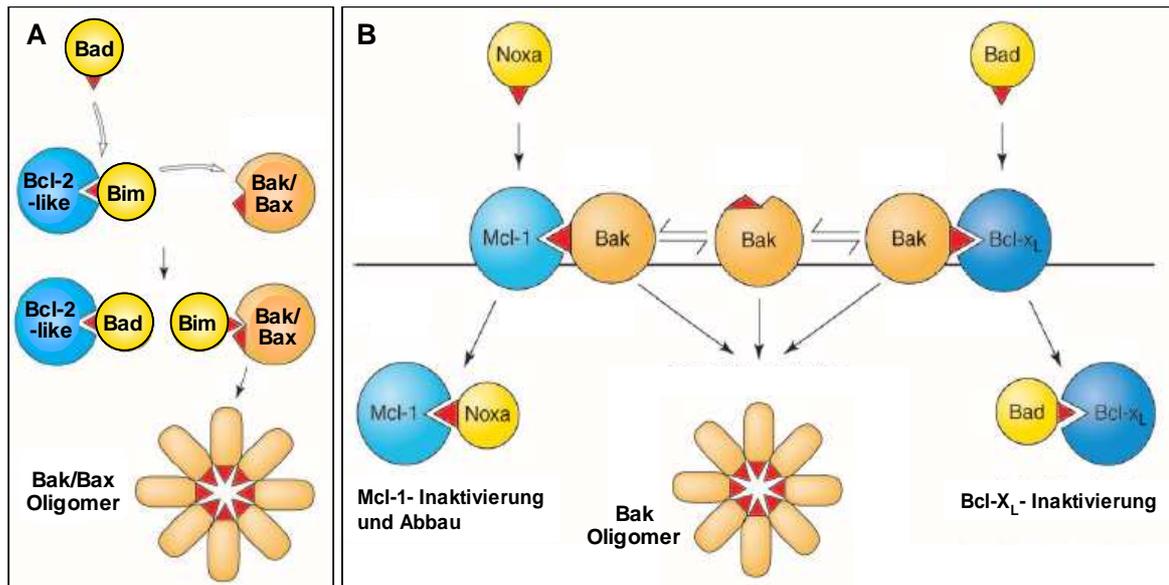


Abbildung 2.7 Modelle für die BH3-only Proteininteraktion mit Bak und Bax

(modifiziert nach Willis und Adams, 2005)

Beim „direct activation“ Modell (A) werden die BH3-Proteine in sog. Aktivatoren (Bim, Bid) und Sensitizer (alle übrigen BH3s) unterteilt. Dabei binden die Sensitizer-BH3s an anti-apoptotische Bcl-2-Proteine, wodurch die Aktivator-BH3s frei werden und die Oligomerisation von Bax und Bak induzieren können. Das „displacement“ (B) Modell geht davon aus, dass Bak und Bax durch anti-apoptotische Bcl-2-Proteine gebunden und dadurch inaktiv gehalten sind. BH3-Proteine können Bax und Bak dann aktivieren, indem sie diese durch Bindung an die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine freisetzen. Dabei müssen zumindest für Bak alle inhibierenden Bcl-2-Proteine (Mcl-1 und Bcl-x_L) durch Bindung von BH3-only-Proteinen neutralisiert werden.

Bcl-2 Proteine inhibiert werden. Dabei binden jedoch nur Bcl-x_L und Mcl-1 an Bak und für Bax konnte kein eindeutiger Bindepartner identifiziert werden (Leber et al., 2007). Damit Apoptose stattfinden kann, muss im Fall von Bak sowohl Mcl-1 als auch Bcl-x_L durch BH3-only Proteine verdrängt werden (Willis et al., 2005) und man nimmt einen ähnlichen Mechanismus für Bax an. Spezielle Bindungsexperimente mit BH3-Peptiden zeigten, dass Bim und Puma an Mcl-1, Bcl-2 und Bcl-x_L binden können, während Noxa nur an Mcl-1 und Bad an Bcl-2 und Bcl-x_L bindet (Chen et al., 2005). Bei der Inaktivierung der Bcl-2 Proteine liegen jedoch unterschiedliche Mechanismen vor. Nach Bindung von Noxa an Mcl-1 bewirkt es dessen Abbau im Proteasom in Abhängigkeit von der Mule E3 Ubiquitin Ligase (Warr et al., 2005; Zhong et al., 2005). Bindung von Bad an Bcl-x_L hingegen führt nicht zu dessen

Abbau sondern vielmehr zu einer Einbettung in die Mitochondrienmembran wodurch es zur Inaktivierung kommt (Jeong et al., 2004).

Für das „displacement“ Modell spricht auf jeden Fall die Tatsache, dass Bak in Komplexen mit Mcl-1 und Bcl-x_L gefunden wird (Willis et al., 2005), für das „direct activation“ Modell sprechen Untersuchungen, in denen die Kombination aus Bad und Noxa BH3 Peptiden kein Cytochrom c aus isolierten Mitochondrien freisetzen konnten (Certo et al., 2006). Es könnte allerdings sein, dass es je nach Zellsystem auch Unterschiede in den Abläufen der Apoptose-Initiierung gibt und in einigen Zellen der Weg eher Richtung Zelltod gebahnt ist - d.h. Bak und Bcl dort auch ohne Bim und Bid aktiv sind.

2.5.3 Die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium

Der entscheidende Schritt im intrinsischen Zelltodweg besteht in der Freisetzung von apoptotischen Faktoren wie Cytochrom c (Cyt c) aus dem Mitochondrium. Die genauen Mechanismen der dabei ablaufenden Prozesse werden allerdings bis heute noch kontrovers diskutiert. Es wurde ursprünglich vorgeschlagen, dass die Öffnung der Megapore PTP (permeability transition pore) an der inneren Membran ursächlich für ein Ausschütten von Cyt c ist (Kroemer and Reed, 2000; Marzo et al., 1998; Skulachev, 1996). Die PTP ist ein Multiproteinkomplex aus verschiedenen Komponenten, der die äußere und innere Mitochondrienmembran durchspannt. Hauptbestandteile sind die Kanäle VDAC (voltage-dependent anion channel) in der äußeren und ANT (adenine-nucleotide translocator) in der inneren Mitochondrienmembran sowie das Protein CypD (cyclophilin D), das in die Matrix des Mitochondriums eingebettet ist (Green and Kroemer, 2004). Ein Öffnen der PTP an der inneren Membran führt zu einem Anschwellen der Matrix, was in der Ruptur der äußeren Membran und der Freisetzung von Proteinen mündet (Kinnally and Antonsson, 2007). Obwohl gezeigt werden konnte, dass Bindung von Bax an ANT zur Öffnung der PTP an der inneren Mitochondrienmembran führt (Martinou et al., 2000), ist die primäre Beteiligung am mitochondrialen Zusammenbruch weiter umstritten, da kürzliche Untersuchungen die PTP in direkten Zusammenhang mit Nekrose und nicht Apoptose brachten (Baines et al., 2005; Nakagawa et al., 2005).

Neben der PTP gibt es einen weiteren wichtigen Kanal in der äußeren Mitochondrienmembran, den MAC (mitochondrial apoptosis-induced channel) (Pavlov et al., 2001). Der Kanal kann aus Bax-Oligomeren allein (De Giorgi et al., 2002) oder mit tBid gebildet werden (Chipuk et al., 2006; Kuwana et al., 2002) sowie aus Heterooligomeren mit Bak und Bax (Chipuk et al., 2006; Wei et al., 2001). In normalen gesunden Zellen liegt Bax als monomeres

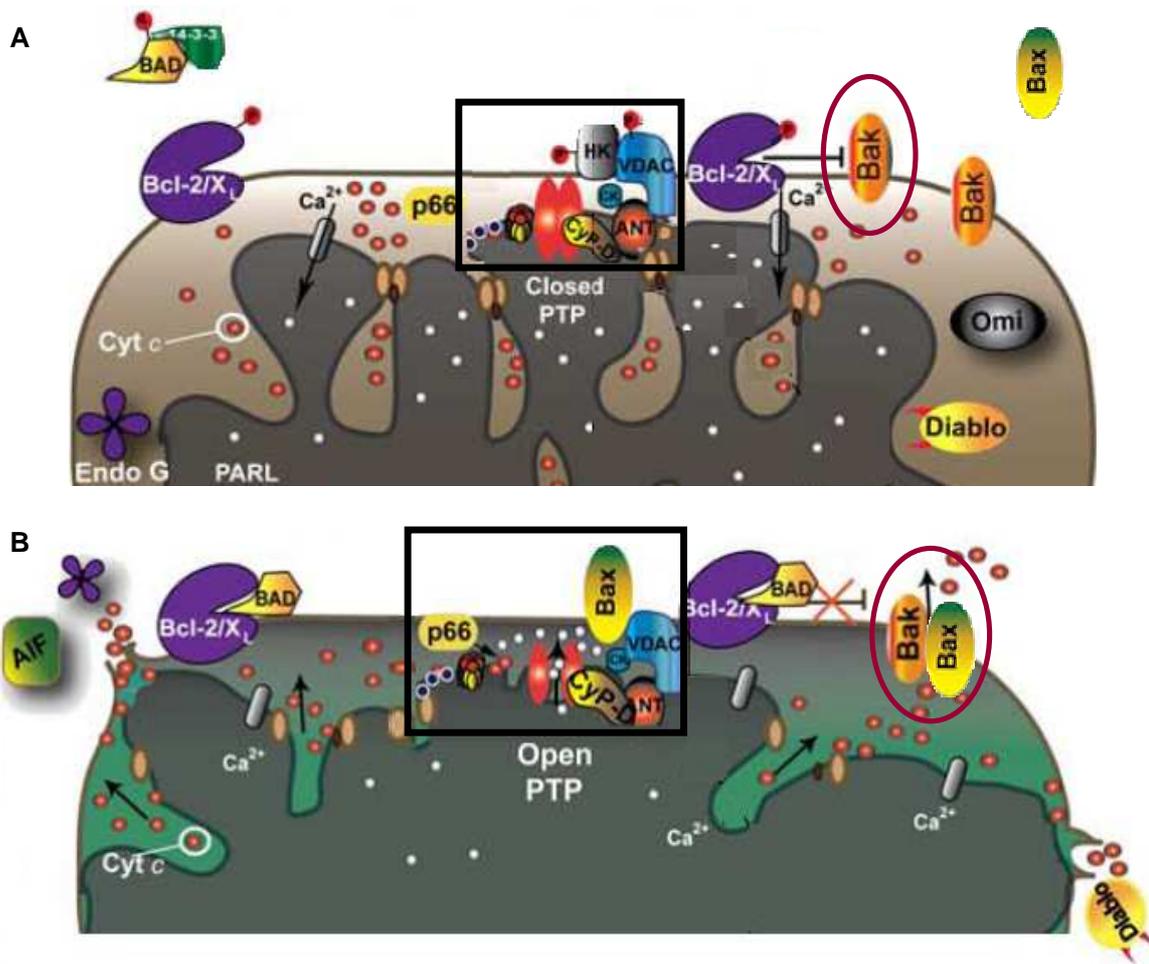


Abbildung 2.8 Schematische Darstellung der Cytochrom c Freisetzung aus dem Mitochondrium (modifiziert nach Rasola und Bernardi, 2007)

In normalen gesunden Zellen **(A)** liegt Bax inaktiv im Zytoplasma vor und phosphoryliertes Bad wird durch 14-3-3 ebenfalls im Zytoplasma festgehalten. Bak in der mitochondrialen Membran wird durch anti-apoptotische Bcl-2-Proteine gehemmt. Die PTP befindet sich in einem geschlossenen Zustand mit an VDAC gebundener Hexokinase (HK). Als Folge des Apoptose-signalings in der Zelle **(B)** wird Bax aktiviert und kann zum Mitochondrium zur Porenbildung translozieren. Die Hexokinase löst sich vom VDAC ab und Bad sowie andere BH3-only Proteine können die inhibierende Wirkung anti-apoptotischer Bcl-2 Proteine auf Bak aufheben und somit ebenfalls zur Porenbildung beitragen. Dadurch kommt es an der äußeren Mitochondrienmembran zur Porenöffnung (rotes Oval) und Freisetzung von Proteinen wie Cyt c, AIF, DIABLO und EndoG. Unterstützt wird dieser Prozess durch die Bindung von Bax an VDAC, was eine Öffnung der PTP (schwarzer Kasten) an der inneren mitochondrialen Membran zur Folge hat mit anschließender Schwellung der Matrix und Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran.

Protein im Zytoplasma vor und besitzt keine kanalbildenden Eigenschaften (Hsu and Youle, 1998). Wird Bax zu Beginn der Apoptose jedoch aktiviert, transloziert es zum Mitochondrium, insertiert dort in die äußere Mitochondrienmembran und oligomerisiert mit weiteren Bax- oder Bak-Molekülen zu Kanälen (Antonsson et al., 2000), aus denen Proteine wie Cytochrom c, AIF, Smac/DIABLO und EndoG freigesetzt werden.

Tiefere Untersuchungen zu der Frage, ob MAC der einzige Schlüssel zur Cyt c-Freisetzung ist oder ob PTP ebenfalls eine Rolle spielt, kamen kürzlich zu der These, dass

MAC der prinzipielle Weg zur Apoptose ist und die Öffnung der PTP über Bindung von Bax an ANT eine Konsequenz der Apoptose, die eine vollständige Exekution des Zelltods sicherstellt (Kinnally and Antonsson, 2007).

2.6 Die Zellantwort nach ionisierender Strahlung

Durch Einwirken ionisierender Strahlung auf Zellen kommt es innerhalb der Zelle zu einer über direkte Wechselwirkungen zu Strangbrüchen der DNA, zum anderen indirekt über Bildung freier Radikale zu zahlreichen Beeinträchtigungen der DNA. Die Folge sind neben Doppel- und Einzelstrangbrüchen durch Spaltung der Phosphatesterbindungen oder Basenfreisetzung bei Spaltung von Zucker-Basen-Bindungen auch zahlreiche Basendefekte wie Desaminierung oder Oxidierung des Pyrimidinringes und Spaltung von Purinringen sowie Kettenvernetzung über Bildung intra- und intermolekularer Bindungen (Steel, 1993).

Durch Doppelstrangbrüche werden die Kinasen ATM und ATR aktiviert (Ismail et al., 2005). Diese Sensoren können Zellzyklusarrest und Reparaturmechanismen einleiten und falls die Reparatur scheitert, auch Apoptose triggern (Roos and Kaina, 2006). So wird durch ATM-abhängige Phosphorylierung des Checkpoint-Proteins Chk2, die Kinase cdc25 aktiviert, die für den S-Phase-Kontrollpunkt verantwortlich ist (Lavin et al., 2005). Außerdem führt über ATM und ATR die Aktivierung der Checkpointkinasen Chk1 und Chk2 zu einem Cdc2-CyclinB1- oder cdc25-CDK1-vermittelten Zellzyklusarrest (Kastan and Bartek, 2004; Kastan et al., 2000). Andererseits induzieren ATM und ATR auch die Phosphorylierung von H2AX zu γ -H2AX (Burma et al., 2001; Wang et al., 2005; Ward and Chen, 2001), wodurch Plattformen für zahlreiche weitere Proteine entstehen, die mit der DNA-Reparatur assoziiert sind (Paull et al., 2000). Bei der Reparatur der Schäden selbst sind sowohl Mechanismen der Homologen Rekombination (HR) als auch der Nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ) von Bedeutung (Bernstein et al., 2002; Pastwa and Blasiak, 2003; Tuteja and Tuteja, 2001), wobei die NHEJ fehlerhaft ist und daher öfters in Zusammenhang mit nachfolgender Apoptose steht (Genovese et al., 2006; Roos and Kaina, 2006). Schließlich wird über ATM und ATR ebenfalls das Protein p53 angesteuert, das als zentraler Regulator zum einen den Arrest über transkriptionelle Induktion von p21 verstärken, zum anderen aber auch Apoptose einleiten kann (Gudkov and Komarova, 2003). In letzterem Fall kann p53 die Transkription der pro-apoptischen Proteine Bax, Puma und Noxa hochregulieren sowie die Translokation von Bax zum Mitochondrium positiv beeinflussen (Lane, 1992; Schuler and Green, 2001; Vousden and Lu, 2002). Zusätzlich zu der p53-vermittelten Apoptose nach Strahlenschäden, gibt es auch einen p53-unabhängigen Weg über das Protein p73. Dabei konnte gezeigt

werden, dass p73 ebenfalls die Proteine Bax, Puma und Noxa transkriptionell aktiviert sowie die Translokation von Bax zum Mitochondrium induziert (Flinterman et al., 2005; Melino et al., 2004).

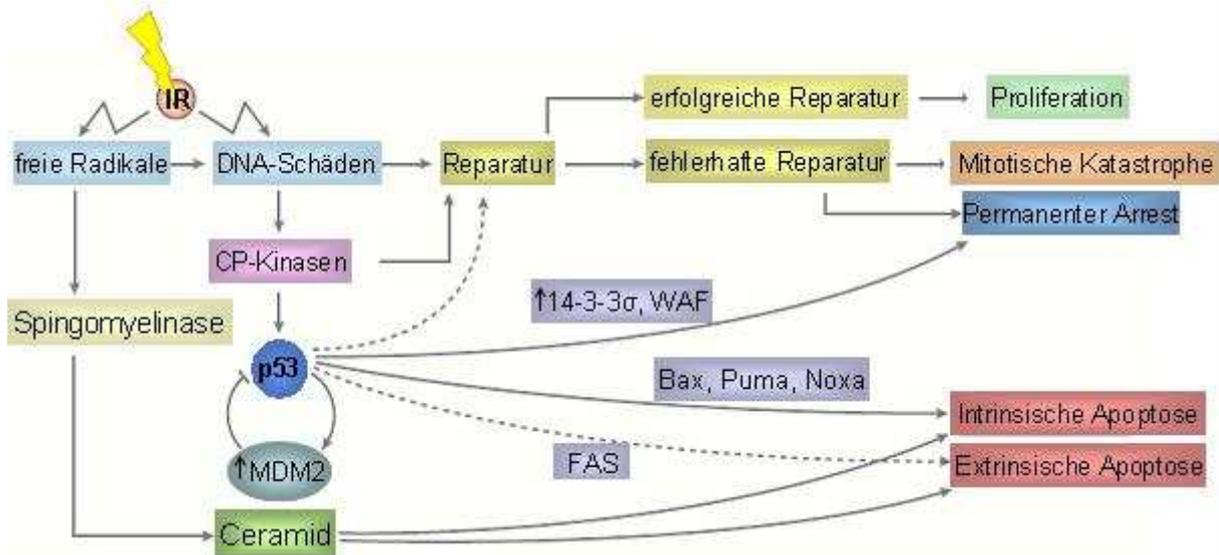


Abbildung 2.9 Zellantwort nach Bestrahlung (modifiziert nach Gudkov, 2003)
 Strahleninduzierte DNA-Schäden führen zur Induktion von DNA-Reparatur verbunden mit einem Kurzzeit-Arrest der Zelle in G2/M. Bei erfolgreicher Reparatur proliferiert die Zelle weiter, bei fehlerhafter Reparatur endet die Zelle in permanentem Arrest oder nach mitotischer Katastrophe im Zelltod. Parallel zu den Reparaturmechanismen wird über Checkpoint-Kinasen (CP-Kinasen) auch p53 aktiviert, das je nach Schadensausmaß an der DNA die Reparatur weiter fördert und die Zelle arretiert oder direkt Apoptose auslösen kann. Letzteres geschieht durch Induktion von Bax, Puma und Noxa hauptsächlich über den intrinsischen Apoptoseweg, aber auch der extrinsische Weg kann über Hochregulation von CD95 getriggert werden. Als zusätzlicher Weg wird über freie Radikale das Enzym saure Spingomyelinase aktiviert, das die Umsetzung von Spingomyelin aus der Membran zu Ceramid induziert und auf diese Weise intrinsische und extrinsische Apoptosewege fördert.

Eine weitere Strahlenantwort der Zellen wird v.a. durch Radikalbildung verursacht. Dabei kommt es zur Aktivierung des Enzyms saure Spingomyelinase (ASM), das die Freisetzung von Ceramid aus Spingomyelin der Zellmembran triggert (Haimovitz-Friedman et al., 1994; Kolesnick and Fuks, 2003). Ceramid selbst kann wiederum Apoptose induzieren. Zum einen hemmt es die anti-apoptotische Kinase PKB/Akt (Zhou et al., 1998), zum anderen triggert es den Einbau von Bax in die äußere Mitochondrienmembran mit anschließender Cytochrom c-Freisetzung und Aktivierung der Caspasen-Kaskade (Liao et al., 1999; von Haefen et al., 2002). Außerdem kann SAPK/JNK zum Mitochondrium translozieren und dort Bcl-x_L phosphorylieren, was von essentieller Bedeutung für die Ceramid- sowie SAPK/JNK-vermittelte Apoptose ist (Kharbanda et al., 2000; Verheij et al., 1996).

Die Strahlenantwort der Zelle in ihrer Gesamtheit ist in Abbildung 2.9 schematisch zusammengefasst.

2.7 Der PI3K/Akt-Weg: Gegenspieler von Bestrahlung und Apoptose

Der Phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K)/Akt Signalweg wird als einer der Hauptüberlebenswege in der Zelle angesehen. Er wird aktiviert durch zahlreiche Stimuli wie verschiedene Hormone einschließlich Insulin, Wachstumsfaktoren wie EGF, IGF oder PDGF, durch verschiedene Formen zellulären Stresses oder durch Aktivierung von Ras (Vivanco and Sawyers, 2002). Über den PI3K/Akt-Weg werden grundlegende zelluläre Funktionen wie Proliferation, Translation, Zellzyklusvorgänge, Zellgröße, Glucosemetabolismus, Genomstabilität, Angiogenese und das Überleben der Zelle reguliert (Bellacosa et al., 2005; Cantley, 2002). In Tumorzellen finden sich häufig Deregulationen im PI3K/Akt-Weg, was mit Tumorstrom und verschlechtertem Ansprechen des Tumors auf Therapien einhergeht (Vivanco and Sawyers, 2002).

Die PI3K wird über Rezeptortyrosinkinasen von Wachstumsfaktor- oder Integrin-Rezeptoren aktiviert. Dabei wird die regulatorische p85-UE des Enzyms über die SH2-Domäne (Src homology 2 domain) an Phosphotyrosin-Reste innerhalb des Rezeptors rekrutiert, wo die Aktivierung erfolgt. Daraufhin kann die katalytische p110-UE der PI3K an der Membran PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) zu PIP₃ phosphorylieren, welches dazu dient, Proteine mit Phospholipid-bindenden Domänen an die Membran zu rekrutieren (Dillon et al., 2007). Insbesondere werden die Proteine PKB/Akt und PDK1 (phosphoinositid-dependent kinase 1) über ihre PH(pleckstrin homology)-Domäne an die Membran rekrutiert, wobei PDK1 das Akt-Protein in der Kinase-Domäne an Thr308 phosphoryliert (Chan et al., 1999; Franke et al., 1995). Zur vollen Aktivierung von Akt ist jedoch noch eine weitere Phosphorylierung in der regulatorischen UE des Proteins an Ser473 notwendig. Diese erfolgt hauptsächlich über einen Enzymkomplex aus den Proteinen mTOR (mammalian target of rapamycin), GβL (G-protein beta-subunit-like) und rictor (Sarbasov et al., 2005). Zusätzlich könnten die Kinasen ILK-1 (integrin-linked kinase), PDK1, Akt selbst, sowie DNA-PK_{CS} das Potential haben, Akt an Ser473 zu phosphorylieren (Chan and Tsichlis, 2001; Dong and Liu, 2005). Nach seiner Aktivierung wandert Akt in Zytoplasma und Zellkern, wo es eine Vielfalt an nachgeschalteten Effektorproteinen phosphoryliert und dabei aktiviert oder inhibiert (Dillon et al., 2007). Die Aktivität von PI3K wird gehemmt von der Lipidphosphatase PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), die das 3'-Phosphat von PIP₃ entfernt und so über Regenerierung von PIP₂ das Downstreamsignaling der PI3K deutlich abschwächt (Dillon et al., 2007).

Durch Phosphorylierung an Ser473 und Thr308 aktiviertes PKB/Akt reguliert den Zellzyklus über Phosphorylierung von p21 und p27. Die beiden Zellzyklusregulatoren werden daraufhin im Zytoplasma zurückgehalten bzw. aktiv aus dem Kern transportiert, was deren zellzyklushemmende Funktionen aufhebt (Viglietto et al., 2002; Zhou et al., 2001). Außerdem

kurbelt P-Akt den Zellzyklus über verstärkte Translation sowie Stabilisierung von Cyclin D1 an, was ein Voranschreiten des Zellzyklus am G1/S Übergang begünstigt (Diehl et al., 1998). Zudem spielt P-Akt eine Rolle im Metabolismus durch Inaktivierung der GSK (glycogen synthase kinase) sowie Aktivierung von Glykolyse und Glucose-Transport (Cross et al., 1995; Deprez et al., 1997; Kohn et al., 1996). Das Überleben der Zelle wird über eine Vielzahl an Effektorproteinen durch PKB/Akt beeinflusst. Zum einen inhibiert Akt das BH3-only Protein Bad durch Phosphorylierung an Ser136 (Datta et al., 1997), zum anderen verhindert es über Phosphorylierung und somit Hemmung des Transkriptionsfaktors FKHL1 die Aktivierung Apoptose-relevanter Gene wie FasL, Bim, Noxa und Puma (Brunet et al., 1999; del Peso et al., 1997; You et al., 2006). Akt phosphoryliert außerdem Caspase 9 an Ser196, was Konformationsänderungen in der Caspase bewirkt und damit ihre Inaktivität zur

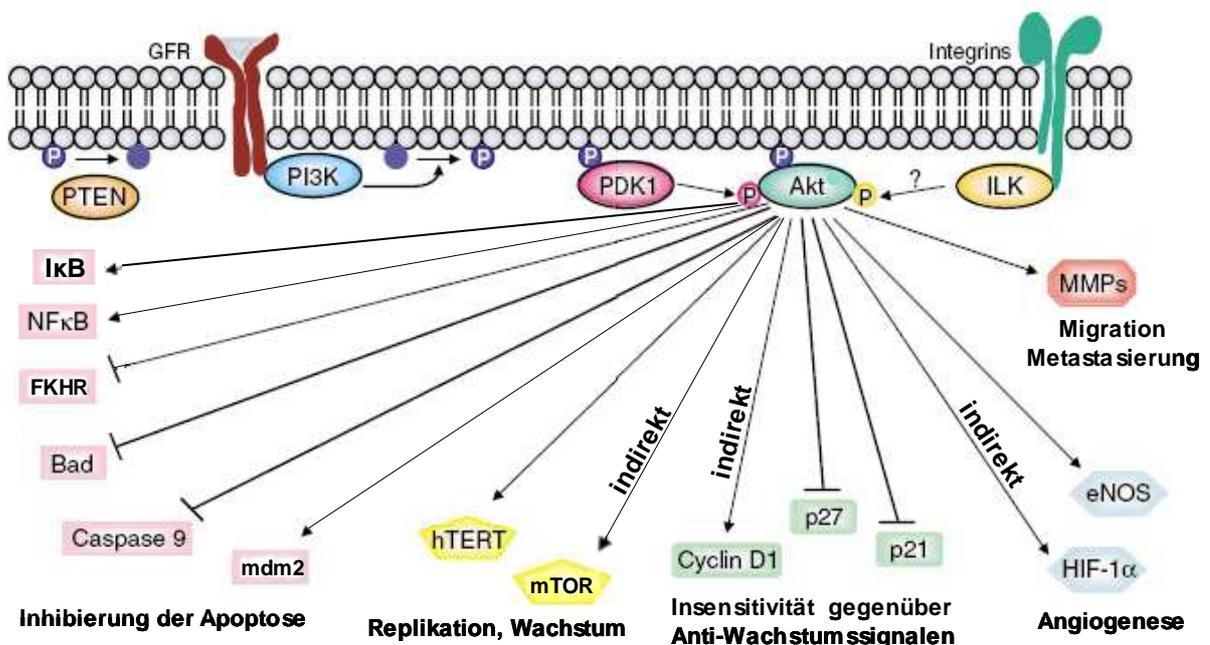


Abbildung 2.10 Der PI3K/Akt Signalweg (modifiziert nach Dillon, 2007)
 Aktivierung der PI3K über Rezeptortyrosinkinasen vermittelt die Phosphorylierung von PIP2 zu PIP3 und dadurch die Rekrutierung von PKB/Akt und PDK1 zur Zellmembran. PKB/Akt wird daraufhin über Phosphorylierung an Ser473 (durch mTOR/ricTOR) und Thr308 (durch PDK1) aktiviert, woraufhin es über Phosphorylierung seiner Downstreamtargets verschiedene zelluläre Prozesse wie Replikation, Wachstum, Angiogenese, Migration und Apoptose reguliert.

Folge hat (Cardone et al., 1998). Des weiteren führt Akt einerseits indirekt über Phosphorylierung der IKK (IκB Kinase), die den Abbau des NFκB-Inhibitors IκB triggert, andererseits direkt über Aktivierung der transkriptionellen Aktivität von NFκB (nuclear factor κB) zu einer verstärkten Expression von Überlebensgenen wie Bcl-x_L, Bcl-2, c-IAPs und c-FLIP (Catz and Johnson, 2001; Lee et al., 1999; Romashkova and Makarov, 1999). Die Expression der Überlebensproteine Bcl-2, Mcl-1 und Akt selbst wird außerdem durch die Akt-

vermittelte Phosphorylierung von CREB (cyclic AMP-response-element-binding protein) unterstützt (Pugazhenti et al., 2000; Wang et al., 1999). Über Phosphorylierung der Ubiquitinligase mdm2 vermittelt Akt die Translokation von mdm2 in den Kern, wo mdm2 proapoptotisches p53 ubiquityliert und dadurch dem Abbau zuführt (Mayo and Donner, 2001). Schließlich reguliert Akt über mTOR Faktoren wie Zellgröße, Zellwachstum und Translationsvorgänge in der Zelle (Li et al., 2004) und ermöglicht über Förderung der Sekretion von MMPs (matrix metalloproteinases) Tumorinvasion und Metastasierung von Zellen (Thant et al., 2000).

2.8 Zellzyklusregulationen:

Rb – zwischen Leben, Tod und Differenzierung

pRb gehört mit p130 und p107 zur Familie der Pocketproteine. Rb ist ein Regulator am G1/S Restriktionspunkt des Zellzyklus und spielt eine kritische Rolle bei der Differenzierung, Chromosomenstabilität und dem Überleben der Zelle (Harbour and Dean, 2000b; Knudsen et al., 1999; Zhang et al., 2000; Zheng and Lee, 2002). Die Pocketproteine regulieren über Kontrolle der E2Fs jedoch ein viel größeres Netzwerk an Genen, als für S-Phase und Zellzyklusprogression von Nöten ist. So werden außerdem der Eintritt in und das Fortschreiten der Mitose kontrolliert, diese Zellzyklusprogramme mit Checkpointkontrollen koordiniert, regulierend in die Antwort der Zelle auf DNA-Schäden eingegriffen und außerdem Apoptose, Differenzierung und Entwicklung beeinflusst (Dimova et al., 2003; Ishida et al., 2001; Muller et al., 2001; Polager et al., 2002; Ren et al., 2002; Weinmann et al., 2002). Studien an Rb-defizienten Zellen zeigten, dass Rb für die Zellzyklusregulationen in proliferierenden Zellen austauschbar, aber essentiell für drei Hauptfunktionen ist: Dem Austritt aus dem Zellzyklus, der zu Seneszenz oder Differenzierung führt, chromosomaler Stabilität während der Zellteilung und schließlich Schutz vor Apoptose während der Zellteilung (Halaban et al., 1998; Sage et al., 2000). Rb kontrolliert diese verschiedensten Vorgänge, indem es an Proteine der E2F-Familie von Transkriptionsfaktoren bindet und diese dadurch inhibiert (Lees et al., 1993).

Dabei bindet Rb an andere E2Fs als die übrigen Pocketproteine und ist somit für die Regulation distinkter E2F-Targetgene zuständig (Abbildung 2.11) (Cobrinik, 2005).

Rb reprimiert die Transkription über zwei Hauptmechanismen. Zum einen bindet es an die E2F-Transaktivierungsdomäne und blockiert diese dadurch (Flemington et al., 1993; Helin et al., 1993), zum anderen reprimiert es die Transkription aktiv durch Rekrutierung von Chromatin-Remodeling Enzymen zum Promotor, welche die lokale Chromatinstruktur

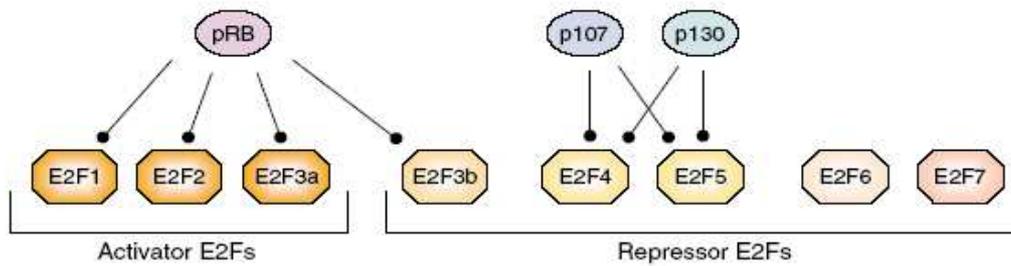


Abbildung 2.11 Interaktionen zwischen Pocketproteinen und E2Fs

(nach Cobrinik, 2005)

Die E2F-Transkriptionsfaktoren werden in zwei Subgruppen unterteilt, die Aktivator-E2Fs (E2F1-3) und Repressor-E2Fs (E2F3-7). Die Hauptfunktion der Aktivator-E2Fs liegt in der Transkription und somit Aktivierung bestimmter Gene, während die Aufgabe der Repressor-E2Fs im Verbund mit den Pocketproteinen primär in der Reprimierung diverser Gene liegt. Das Pocketprotein Rb bindet hauptsächlich an die Aktivator-E2Fs und an E2F3b, welches als Repressor fungieren könnte, während p107 und p130 für die Bindung an E2F4 und E2F5 zuständig sind. Somit sind Rb und die übrigen Pocketproteine für die Regulation distinkter E2F-Targetgene verantwortlich. E2F6 und E2F7 bilden zwar transkriptionelle Repressorkomplexe binden aber nicht an Pocketproteine.

verändern und so den Zugang der Transkriptionsmaschinerie inhibieren (Frolov and Dyson, 2004; Harbour and Dean, 2000) (Abbildung 2.12). Damit Rb die Inhibierung der E2Fs entsprechend ausüben kann, muss es in hypophosphoryliertem Zustand vorliegen, um voll aktiv zu sein (Delston and William Harbour, 2006). Für die Inaktivierung von Rb wiederum sind mehrere Phosphorylierungsschritte durch cdk/Cyclin-Komplexe notwendig (Abbildung 2.12), die das Protein von einem hypophosphorylierten in einen hyperphosphorylierten Zustand überführen (Lundberg and Weinberg, 1998). In diesem löst sich das Protein von E2F und die Targetgene können abgelesen werden.

Rb ist außerdem ein Substrat von Caspasen und kann im Zuge der Apoptose von diesen gespalten werden (Boutillier et al., 2000; Janicke et al., 1996; Tan et al., 1997; Tan and Wang, 1998). Bei der Spaltung entsteht eine instabile Form des Rb, die rapide durch andere Proteasen abgebaut wird (Janicke et al., 1996; Tan et al., 1997). Diese Mechanismen können die Apoptose weiter verstärken, wobei eine Deregelation der E2F-Transkriptionsfaktoren der entscheidende Schritt für die Apoptose-Induktion zu sein scheint (Tsai et al., 1998; Ziebold et al., 2001). Passend dazu wiesen Mäuse mit einer Rb-Mutation an der Caspasenschnittstelle eine Resistenz gegenüber Endotoxin-induzierter Apoptose im Intestinum auf (Borges et al., 2005).

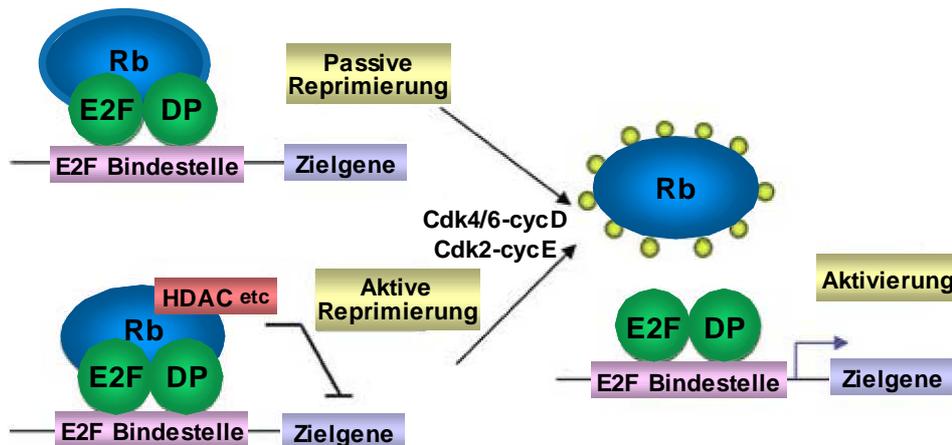


Abbildung 2.12 Reprimierung der E2F-vermittelten Transkription durch Rb

(modifiziert nach Bell und Ryan, 2004)

Rb bindet in der G0/G1-Phase des Zellzyklus an E2F-DP-Komplexe, was zur Reprimierung der E2F-abhängigen Transkription führt. Rb inhibiert den transkriptionsfördernden Komplex zum einen passiv über Bindung an dessen Transaktivierungsdomäne und zum anderen aktiv über Rekrutierung von Faktoren wie HDAC, die die Histonschwänze modifizieren und dadurch eine dichtere Packung der Nukleosomen erleichtern. Cdk4/6-cycD und Cdk2-cycE phosphorylieren Rb an mehreren Stellen und verursachen so eine Freisetzung von E2F, was zur Aktivierung der E2F-abhängigen Targetgene führt.

2.9 Die Alkylphosphocholine ErPC und ErPC3

Die Geschichte der synthetischen Phospholipide begann in den frühen 1970ern mit der Synthese von Alkyllysophospholipiden (ALP) als immunmodulierende Substanzen (Munder et al., 1979). ALPs zeichnen sich durch ein Glycerin-Rückgrat aus, an das durch Etherbindungen jeweils eine lange und eine sehr kurze aliphatische Seitenkette verknüpft sind. Während dem Findungsprozess biologisch stabiler Analoga wurde die anti-proliferierende Eigenschaft der ALPs in Tumorzellen entdeckt (Runge et al., 1980). Nur wenig später wurde die Anti-Tumor-Wirkung des ALPs ET-18-OCH₃ (Edelfosine) in Ratten nachgewiesen (Berger et al., 1984; Scherf et al., 1987), was Anlass zu nachfolgenden klinischen Studien gab und zur Entwicklung zahlreicher ALP-Derivate beitrug. Dabei entstanden auch die ALP-Abkömmlinge der Alkylphosphocholine (APC), denen das Glycerin-Rückgrat fehlt (Hilgard et al., 1993). Sie stellen das minimale Wirkprinzip der ALPs dar, d.h. den auf ein Minimum reduzierten Anteil, der dennoch die Eigenschaft der Anti-Tumor-Wirkung aufweist (Eibl and Unger, 1990). HePC (Hexadecylphosphocholin) war das erste APC-Derivat, das in die Klinik eingeführt wurde. Es löste jedoch hämolytische Nebenwirkungen aus und kann daher in geeigneten Anti-Tumor-Konzentrationen nur oral gegeben werden (ImpavidoTM) oder kutan als Palliativbehandlung für Hautmetastasen bei

Mammakarzinom bzw. bei malignen Hautlymphomen (MiltexTM) (Clive et al., 1999; Dummer et al., 1993; Leonard et al., 2001; Smorenburg et al., 2000; Unger et al., 1992). Aber auch die orale Gabe war wegen gastrointestinaler Toxizität von HePC nur begrenzt möglich und so konnte die Substanz oral zwar nicht in der Tumorthherapie eingesetzt werden, dafür aber bei viszeraler Leishmaniasis (Sundar et al., 2002). Ferner wurde mittlerweile das APC Perifosine (Octadecyl-(N,N-dimethyl-piperidinium-4-yl)-phosphat in der klinischen Anwendung getestet. Dabei wurden in verschiedenen Phase I und pharmakokinetischen Studien v.a. gastro-intestinale Nebenwirkungen beobachtet, die ebenso wie bei HePC dosislimitierend sind (Crul et al., 2002; Van Ummersen et al., 2004). Da das Hauptproblem also darin bestand, dass die APCs wegen hämolytischer Effekte nur oral appliziert werden konnten, hierbei allerdings wegen gastrointestinaler Toxizität eine Dosislimitierung gegeben war, entstand die zweite Generation an APCs, die eine Doppelbindung im Zentrum ihres Akylrests tragen. Mit Erucylphosphocholin (ErPC) (Abbildung 2.13A) - einem APC mit einer aus 22 Kohlenstoffatomen bestehenden Alkylkette und der Doppelbindung an cis-13,14 - war das erste APC-Derivat geschaffen, das intravenös verabreicht werden kann (Berger et al., 1998). Sein Nachfolger ErPC3 (Erucylphosphohomocholin, Erufosine[®]) (Abbildung 2.13B) unterscheidet sich von ErPC lediglich um eine zusätzliche CH₂-Gruppe im Verbindungsglied von Ammoniumfunktion und Phosphorsäurerest. Im Gegensatz zu Standardchemotherapeutika zeichnen sich APCs allgemein dadurch aus, dass sie ihre Wirkung in der Zelle ohne direkte Interaktion mit der DNA entfalten (Nosedá et al., 1989). Sie wechselwirken primär mit Membranpermeabilität und -fluidität, der Lipidzusammensetzung in der Membran sowie dem Phospholipidmetabolismus, wobei Vorgänge wie Zellproliferation, Zellzyklusprogression, Differenzierung und Angiogenese beeinflusst werden (Jendrossek and Handrick, 2003; Ruiter et al., 2001).

Pharmakokinetische Untersuchungen zu ErPC in gesunden Ratten ergaben, dass die Substanz Blut-Hirn-Schranken-gängig ist und sich bei wiederholter intravenöser Gabe u.a. im Gehirngewebe anreichert, ohne bei den eingesetzten Konzentrationen toxische Nebenwirkungen zu erzeugen (Erdlenbruch et al., 1999). Außerdem konnte eine Akkumulation von ErPC im Tumorgewebe von Ratten mit Gliomen nachgewiesen werden (Erdlenbruch et al., 2002). Obwohl sich die beiden Substanzen ErPC und ErPC3 strukturell nur wenig voneinander unterscheiden, weist ErPC3 eine deutlich bessere Löslichkeit in wässrigen Lösungen auf, was wegen vereinfachter intravenöser Applikation einen erheblichen Vorteil für eine zukünftige klinische Anwendung mit sich bringen würde.

Hinsichtlich des potentiellen Wirkmechanismus konnte für ErPC gezeigt werden, dass seine zytotoxische Wirksamkeit pro-apoptotische Effekte einschließt. Dabei war die Effizienz der Substanz unabhängig vom extrinsischen Zelltodweg und wurde dafür in Abhängigkeit von

Caspase 9, Apaf-1 und Caspase 3 sowie durch Bcl-2 Überexpression signifikant reduziert (Jendrossek et al., 2003; Kugler et al., 2005). Bezüglich letzterem scheint auch die subzelluläre Lokalisation von Bcl-2 an den Membranen von ER und Mitochondrium eine Voraussetzung für den Schutz vor ErPC-induzierter Apoptose zu sein (Handrick et al., 2005).

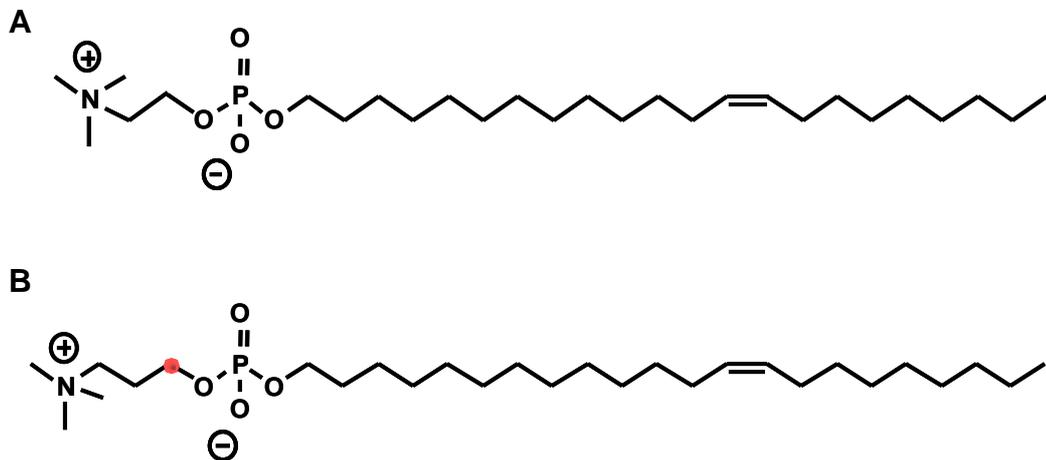


Abbildung 2.13 Strukturformeln von ErPC und ErPC3

- (A) Das APC-Derivat ErPC ist ein cis-13-14 ungesättigt alkyliertes Phosphat mit einem Ethyl-trimethyl-ammonium-Zweitsubstituenten
 (B) ErPC3 ist ein Struktur analogon von ErPC, das sich lediglich um eine zusätzliche Methylen-gruppe am Zweitsubstituenten (rot markiert) unterscheidet.

Ferner wurde beobachtet, dass ErPC stressinduziertes JNK aktiviert und anti-apoptotisches ERK-Signaling in Gliomzellen inhibiert (Kugler et al., 2004). Da ErPC-induzierte Apoptose in Gliomzellen überdies unabhängig von wt-p53 ablaufen kann (Jendrossek et al., 2001), stellt es ein vielversprechendes Agens zur Behandlung von wenig strahlensensitiven Tumoren dar und bietet sich außerdem für kombinierte Behandlungsansätze mit ionisierender Strahlung an.

2.10 TRAIL und ETR-2

TRAIL, der natürliche Ligand der TRAIL-Rezeptoren, weist an seinem C-terminalen Ende eine 23%ige Homologie mit CD95-L sowie eine 19%ige Homologie mit TNF auf (Pitti et al., 1996) und wird auf Chromosom 3 an der Position 3q26 kodiert (Wiley et al., 1995). Es ist ein 33-35kD Typ II Membranprotein, liegt jedoch neben der membrangebundenen Form nativ auch als lösliche Form vor (Liabakk et al., 2002; Mariani and Krammer, 1998). Da eine Expression von TRAIL in beinahe allen humanen Geweben (Thymus, Milz, Lymphozyten, Intestinum, Lunge, Plazenta, Ovar und Prostata) außer Leber und Gehirn nachgewiesen wurde, liegt die Vermutung nahe, dass TRAIL eine physiologische Rolle übernimmt (Pitti et

al., 1996; Suda et al., 1993). Untersuchungen an TRAIL-Knockout-Mäusen ergaben zwar zunächst keinen sichtbaren Phänotyp, aber die Mäuse hatten nach Injektion syngener Tumorzellen erhebliche Probleme in der Abwehr dieser Zellen (Cretney et al., 2002; Takeda et al., 2002), was TRAIL eine potentielle Rolle in der Überwachung und Immunabwehr von Tumorzellen zukommen lässt.

Da TRAIL Apoptose in Tumorzellen auslöst und in Nacktmäusen einen Rückgang von Tumoren verursacht, aber bisher im Gegensatz zu TNF- α und CD95-L keine Normalgewebs-toxizität in murinen Xenografts und Primaten aufweist (Ashkenazi et al., 1999; Gazitt, 1999; Walczak et al., 1999), scheint mit dem Liganden TRAIL ein idealer und vielversprechender Kandidat für zukünftige Tumorthérapien gefunden.

Die aktive Form von TRAIL ist ein Trimer, wobei ein Zink-Ion, das über einen einzelnen Cystein-Rest an Position 230 in jedem Monomer koordiniert wird, entscheidend für die Aktivität von TRAIL ist (Bodmer et al., 2000; Hymowitz et al., 2000).

Bisher sind fünf verschiedene TRAIL-Rezeptoren identifiziert, die unter Kapitel 2.3.2 bereits beschriebenen TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 sowie die sogenannten Decoy-Rezeptoren 1 und 2 (DcR1 und DcR2) und Osteoprotegerin (OPG) (Bouralexis et al., 2005; Kimberley and Screaton, 2004). Allerdings verfügen nur TRAIL-R1 und TRAIL-R2 über eine vollständige zytoplasmatische Todesdomäne, weswegen sie als einzige der TRAIL-Rezeptoren Apoptose auslösen können und zu den Todesrezeptoren gezählt werden. DcR1 und DcR2 werden den Decoy-Rezeptoren zugeordnet, da sie aufgrund fehlender (DcR1) oder unvollständiger (DcR2) zytoplasmatischer Domäne keine Apoptose vermitteln können (Bouralexis et al., 2005). Die Decoy-Rezeptoren können darüber hinaus die Apoptose-Induktion durch Konkurrenz mit TRAIL-R1 und TRAIL-R2 um die Bindung von TRAIL inhibieren. Nach weiteren Theorien könnte außerdem die Bildung gemischter Rezeptorkomplexe (Heterotrimerisierung aus TRAIL- und Decoy-Rezeptoren) das apoptotische Signaling blockieren oder ein Rezeptortrimer aus DcR2 anti-apoptotisches NF κ B-Signaling aktivieren (Kimberley and Screaton, 2004). Die Tatsache, dass nur gesundes Gewebe über Decoy Rezeptoren verfügt, während die Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 zusätzlich zu normalen Geweben auch in vielen Tumorarten exprimiert werden, könnte ein Grund für die spezifische Anti-Tumor-Wirkung von TRAIL sein und zumindest teilweise die fehlende Toxizität in Normalgeweben erklären (Ashkenazi et al., 1999). Im Normalgewebe kann die TRAIL-Wirkung über Decoy-Rezeptoren abgefangen werden, im Tumor nicht. Berichte über eine Apoptose-Induktion durch TRAIL in humanen Leberzellen (Jo et al., 2000) dämpften zwar vorübergehend die Begeisterung gegenüber TRAIL, letztlich stellte sich jedoch heraus, dass die Toxizität auf die biochemische Präparation der verwendeten TRAIL-Formen

zurückzuführen war und durch den Einsatz geeigneter Präparate vermieden werden kann (Lawrence et al., 2001).

Die Rolle des gelösten OPG als Rezeptor für TRAIL ist bisher noch sehr unklar, v.a. da unter physiologischen Temperaturen die Affinität zu TRAIL sehr gering ist (Kimberley and Screaton, 2004).

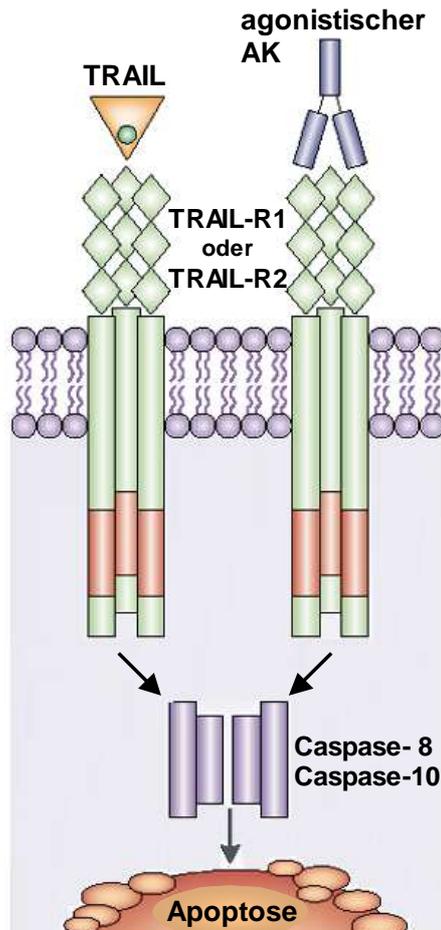


Abbildung 2.14 Das TRAIL-Rezeptor-System

(modifiziert nach Ashkenazi, 2002)

Der Apoptose-Signalweg nach Aktivierung der TRAIL-Rezeptoren ist dem des in Kapitel 2.3.2 beschriebenen CD95-Wegs sehr ähnlich, mit dem Unterschied, dass im Falle des TRAIL-Systems mindestens vier verschiedene TRAIL-Rezeptoren identifiziert wurden (siehe Text). Dabei können die aktivierenden Zelltodrezeptoren TRAIL-R1 bzw. TRAIL-R2 sowohl über den Liganden TRAIL als auch über einen gegen den Rezeptor gerichteten spezifischen agonistischen Antikörper (AK) aktiviert werden.

Nach Bindung von TRAIL oder dem agonistischen AK an seinen Rezeptor wird eine Trimerisierung der Rezeptoren ausgelöst und über die DD (death domain) das Adaptormolekül FADD rekrutiert. Dabei entsteht der sog. Death inducing signaling complex (DISC). Mittels der DED Domäne von FADD zieht DISC Proteine der Pro-Caspase 8 oder 10 an den Rezeptorkomplex heran, die nach dem Prinzip der induzierten Proximität aktiviert werden. Aktive Caspase 8 bzw. 10 initiiert durch Prozessierung der Caspase 3 anschließend die klassische Caspasen-Kaskade und somit Apoptose.

Die Aktivierung der Caspase 8 bzw. 10 am DISC kann über die Decoy-Rezeptoren inhibiert werden. Dies geschieht entweder über Konkurrenz um die Liganden oder über die Bildung gemischter Rezeptortrimere, die die Signalweiterleitung blocken.

Im Allgemeinen kann eine Aktivierung der Zelltodrezeptoren durch Bindung eines spezifischen Liganden erreicht werden oder alternativ über rezeptorspezifische Antikörper. ETR-1 und ETR-2 sind rekombinante, humane monoklonale agonistische IgG₁γ Antikörper gegen die Zelltodrezeptoren TRAIL-R1 (ETR-1) und TRAIL-R2 (ETR-2) (Alderson et al., 2003; Pukac et al., 2005; Salcedo et al., 2002). Klinische Phase I Studien an Patienten mit fortgeschrittenen unheilbaren soliden Tumoren und mit Non-Hodgkin-Lymphomen ergaben Hinweise für die biologische Aktivität der Antikörper (Attard et al., 2005; de Bono et al., 2004; Sarantopoulos et al., 2005). Außerdem wurden die Antikörper im allgemeinen gut vertragen und es wurde keine Lebertoxizität beobachtet.

Aufgrund der Beobachtung, dass Zelltodrezeptoren und ionisierende Strahlung bzw. klassische Chemotherapeutika über distinkte Wege zur Apoptose führen, bietet sich eine kombinierte Behandlung aus TRAIL mit Bestrahlung oder Chemotherapie an.

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen *in vitro* als auch im Xenograftmodell zeigten eine verbesserte Antitumorwirkung nach einer Kombination aus TRAIL und Bestrahlung bzw. ETR-1/ETR-2 und Bestrahlung (Belka et al., 2001; Marini et al., 2006; Marini et al., 2005) sowie nach Kombination verschiedener Chemotherapeutika mit TRAIL (Clayer et al., 2001; Naka et al., 2002; Pollack et al., 2001).

2.11 Zielsetzung

Die moderne Strahlentherapie ist ein wesentlicher Bestandteil kurativer Behandlungsverfahren in der Therapie maligner Tumore. Allerdings zeigen einige Tumore - wie das Glioblastom - eine geringere Strahlensensibilität und sprechen kaum auf die Behandlung an. Ursache hierfür sind u.a. Mutationen in Apoptose- und Überlebenssignalwegen, die während der Tumorentwicklung entstanden sind und zur Apoptose-Resistenz der Tumorzellen führen können. Daher ist es essentiell mit neuen, auf fehlregulierte Apoptose- und Überlebenssignalwege zielgerichteten Substanzen die Resistenz der Zellen gegenüber strahleninduzierter Apoptose zu durchbrechen und so das Ansprechen auf die Behandlung zu verbessern.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum einen, die Effizienz einer kombinierten Behandlung aus Bestrahlung und ErPC bzw. dem klinisch fortgeschritteneren ErPC3 in schwer therapierbaren malignen Gliomen zu beurteilen. Des weiteren sollte der molekulare Mechanismus der erhöhten Zytotoxizität nach kombinierter Behandlung im Gliomzellmodell sowie im Jurkat-T-Lymphomzellmodell analysiert werden.

Zum anderen sollten weitere Details zum Wirkmechanismus der Kombinationsbehandlung aus Bestrahlung und TRAIL bzw. ETR-2, deren Effizienz bereits nachgewiesen wurde (Belka et al., 2001; Marini et al., 2005), im Jurkat-T-Lymphomzellmodell untersucht werden.

Abschließend sollte an Lymphomzellen getestet werden, ob eine Dreifachkombination aus Bestrahlung, ErPC3 und TRAIL einen zusätzlichen Benefit zur Doppelbehandlung in der Therapie von Tumorzellen erzielen kann.

3. Material

3.1 Chemikalien und Reagenzien

2-Mercaptoethanol	Sigma
Acrylamid	Roth
Agarose	Sigma
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Roth
Bak siRNA	Dharmacon
Bromphenolblau	Sigma
BSA (Bovines Serumalbumin)	New England Biolabs
CCCP	Sigma
Coomassie Blue	Merck
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
dNTP Mix	Roche
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Sigma
ECL Western blotting detection reagent I + II	GE Healthcare
EDTA (Ethylendiamin-tetraacetat)	Roth
Ethanol	Merck
FA (Formaldehyd)	Merck
Gel 30 (30%-ige AA/BisAA-Lösung, 37,5:1)	Roth
Glycerin	Merck
Glycin	Roth
H ₂ O bidest	Roth
HCl (Salzsäure)	Merck
Hoechst 33342	Calbiochem
KCl (Kaliumchlorid)	Merck
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck
Methanol	Merck
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Sigma
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Serva
Natriumcitrat x 2 H ₂ O	Sigma
NaCl (Natriumchlorid)	Merck
NaOH (Natriumhydroxid)	Merck
non targeting siRNA	Dharmacon
PFA (Paraformaldehyd)	Merck
Propidium Iodid	Calbiochem

QIA Amp DNA Mini Kit	Qiagen
Rotiphorese 10x SDS-Page	Roth
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fluka
Taq-DNA-Polymerase	PeqLab
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylen-diamin)	Sigma-Aldrich
TMRE	Molecular Probes, Mobitech
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth
Tris-HCl	Fluka
Triton-X 100	Sigma
Trizma Base	Sigma
Tween 20	Roth
zVAD-FMK	Calbiochem

3.2 Medien, Puffer und Lösungen

3.2.1 Zellkultur

PBS : 8,0 g/l NaCl
 1,5 g/l Na₂HPO₄ x H₂O
 0,2 g/l KCl
 0,2 g/l KH₂PO₄
 pH 7,4-7,6

DMSO (für Zellkultur)	Sigma
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Life Technologies
Ficoll (Biocoll), d=1,077 g/l	Biochrom-Seromed
RPMI 1640 (Nährmedium)	Gibco, Life Technologies
RPMI ohne Phenolrot	Gibco, Life Technologies
AGM Astrozyten Medium	Cambrex / Lonza
Single Quots (Nährzusätze Astrozytenmedium)	Cambrex / Lonza
Reagent Pack (Subkultivierung Astrozyten)	Cambrex / Lonza
Trypan Blau Lösung	Sigma
0,05% Trypsin/EDTA	Gibco

3.2.2 Immunfluoreszenz

PBS : 8,0 g/l NaCl
 1,5 g/l Na₂HPO₄ x H₂O
 0,2 g/l KCl
 0,2 g/l KH₂PO₄
 pH 7,4-7,6

4% PFA in PBS

0,2% Triton-X 100 in PBS

5% FCS in PBS

2% FCS in PBS

Fluoromount-G

Southern Biotech, Birmingham

Nagellack, Quick Dry

Manhattan

3.2.3 FACS

Nicoletti-Lösung

0,1% NaCitrat
 0,1% TritonX100
 50 µg/ml Propidium Iodid

TMRE

25 nM TMRE in Medium

PI-Exclusion

5 µg/ml PI in PBS

Bax-Aktivierung

0,1% Triton-X 100 in PBS
 10% FCS in PBS

Rezeptorexpression

0,5% FCS in PBS

für die FACS-Routine

FACS Flow
 FACS Clean
 FACS Rinse

BD Biosciences
 BD Biosciences
 BD Biosciences

3.2.4 Koloniebildung

3,7% Formaldehyd

70% Ethanol

Färbelösung:

20% Methanol

7,5% Essigsäure

0,05% Coomassie Blue

3.2.5 SDS-PAGE und WB

Sammelgelpuffer	60,6 g/l Tris 0,4% (w/v) SDS auf pH 6,8 mit HCl einstellen
Trenngelpuffer	18,17 g/l Tris 0,4% (w/v) SDS auf pH 8,8 mit HCl einstellen
APS	10 % Ammoniumpersulfat in H ₂ O
TBS	150 mM NaCl 10 mM Tris ad 1000 ml dest. Wasser pH 8,0
TBS-Tween	TBS + 0,05% (v/v) Tween
Blocking-Puffer	5 % Milchpulver in TBS-Tween
Transfer Puffer	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% (w/v) SDS 10% (v/v) Methanol pH 8,3
CST-Lysepuffer	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2% (w/v) SDS 10% (v/v) Glycerol 50 mM DTT 0,01% (w/v) Bromphenolblau
Stripping-Puffer	62.5 mM Tris pH 6.2 2% SDS 100 mM β -Mercaptoethanol

3.3 Antikörper, Liganden und small molecules

3.3.1 Antikörper zur Analyse im Western Blot

Primärantikörper

mouse - anti - GAPDH	1:3000	Abcam
rabbit - anti - PARP	1:1000	Cell Signaling
mouse - anti - Caspase 9	1:1000	Upstate
mouse - anti - Caspase 8	1:1000	Cell Signaling
rabbit - anti - Caspase 3	1:1000	Cell Signaling
rabbit - anti - Bim	1:1000	Cell Signaling

rabbit - anti - Puma	1:1000	Cell Signaling
mouse- anti - Noxa	1:500	Calbiochem
mouse - anti - Bcl-2	1:2000	Santa Cruz
rabbit - anti - Bcl-x _L	1:1000	Cell Signaling
rabbit - anti - Akt	1:1000	Cell Signaling
rabbit - anti - P-Akt S473	1:1000	Cell Signaling
rabbit - anti - P-Akt T308	1:1000	Cell Signaling
rabbit - anti - FKHL1	1:1000	Cell Signaling
rabbit - anti - P-FKHR/FKHL1	1:1000	Cell Signaling
rabbit - anti - Bak	1:1000	Upstate
rabbit - anti - Bax	1:1000	Cell Signaling
mouse - anti - β -actin	1:20000	Sigma
rabbit - anti - cleaved Caspase 3	1:1000	Cell Signaling
rabbit - anti - Bad	1:1000	Cell Signaling
rabbit - anti - P-Bad S136	1:1000	Cell Signaling
rabbit - anti - H2AX	1:1000	Cell Signaling
rabbit - anti - P-H2AX	1:1000	Cell Signaling
mouse - anti - Rb	1:2000	Cell Signaling
rabbit - anti - P-Rb S795	1:1000	Cell Signaling
rabbit - anti - P-Rb S807/811	1:1000	Cell Signaling
rabbit - anti - Mcl-1	1:1000	Cell Signaling
rabbit - anti - Bid	1:1000	Cell Signaling
rabbit - anti - mTOR	1:1000	Cell Signaling
rabbit - anti - P-mTOR	1:1000	Cell Signaling
mouse - anti - p53	1:1000	Cell Signaling

Sekundärantikörper

anti-mouse, HRP-konjugiert

Amersham Biosciences

anti-rabbit, HRP-konjugiert

Amersham Biosciences

3.3.2 Antikörper zur Immunfluoreszenz

(Detektion im FACS oder Fluoreszenzmikroskop)Primärantikörper

rabbit - anti - Bax NT	Upstate
rabbit - anti - P-H2AX	Cell Signaling
anti - Phycoerythrin IgG	R&D Systems
anti - Phycoerythrin TRAIL-R1	R&D Systems
anti - Phycoerythrin TRAIL-R2	R&D Systems

Sekundärantikörper

Alexa Fluor 488 anti - rabbit polyclonal	Molecular Probes, Mobitech
Cy3 goat - anti – rabbit	Amersham
Cy3 goat - anti – mouse	Amersham

3.3.3 Antikörper und Liganden zur Stimulation von Zellen

rhTrail	R&D Systems
HGS-ETR-2, Lexatumumab, anti-TRAIL-R2	Human Genome Sciences

3.3.4 Small molecules und Chemotherapeutika zur Stimulation von Zellen

ErPC	H. Eibl, MPI Göttingen
ErPC3	H. Eibl, MPI Göttingen
Etoposid	Alexis
Doxorubicin/Adriblastin®	Pharmacia&Upjohn
5-Fluorouracil/Fluoroblastin®	Pharmacia&Upjohn

3.4 Zelllinien

T98G	humane Glioblastom Zelllinie, ATCC, Bethesda, USA
A172	humane Astrozytom Zelllinie, ATCC, Bethesda, USA
U87MG	humane Glioblastom Zelllinie, ATCC, Bethesda, USA
NHA	Normale humane Astrozyten, Cambrex / Lonza
JCAM 1.6	humane Jurkat Zelllinie, JCAM Bak-positiv

	ATCC, Bethesda, USA
JCAM 1.6	humane Jurkat Zelllinie, JCAM Bak-negativ freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Weiss, University of California, San Francisco, USA
Jurkat Bcl-2	stabil Bcl-2-überexprimierende humane Jurkat-Zelllinie, (Rudner et al., 2001)
Jurkat vector	stabil vector-transfizierte humane Jurkat-Zelllinie, Kontrolle zu Bcl-2- überexprimierenden Zellen (Rudner et al., 2001)

3.5 Größenstandards

1 kb DNA-Marker	New England Biolabs #N3232
Proteinmarker Prestained Protein Ladder	Fermentas #SM0671
Proteinmarker Unstained Protein Ladder	Fermentas #SM0661

3.6 Verbrauchsmaterial

Einfrierröhrchen	Greiner
1,5 / 2 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf
15 / 50 ml-Zentrifugenröhrchen	Sarstedt
FACS-Röhrchen	BD Falcon
6-/12-/24-well-Platten	Falcon, BD Labware
100 x 20 mm Gewebekulturschalen	Sarstedt
25 / 75 / 175 cm ² Zellkultur-Flaschen	Sarstedt
5 / 10 / 25 / 50 ml Plastik-Einmalpipetten	Corning Incorporated, NY
Einmalpipetten (steril) für Küvetten	Peqlab
4 mm Elektroporationsküvetten	Bio-Rad
Deckgläser 20 x 20 mm	Marienfeld GmbH&Co.KG
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
PE-Folienschlauch	NeoLab
Filterpapier Whatman 3 MM	Schleicher & Schuell
PVDF-Membran	Roth
Hyperfilm ECL	Amersham GE Healthcare

3.7 Geräte

Bestrahlungsgerät:

LINAC 6 MeV

Elekta

LINAC SL 25

Phillips

Brutschränke: Hera Cell 240

Hereaus

Cell Counter AC-8

Karl Hecht KG, Sondheim

Elektroporator EPI 2500

Dr. L. Fischer, Heidelberg

Entwicklungsgerät Hyperfilme

Classic E.O.S., AGFA

FACS Calibur Durchflusszytometer

Becton Dickinson

Filmkassetten

Dr. Goos-Suprema GmbH

Folienschweißgerät

Impulse Sealer, TEW

Magnetrührer MR3001

Heidolph

Mikroskope:

inverses Durchlichtmikroskop

WILL, Wilovert S

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 25

Zeiss

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200

Zeiss

Konfokales Laser Scan Mikroskop

Leica TCS NT

Binokular Stemi 2000

Zeiss

Neubauer Zählkammer Tiefe 0.1mm

NeoLab

PCR Mastercycler

Eppendorf

pH-Meter 761 Calimatic

Knick

Pipetboy

Integra Biosciences

Pipetten

Eppendorf

Schüttler WT 17

Biometra

SDS-Gelelektrophoresekammer

Biometra

Spannungsgeräte

Power Pac 200, Bio-Rad

Power Pac 300, Bio-Rad

Power Pack P25, Biometra

Sterilbänke

Hera Safe

Hereaus

BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH

Thermomixer

Eppendorf

Transferkammern WB:Trans Blot Cell 36S

Bio-Rad

Vortex Mixer

NeoLab

Waage

Kern

Wasserbad

HAAKE p21

Zellzähler

A. Hartenstein

Zentrifugen

Tischzentrifuge 5417R

Eppendorf

Rotanta RPC Laborzentrifuge

Hettich

Laborzentrifuge 5804R

Eppendorf

4. Methoden

4.1 Zellkultur (ZK)

4.1.1 Kultivierung der Zellen

Die Glioblastomzelllinien T98G, A172, U87MG sowie die verschiedenen Jurkat-Zelllinien wurden in RPMI Vollmedium mit 10%FCS kultiviert. Die Normalgewebsastrozyten wurden in Spezialmedium für Astrozyten (Cambrex/Lonza) kultiviert.

Alle Zellen wurden in einem Heraeus-Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert. Die Zellkulturarbeit wurde an einer sterilen Arbeitsbank (Heraeus, BDK) durchgeführt.

Um einen Wachstumsstopp durch Kontaktinhibition zu vermeiden wurden die Zellen in Abhängigkeit von ihrem Wachstumsverhalten verdünnt und neu ausgesät.

Sofern nicht anders angegeben wurden die Jurkat-Zelllinien alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:10 bis 1:15 neu ausplattiert. Zum Ablösen der adhärenen Glioblastomzellen wurde der Zellüberstand abgesaugt, die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und mit 0,05% Trypsin/EDTA abgelöst. Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurde Medium zugegeben und der enzymatische Vorgang (Proteaseaktivität) durch im Serum des Mediums enthaltene Trypsininhibitoren inaktiviert. Danach wurde die Zellsuspension für 4 min bei 1200 rpm zentrifugiert, das Pellet in frisches Medium aufgenommen und die Zellen wurden im Verhältnis 1:6 bis 1:10 neu ausplattiert.

4.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Das Einfrieren von eukaryotischen Zellen ermöglicht die Lagerung der Zellen über einen langen Zeitraum. Durch Verwendung von DMSO (Dimethylsulfoxid) im Medium wird dabei die Bildung von Eiskristallen verhindert. 1-2 x 10⁶ Zellen wurden pelletiert (1200 rpm, 4 min, Raumtemperatur (RT)), in 1 ml Einfriermedium (Vollmedium mit 20% FCS und 10% DMSO) resuspendiert und in Einfrierröhrchen überführt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte über mehrere Stufen. Dazu wurden die Einfrierröhrchen zunächst für 1 h in -20 °C eingefroren und anschließend über Nacht bei -80°C gelagert. Danach wurden die Zellen dauerhaft in Flüssigstickstoff aufbewahrt.

Während beim Einfriervorgang die Zellen schrittweise heruntergekühlt werden sollten, ist beim Auftauen zügig zu arbeiten, um Zellschädigungen durch das zytotoxische DMSO zu verhindern. Direkt nach Entnahme aus dem Stickstofftank wurden die Zellen im 37°C Wasserbad aufgetaut, die Zellsuspension in ein mit 10ml Vollmedium gefülltes Falkon-Röhrchen überführt und zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde in 14 ml frisches Vollmedium aufgenommen und in eine 75 cm² Zellkulturflasche ausplattiert.

24 h nach dem Auftauen wurde bei den adhärennten Zellen ein Mediumwechsel vorgenommen, um abgestorbene Zellen zu entfernen.

Bei Suspensionszellen wurde 2-3 Tage nach dem Auftauen eine Aufreinigung mit Ficoll durchgeführt, um die abgestorbenen Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

Dazu wurden 5 ml Biocoll-Lösung mit 5 ml Zellsuspension überschichtet. Anschließend wurden die Zellen 20 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Zwischen beiden Phasen bildet sich dabei ein deutlicher Interphasenring aus, in dem sich die gesunden Zellen befinden. Zelltrümmer sowie abgestorbene Zellen befinden als Pellet am Boden. Der Interphasenring wurde vorsichtig abgesaugt und in frisches Medium überführt.

Erst ca. zwei Wochen nach dem Auftauen nach mindestens 4-5 Passagen wurden die Zellen für Versuche eingesetzt.

4.1.3 Mycoplasmen PCR

Routinemäßig wurde nach dem Auftauen von Zellen ein PCR-Test auf Mycoplasmen durchgeführt und nur mycoplasmen-negative Zellen für Versuche eingesetzt.

Für den Test wurde der QIA Amp DNA Mini Kit (Qiagen Cat.Nr. 51304) verwendet, bei der Taq-Polymerase handelt es sich um die SAWADY Taq-DNA-Polymerase von PeqLab.

Für den Test wurden 5×10^6 Zellen pelletiert und die DNA mittels QIA Amp DNA Mini Kits präpariert. Die DNA wurde in 100-150 μ l Puffer AE eluiert und je 1 μ l DNA-Lösung zur PCR eingesetzt.

Zunächst wird ein Mastermix pipettiert für ein PCR-Volumen von 50 μ l mit 1 μ l DNA:

- 5 μ l 10 x PCR Puffer S (+KCl)
- 10 μ l 5 x Enhancer Solution
- 2 μ l 25mM MgCl₂
- 8 μ l dNTP Mix
- 1 μ l Primer P1 (~ 300 ng/ μ l)
- 1 μ l Primer P4 (~300 ng/ μ l)
- 1,25 U Taq Polymerase (= 0,25 μ l)
- 21,75 μ l H₂O

PCR Bedingungen :

1'	95 °C
1'	60 °C
1,5'	72 °C
24 Zyklen	

- Kontrollen:
1. jede DNA mit GAPDH-Primern (human/mouse)
 2. positive Kontrolle: DNA aus mycoplasmen-positiven Zellen
 3. negative Kontrolle: DNA aus mycoplasmen-negativen Zellen
 4. Master Mix ohne DNA (mit H₂O)

Je 15 µl des PCR-Ansatzes wurden auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Das erwartete Fragment für die Positivkontrolle liegt bei ca. 900 bp.

4.1.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter Verwendung folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellen [ml}^{-1}\text{]} = (\text{Zellzahl/Zahl der gezählten Großquadrate}) \times 10.000$$

Um abgestorbene Zellen von intakten zu unterscheiden wurde der Farbstoff Trypanblau verwendet, der Zellen mit geschädigter Zellmembran anfärbt. Der Verdünnungsfaktor bei Verwendung von Trypanblau ging entsprechend in die Berechnung der Zellzahl ein.

4.2 Behandlung der Zellen

4.2.1 Bestrahlung der Zellen

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit 6 MV-Photonen bei RT an einem Philipps oder Elekta Linearbeschleuniger mit einer Dosisleistung von 4 Gy/min. Je nach Versuch betrug die Gesamtdosis an Strahlung 2.5 Gy, 5 Gy oder 10 Gy. Um dem Aufbaueffekt entgegenzuwirken und eine homogene Strahlendosis sicherzustellen wurden die Zellen auf einen 10 cm dicken Plexiglasblock gestellt und mit einer 1.5 cm dicken Platte bedeckt. Die genauen Bestrahlungsparameter (Blendenöffnungen, Feldgrößen, Fokusabstand etc.) wurden in einem speziell für die Bestrahlung von Zellen entwickeltem Programm angepasst.

4.2.2 Stimulation der Zellen mit ErPC oder ErPC3

ErPC und ErPC3 wurden von H. Eibl am Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen synthetisiert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Für die *in vitro* Experimente wurde ErPC in 200 µl Ethanol gelöst und mit RPMI-Vollmedium (inkl. 10% FCS) auf eine Konzentration von 10 mM eingestellt. ErPC3 wurde direkt in RPMI-Vollmedium

gelöst ohne vorheriges Auflösen in Ethanol. Die Endkonzentration des Stocks betrug ebenfalls 10 mM.

Die Stimulation der Zellen erfolgte mit Konzentrationen von 12.5 bis 100 μ M, je nach Zelltyp und Versuchsansatz.

4.2.3 Stimulation der Zellen mit TRAIL oder ETR-2

Der verwendete TRAIL-R-Ligand stammt von R&D Systems. Bei den Versuchsreihen wurden zwei verschiedene Chargen verwendet, die sich in ihrer Wirkeffizienz deutlich unterschieden. Daher kamen Konzentrationen von 10 ng/ml bei der schlechter wirksamen Charge zum Einsatz und Konzentrationen von 1 ng/ml bei der besser wirksamen Charge. Beide Konzentrationen liefern äquivalente Effekte in den Zellen.

Der stimulierende Antikörper ETR-2 gegen den TRAIL-Rezeptor-2 wurde von Human Genome Sciences zur Verfügung gestellt. Für die Versuche wurde er in einer Endkonzentration von 1 μ g/ml eingesetzt.

4.2.4 Kombinierte Behandlungsansätze

Bei Kombinationsbehandlungen mit Bestrahlung (IR) und ErPC bzw. ErPC3 wurde das Alkylphosphocholine direkt im Anschluss an die Bestrahlung - d.h. ca. 5 min nach Beenden des Bestrahlungsvorgangs - auf die Zellen gegeben.

Ebenso wurden bei kombinierter Behandlung aus IR und TRAIL bzw. IR und ETR-2 der Ligand bzw. der stimulierende AK simultan (5 min nach Bestrahlungsende) auf die Zellen gegeben.

Für die Versuche zu den Dreifachkombinationen (Tripel) aus IR, TRAIL und ErPC3 wurde die Dosis an TRAIL auf 0.6 ng/ml herabgesetzt und die des ErPC3 auf 18 μ M reduziert, um einen Kombinationseffekt im Tripel zu ermöglichen. Im zeitlichen Ablauf erfolgte wiederum zunächst die Bestrahlung der Zellen, 5 min später die zeitgleiche Stimulation der Zellen mit TRAIL und ErPC3.

4.3 Immunfluoreszenz

4.3.1 Hoechst/PI-Färbung

Die Hoechst/PI-Färbung dient der Quantifizierung apoptotischer und nekrotischer Zellen. Dabei interkaliert der membrangängige Farbstoff Hoechst 33342 in die DNA aller Zellen,

wodurch diese nach Anregung im DAPI-Filter blau erscheint. Die DNA gesunder Zellen ist somit als normaler blauer Kern zu sehen, während apoptotische Zellen durch Kondensation oder fragmentierte DNA-Verdichtungen charakterisiert sind. Im Gegensatz zu Hoechst ist PI nicht membrangängig und färbt daher nur Zellen an, deren Barrierefunktion (Semipermeabilität) zerstört ist. Dies trifft für späte Apoptosen und Nekrosen zu, weshalb Nekrosen als pink gefärbte Zellkerne erscheinen und späte Apoptosen zusätzlich zur pinken Färbung kondensierte Kernfragmente aufweisen.

Für die Versuche wurde Hoechst 33342 in einer Endkonzentration von 1.5 μM sowie PI in einer Endkonzentration von 2.5 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt und die Zellen 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Zellkernmorphologie im Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200 beurteilt und die Anzahl apoptotischer und nekrotischer Zellen mit Hilfe eines Cell-Counters ausgezählt. Dabei wurden die Farbstoffe mit einer Quecksilberlampe unter Benutzung eines G365/FT395/LP420 Filtersets angeregt.

Die Zellen wurden mit 40x Vergrößerung analysiert und mit einer CCD-Kamera (Zeiss AxioCam MR) dokumentiert.

4.3.2 H2AX-Focibildung

Bei der Immunfluoreszenzfärbung werden Proteine in der Zelle angefärbt, um z.B. deren Lokalisation sichtbar zu machen. Dabei bindet bei der Färbung der primäre Antikörper (AK) spezifisch an das Zielprotein. Über einen sekundären AK, der mit einem Fluorochrom gekoppelt ist und gegen den primären AK gerichtet ist, kann man das gewünschte Zielprotein nachweisen: Regt man das Fluorochrom des Zweit-AK mit den entsprechenden Fluoreszenzfiltern im Fluoreszenzmikroskop an, kann das spezifische Signal detektiert werden. Mittlerweile gibt es auch immer mehr direkt markierte Erst-AK, wodurch man sich die Färbung mit dem Zweit-AK erspart und das Protokoll deutlich kürzer und weniger hintergrundbehaftet (durch unspezifische Bindungen des Sekundär-AK) wird.

Für den Versuch wurden T98G Zellen auf Deckgläschen in 6-well-Platten ausgesät und nach dem Anwachsen durch Behandlung mit ionisierender Strahlung, ErPC3 oder der Kombination aus beiden stimuliert. 3, 6 bzw. 24 h nach Behandlung wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 min bei RT mit 4% PFA fixiert. Nach anschließendem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 5 min auf Eis mit 0,2% Triton-X 100 permeabilisiert und erneut 2x mit PBS gewaschen. Das Blocken erfolgte für 30 min in 5% FCS/PBS bei RT. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bei 4°C für 45 min mit dem Erst-AK inkubiert: Dazu wurden 50 μl AK-Lösung (P-H2AX, 1:100 in 2% FCS/PBS) auf Parafilm getropft und das Deckglas mit den Zellen nach unten auf die AK-

Lösung gelegt. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen äquivalent mit dem Zweit-AK inkubiert (Cy3 goat anti-rabbit, 1:50 in 2% FCS/PBS). Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann zum Anfärben der Zellkerne für 10 min mit Hoechst 33342 bei RT inkubiert (Hoechst 33342, 1.5 μ M in PBS). Schließlich werden die Zellen noch einmal mit PBS gewaschen und anschließend in Fluoromount-G mounting solution auf Objektträger aufgebracht. Nach ca. 10-15 min werden die Deckgläser luftdicht mit Nagellack umschlossen.

Die Analyse erfolgte im Konfokalen Laser Scan Mikroskop (Leica TCS NT).

4.4 Koloniebildung

Im klinisch relevanten Koloniebildungstest (Kobi) wird untersucht, welcher Anteil an Zellen nach Behandlung noch in der Lage ist Kolonien zu bilden (surviving fraction). Dabei wird eine Kolonie als Zellhaufen aus mindestens 50 Zellen definiert.

Für den Kobi wurden exponentiell wachsende Zellen geerntet und in 6-well-Platten oder 25 cm² bzw. 75 cm² Flaschen in einer Zelldichte von 50 bis 128000 Zellen ausgesät. Die Zellzahl war hierbei abhängig von der nachfolgenden IR- bzw. ErPC/ErPC3-Dosis. Um zu gewährleisten, dass die Zellen als einzelne Zellen anwachsen und keine initialen Zellhaufen bilden können, mussten für größere Anfangseinsaaten entsprechend größere ZK-Gefäße verwendet werden.

Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen in entsprechend hoher Verdünnung ausgesät, insgesamt wurden dafür zwei verschiedene Zellzahlen in jeweils 12-facher Ausfertigung eingesetzt. Die Behandlungen erfolgten ebenfalls immer in mehrfacher Zellverdünnung, wobei für jede Zellverdünnung im 6-well sechs Replikate und für jede Aussaat in Flaschen drei Replikate einbezogen wurden.

24 h nach der Einsaat wurden die Zellen bestrahlt (2.5 Gy, 5 Gy oder 10 Gy), mit ErPC (5 μ M, 12.5 μ M, 16 μ M, 20 μ M, 25 μ M) bzw. ErPC3 (5 μ M, 12.5 μ M, 16 μ M) stimuliert oder der kombinierten Behandlung unterzogen. Anschließend wurden sie je nach Behandlung bis zu 6 Wochen unter Standardbedingungen kultiviert.

Ab 5 Tagen nach Behandlung wurden alle Ansätze täglich kontrolliert und „abgeschlossene“ Proben wurden abgestoppt. Dabei wurde ein Ansatz als abgeschlossen interpretiert, sobald die einzelnen Kolonien in ausreichendem Maße gewachsen waren (> 50 Zellen/Kolonie) aber gleichzeitig die Wells bzw. Flaschen noch nicht überwuchert waren, so dass man die einzelnen Kolonien noch deutlich voneinander abgrenzen konnte.

Zum Abstoppen des Wachstums und Anfärben der Kolonien wurde zunächst das Medium abgesaugt, dann die Zellen für 10 min bei RT in 3,7% Formaldehyd fixiert. Anschließend werden die Zellen für 10 min bei RT in 70% Ethanol inkubiert und danach mit H₂O gewaschen. Dann wurden die Zellen für ca. 30-40 min bei RT mit 0.05% Coomassie-Lösung angefärbt und abschließend erneut mit H₂O gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die Koloniebildung unter jeder Behandlung mit Hilfe eines Binoculars (Stemi 2000, Zeiss) ausgezählt und die Ergebnisse ausgewertet.

4.5 Isobologramm-Analysen

Die Effizienz der kombinierten Behandlungsansätze aus ErPC und IR bzw. ErPC3 und IR wurde durch Isobologramm-Analysen bewertet. Ausgehend von den gemessenen Werten für die Einzelbehandlungen werden daraus Daten für die kombinierte Behandlung extrapoliert (Berenbaum, 1978). Die so erhaltenen Daten definieren einen geometrischen Bereich, der als „Envelope of additivity“ bezeichnet wird. Die tatsächlich aus der kombinierten Behandlung erhaltenen Ergebnisse werden nun mit den kalkulierten Daten verglichen: Liegen die Werte unterhalb des „Envelope of additivity“ kann man von Synergismus sprechen, befinden sie sich innerhalb liegt Additivität der Einzelbehandlungen vor. Wenn die erhaltenen Ergebnisse oberhalb des „Envelope of additivity“ liegen, muss man von inhibierenden Effekten ausgehen.

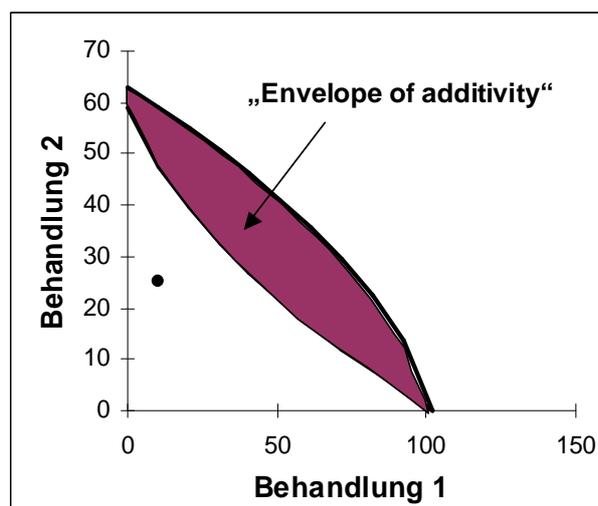


Abbildung 4.1 Diagramm einer typischen Isobologramm-Analyse

An den beiden Koordinaten-Achsen werden die jeweiligen Behandlungen abgetragen. Der rot markierte Bereich entspricht dem „Envelope of additivity“ und kennzeichnet das Areal, in dem Werte der Kombinationsbehandlung für additive Wirkeffekte liegen würden. Der eingezeichnete schwarze Punkt zeigt den tatsächlich gemessenen Wert unter Kombination XY an. Aus der Relation des Punktes zur roten Fläche lässt sich dann die Effektivität der Behandlung (Additivität, Synergismus oder Inhibierung) ableiten.

4.6 FACS-Analysen

Die Durchflusszytometrie, alternativ beim Sortieren von Zellen auch als FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) bezeichnet, ermöglicht die Analyse einzelner Zellen oder Zellkerne, die an einem Flüssigkeitsstrom durch einen Lichtstrahl treten. Bei der Messung werden die Zellen vom Durchflusszytometer (Abbildung 4.2) mit Überdruck durch eine Messkapillare gesaugt und beschleunigt, wobei ein gleichmäßiger Strom aus einzeln hintereinander gereihten Zellen entsteht. Dieser wird an einem Argonlaser der Wellenlänge 488 nm vorbeigeleitet, dessen Strahl durch die Zellen abgelenkt wird. Dabei wird das Ausmaß der Lichtstreuung durch Photodetektoren erfasst. Die Streuung des Lichts erfolgt zum Großteil in Vorwärtsrichtung (FSC: Forward light Scatter) und ist ein Maß für die Größe der Zellen. Ein weiterer Anteil wird im rechten Winkel zum einfallenden Laserstrahl gestreut (Seitwärtsstreu-licht, SSC: Side Scatter) und dient als Maß für die Morphologie und intrazelluläre Granularität der Zelle.

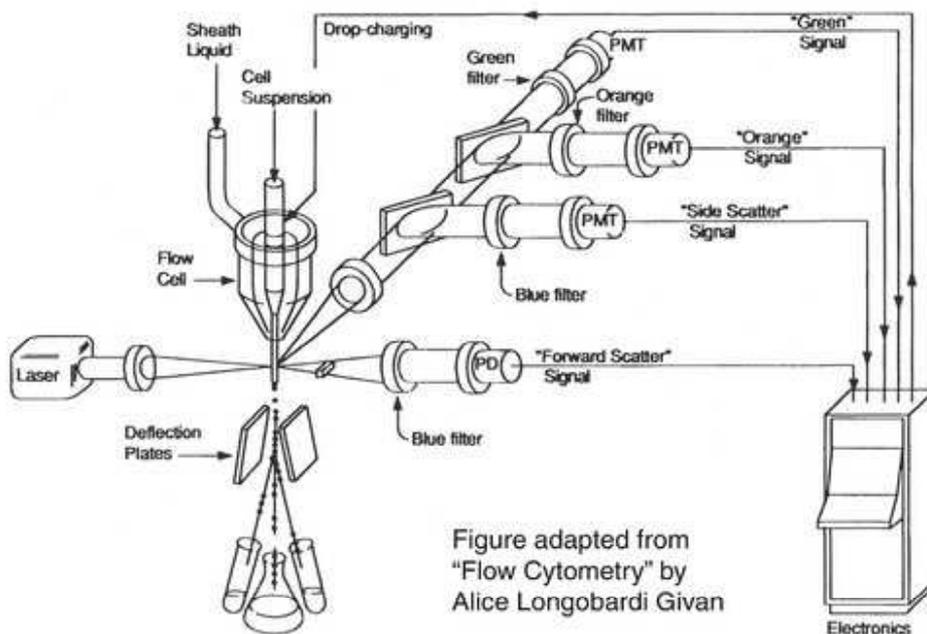


Abbildung 4.2 Aufbau eines FACS-Gerätes, schematische Darstellung

Die Zellen können zusätzlich mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern markiert werden. Die Fluorochrome werden durch den Laser angeregt und emittieren Licht spezifischer Wellenlänge (je nach Fluoreszenzfarbstoff), die von Photodetektoren gemessen werden. Durch die Verwendung von Bandpass-Filtern besteht die Möglichkeit die Fluoreszenz in drei verschiedenen Kanälen zu detektieren (FL1 = 537 nm, FL2 = 597 nm, FL3 = 650 nm): Diese filtern unpolarisiertes Licht heraus und ermöglichen damit die selektive Messung bei den entsprechenden Wellenlängen. Für die Auswertung können die Daten im Punktwolkendiagramm (Dot Plots) oder im Histogramm dargestellt werden. In einem Histogramm werden die

Häufigkeitsverteilungen der Fluoreszenzen aufgetragen, wobei auf der x-Achse die Lichtintensität abgetragen ist und auf der y-Achse die Zellzahl. Im Dot-Plot wird jedes gemessene Ereignis durch einen Punkt repräsentiert und die Lichtintensitäten zweier beliebiger Parameter in einem x/y-Diagramm dargestellt.

4.6.1 Viabilität (PI-Exclusion)

Zur Bestimmung der Viabilität von Jurkat-Zellen wurden diese in FACS-Röhrchen überführt und für 3 min bei 1000 rpm pelletiert. Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellen in 5 µg/ml Propidiumiodid in PBS resuspendiert und für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden im FACS die FSC/SSC-Charakteristika der Proben sowie die Propidiumiodid-Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzkanal FL-2 gemessen.

Da gesunde Zellen eine intakte Membran besitzen kann das nicht membrangängige PI nicht in die Zelle aufgenommen werden und somit nicht in die DNA interkalieren. Zellen mit einer beschädigten Membran (tote Zellen) nehmen den Farbstoff auf und können dadurch angefärbt werden. Solche Zellen weisen eine erhöhte PI-Fluoreszenz auf, die sich im Diagramm durch eine Rechtsverschiebung der Kurve äußert.

4.6.2 Mitochondriales Membranpotential (TMRE)

In jeder intakten Zelle besteht aufgrund der mitochondrialen Energieproduktion ein Transmembranpotential ($\Delta\psi_m$) über der inneren Mitochondrienmembran (Murphy and Brand, 1988). Polare Farbstoffe wie das kationische lipophile TMRE (Tetramethylrhodaminethylester) reichern sich an der inneren Membran (innen negatives elektrisches Potential) von Mitochondrien mit intaktem Membranpotential an (Scaduto and Grotyohann, 1999). Hierfür muss jedoch der Protonengradient über der inneren Membran des Mitochondriums erhalten sein.

Daher zeigen gesunde Zellen eine Anfärbung mit TMRE, die im FL-2 Kanal des FACS erfasst werden kann, während apoptotische Zellen, deren $\Delta\psi_m$ abfällt, sich nicht mehr anfärben lassen. Im Histogramm stellt sich der Verlust an $\Delta\psi_m$ als Linksverschiebung der Kurve dar.

Zur Messung von $\Delta\psi_m$ werden die Zellen geerntet, in ein FACS-Röhrchen überführt und bei 1000 rpm für 3 min pelletiert. Die Zellen werden in TMRE-Lösung (25 nM TMRE in Medium) aufgenommen, für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend direkt im FACS gemessen.

4.6.3 Apoptose und Zellzyklus (Nicoletti)

Die Apoptoserate sowie die Verteilung der Zellen im Zellzyklus nach Stimulation mit verschiedenen Therapeutika bzw. IR wurde nach Nicoletti (Nicoletti et al., 1991) bestimmt. Dazu wurden die Zellen pelletiert (1000 rpm, 3 min) und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet in hypotonen Puffer mit 5 µg/ml PI und 0.1% Triton X-100 aufgenommen und die Zellen für 60 min bei RT angefärbt. Direkt im Anschluss wurden die Proben im Fluoreszenzkanal FI-2H vermessen. Durch die Behandlung entstandener Zelldebris wurde durch entsprechendes Einstellen eines Schwellenwertes für die Zellgröße bzw. durch Verwendung von Gates aus der Auswertung ausgeschlossen.

Bei der Messung ergibt sich folgendes Bild: Apoptosen sind gekennzeichnet durch Fragmentierung chromosomaler DNA in kleine Bruchstücke (180 Basenpaare oder ein vielfaches davon), die durch enzymatischen Verdau der DNA zwischen Histonproteinen entstehen. Durch die Fragmentierung des Zellkerns beobachtet man bei der DNA-Färbung apoptotischer Zellen einen niedrigeren DNA-Gehalt als bei normalen Zellen in der G1-Phase weswegen man von „sub-G1“ spricht.

Durch Verwendung von Triton und hypotonem Puffer wird auch die Membran von gesunden Zellen durchlässig für PI, so dass in allen Zellen die Phasen des Zellzyklus sichtbar werden. Bei gesunden Zellen kann man einen Peak für diploide (G0/G1) und einen für tetraploide DNA (G2/M : Zellen, die kurz vor der Teilung stehen und somit vierfachen Chromosomensatz besitzen) detektieren. Dazwischen befindet sich ein Tal, in dem die Zellen der S-Phase angezeigt werden. Die DNA-Fragmente, die bei Apoptose entstehen, werden aus dem Kern und der Zelle ausgeschwemmt, weswegen sich der reduzierte DNA-Gehalt apoptotischer Zellen als hypodiploider Gipfel darstellt (sub G1).

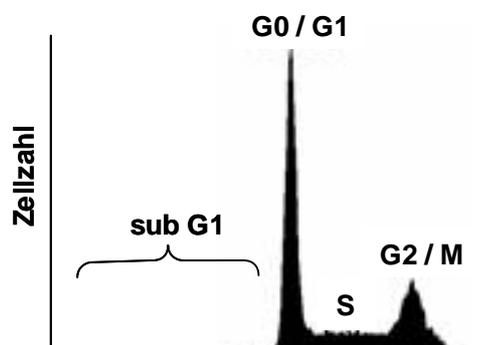


Abbildung 4.3 Grafische Darstellung des Zellzyklus nach Nicoletti-Messung

Auf der X-Koordinate wird der DNA-Gehalt der Zellen abgetragen, auf der Y-Koordinate die gemessenen Ereignisse mit entsprechendem DNA-Gehalt, also hier die Anzahl der Zellen. In G0/G1 besitzen die Zellen normalen diploiden Chromosomensatz, im Verlauf der S-Phase steigt der DNA-Gehalt durch Neu-Synthese an, was durch eine Rechtsverschiebung der Events sichtbar wird. Als G2/M-Peak erscheinen die Zellen mit tetraploidem Chromosomensatz, die ihre DNA bereits dupliziert, die Mitose jedoch noch nicht vollendet haben.

4.6.4 Bax-Aktivierung

Das proapoptotische Protein Bax liegt inaktiv im Zytoplasma vor. Die Aktivierung von Bax erfordert Konformationsänderungen im Protein, wodurch die Translokation zum Mitochondrium ermöglicht wird sowie seine Insertion in die äußere Mitochondrienmembran (Dejean et al., 2005).

Um zu analysieren, ob Behandlung mit IR, ErPC3 oder der Kombination aus beiden zu einer verstärkten Konformationsänderung und somit Aktivierung von Bax führt, wurde diese mittels eines aktivierungsspezifischen Antikörpers im FACS untersucht.

Dazu wurden T98G-Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und anschließend in 200 µl 0,1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen für 15 min mit Blocking-Puffer (10% FCS in PBS) inkubiert. Danach wurde 0,1 µg Primärantikörper (anti-Bax-NT, upstate) in 10% FCS/PBS auf 1×10^5 Zellen gegeben und diese für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit Blocking-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (FITC goat anti-rabbit, dianova) für 30 min im Dunkeln bei 4°C. Dazu wurden ebenfalls 0,1 µg AK in 10% FCS/PBS auf 1×10^5 Zellen eingesetzt. Schließlich wurden die Zellen mit PBS gewaschen, das Pellet in PBS resuspendiert und die Fluoreszenz im FACS auf dem Kanal FL-1 detektiert. Der gemessene Fluoreszenzshift wurde über den sogenannten „geo mean“ quantifiziert.

4.6.5 Oberflächenrezeptor-Expression von ETR-1 und ETR-2

Zur Bestimmung der TRAIL-R1/R2-Oberflächenexpression werden die Zellen mit einem Antikörper markiert, der gegen die TRAIL-Rezeptoren R1/R2 gerichtet ist und direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin gekoppelt ist.

Dazu wurden von jeder Zelllinie vier Proben mit ca. 250.000 Zellen pelletiert (3min, 1000 rpm). Nach Verwerfen des Überstands wurden die Proben 2x mit 5% FCS in PBS gewaschen und dann in 100 µl 5% FCS/PBS aufgenommen. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit den Antikörpern: Die erste Probe jeder Zelllinie blieb als Kontrolle unmarkiert. Eine weitere Kontrolle wurde durch Markierung mit Phycoerythrin-gelabeltem humanem IgG erzielt, das im Verhältnis 1:20 zugegeben wurde. Zu den beiden verbleibenden Proben wurde jeweils der entsprechende TRAIL-Rezeptor-AK in der Verdünnung 1:20 zugegeben. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln wurden die Proben 2x mit 5% FCS/PBS gewaschen und anschließend in 250 µl FACS-Flow aufgenommen. Die Messung der Proben erfolgte direkt im Anschluss im Fluoreszenzkanal FL-2.

4.7 Western Blot

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurde in Analogie zu den DNA- und RNA-Nachweisverfahren (Southern- und Northern-Blot) die Methode des Western Blot entwickelt (Burnette, 1981). Hierbei werden die Proteine zunächst über eine Gelelektrophorese nach der Größe aufgetrennt und anschließend im elektrischen Feld vom Gel auf eine Membran übertragen. Die auf der Membran immobilisierten Proteine werden dann mit einem spezifischen Antikörper inkubiert, der gegen das nachzuweisende Protein gerichtet ist.

Diesen Antikörper kann man über unterschiedliche Methoden nachweisen, durchgesetzt haben sich hauptsächlich nicht-radioaktive Methoden, bei denen ein sekundärer Antikörper gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers eingesetzt wird. Dieser ist mit einem Enzym gekoppelt, das eine Reaktion katalysiert, die sich mit einfachen Mitteln nachweisen lässt.

4.7.1 Herstellen von Zelllysaten

Zur Herstellung der Ganzzelllysate wurden die Zellen zu entsprechenden Zeitpunkten nach Behandlung geerntet, wobei die adhärenenten Glioblastomzelllinien mit 0,05% Trypsin/EDTA abgelöst wurden. Anschließend wurden die Zellen in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und für 4 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und die Zellen in ein Eppendorf-Cup überführt. Von der Zellsuspension wurden 10 µl zur Bestimmung der Zellzahl entnommen, der Rest wurde bei 1000 rpm für 4 min bei 4°C in der Tischzentrifuge pelletiert. Zwischenzeitlich wurde die Zellzahl der Proben bestimmt und das Pellet in 100 µl CST-Puffer je 1×10^6 Zellen aufgenommen. Danach wurden die Proben für 10 min bei 99°C aufgeköcht und anschließend bis zum Auftragen der Gele bei -20°C eingefroren.

4.7.2 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt durch SDS-Polyacrylgelelektrophorese (Laemmli, 1970) unter denaturierenden Bedingungen. SDS denaturiert Proteine und geht nicht-kovalente Wechselwirkungen mit hydrophoben Bereichen ein. Dabei ist das Verhältnis von SDS-Molekülen pro Aminosäure annähernd konstant. Durch die komplette Entfaltung und den Besatz mit SDS werden Ladungsunterschiede zwischen den einzelnen Proteinen ausgeglichen. Alle Proteine sind nun negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderung der Proteine hängt hierbei neben der Durchlässigkeit der Matrix noch vom Molekulargewicht der Proteine ab. Dabei wandern kleine Proteine schneller als größere.

Als Matrix dienen vertikale Gele aus mit Bisacrylamid vernetztem Acrylamid, die aus einem niedrigprozentigen Sammelgel und einem 8 bis 14%igem Trenngel bestehen - je nach erwünschtem Auftrennungsgrad bzw. nach der Größe des zu detektierenden Proteins. Die Pufferbedingung im Sammelgel gewährleistet das Entstehen einer einheitlichen Proteinfront, diejenige im Trenngel sorgt für eine optimale Auftrennung der Proteine.

Die Polymerisation des Acrylamids ist eine Radikalkettenreaktion, die durch den Zerfall von Peroxidsulfationen (APS 10%) eingeleitet wird. Die Radikale aktivieren in einem zweiten Schritt Tetramethylethyldiaminmoleküle (TEMED 0,08%), deren Radikale die eigentlichen Initiatoren der Radikalkettenpolymerisation sind.

Vor dem Gießen des Gels wurden die Glasplatten mit Ethanol gereinigt.

Damit sich eine glatte Lauffront ausbildet und das Gel nicht austrocknet, wurde das Trenngel während der Polymerisation mit 70% EtOH überschichtet. Nach dessen Entfernen wurde das polymerisierte Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet.

Als Pufferlösung wurde 1x SDS-Laufpuffer eingesetzt.

Bedingungen für den Gellauf: Die Proben wurden im Sammelgel zunächst bei 60 V für ca. 45 min einlaufen gelassen, bis die Lauffront das Trenngel erreichte. Der restliche Gellauf erfolgte bei 160 V.

Zusammensetzung der Gele:

Für den Nachweis von Noxa im Western Blot wurde ein 14%iges Gel verwendet, für die Überprüfung der restlichen Proteine standardmäßig ein 12%iges Gel eingesetzt.

	Trenngel		Sammelgel
	12%	14%	6%
Wasser	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
Trennpuffer	5,25 ml	4,25ml	---
Sammelpuffer	---	---	1,75 ml
Gel 30	6 ml	7 ml	1,5 ml
10% APS	75 µl	75 µl	70 µl
Temed	7,5 µl	7,5 µl	7µl
20 % SDS	75 µl	75 µl	---

4.7.3 Transfer

Die über die SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden nach dem Tankblotverfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde die Membran zunächst für 1 min in 100% Methanol vorinkubiert und anschließend in Transferpuffer ohne Methanol

gelegt. Dann wurden die Gele abgebaut und in Transferpuffer ohne Methanol gelegt. Anschließend wurde das Sandwich in einem Plastikrahmen wie folgt für den Transfer aufgebaut:

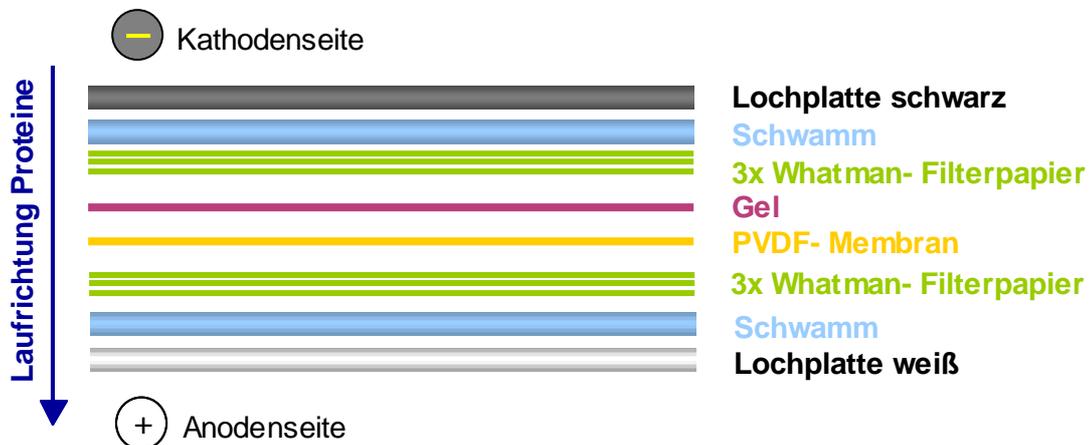


Abbildung 4.4 Schichtung des Sandwichs beim Transfer

Bei der Schichtung der einzelnen Lagen wurde bei jedem Schritt auf die Vermeidung bzw. Entfernung von Luftblasen geachtet. Nach dem Aufbau wurde der Rahmen geschlossen und in einer Blotkammer mit Transferpuffer fixiert. Der Transfer erfolgte bei 80 V für 60 min im Kühlraum bei 4°C.

4.7.4 Entwicklung

Nach dem Transfer wurde die Membran zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Antikörper für 60 min bei RT in 5 % Milch in TBS-Tween auf einem Schüttler geblockt. Anschließend wurde der Erstantikörper in entsprechender Verdünnung in 5% BSA in TBS-Tween (vgl. 3.3.1) zugegeben und die Membran über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal für 5 min und zweimal für 10 min mit TBS-Tween gewaschen und dann für 1-2 h in mit einem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper in 5% Milch/TBS-Tween (Verdünnung 1:2000) bei RT inkubiert. Es folgte erneutes Waschen, zweimal für 5 min und zweimal für 10 min in TBS-Tween. Anschließend wurden die zu detektierenden Proteinbanden mit dem ECL Western Blotting Detection System (Amersham) nachgewiesen.

Das enhanced-chemiluminescence (ECL) System ist eine nicht-radioaktive Methode zur Detektion von Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP), die an den Zweitantikörper gebunden ist. Die HRP oxidiert das organische Substrat Diacylhydrazid Luminol, das sich dann in einem angeregten Zustand befindet. Aus diesem kehrt es unter

Lichtemission in seinen Grundzustand zurück, wobei die Emission des Lichts durch Belichtung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht wird. Dadurch wird die Position des spezifisch gebundenen Antigens auf der Membran nachgewiesen. Die Schwärzung des Films ist - in gewissen Grenzen - der Menge an gebundenem Antikörper und somit an nachzuweisendem Protein proportional.

4.7.5 Strippen und Reproben eines Western Blots

Um auf einer Membran nach der Detektion mit den Antikörpern weitere Proteine nachzuweisen, können die gebundenen Antikörper-Konjugate durch ein Strippen der Membran entfernt und neue Antikörper aufgebracht werden.

Dazu wurde die Membran nach der Entwicklung kurz mit TBS-Tween gewaschen und anschließend für 30 min in Stripping-Puffer bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Membran 2 x für 10 min in TBS-Tween gewaschen und für 1 h mit 5% Milchpulver in TBS-Tween geblockt. Nun erfolgte die Entwicklung mit Antikörpern wie oben beschrieben.

4.8 Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNA

Small interfering RNAs (siRNAs) sind 21-28 Nukleotide lange RNAs. Sie entstehen entweder auf natürliche Weise im Zytoplasma beim Zerschneiden einer längeren dsRNA durch das Enzym Dicer oder werden von außen künstlich in die Zelle zum Stilllegen von Genen eingebracht. Der antisense-Strang des kleinen RNA-Fragments wird anschließend in den Proteinkomplex RISC (RNA-induced silencing complex) eingebaut, wo er über Basenpaarbindung an die entsprechende mRNA bindet. Dadurch gelangt der RISC-Komplex mit seinen RNA-Helicase- und Endonuklease-Aktivitäten in räumliche Nähe zur mRNA, was ihre Entwindung und ihren Abbau zur Folge hat (Abbildung 4.5).

Für die Versuche wurde Bak siRNA der Firma Dharmacon eingesetzt. Um sicherzustellen, dass der beobachtete Effekt nicht auf die Transfektion an sich zurückzuführen war oder auf unspezifisches Gensilencing, wurden im Versuch weitere Kontrollen mitgeführt. Zum einen wurden Zellen mock-transfiziert, d.h. ohne Zugabe von siRNA der Transfektionsprozedur unterzogen. Zum anderen wurden Transfektionen mit einer nicht funktionellen siRNA (non-targeting) durchgeführt. Sie wurde ebenfalls von Dharmacon bezogen.

In der Woche vor der Transfektion wurde streng darauf geachtet, dass die Zellen nicht dichter wuchsen als 300.000 pro ml, damit die Zellen in exponentieller Wachstumsphase blieben und die Bedingungen für die Transfektion optimal sind.

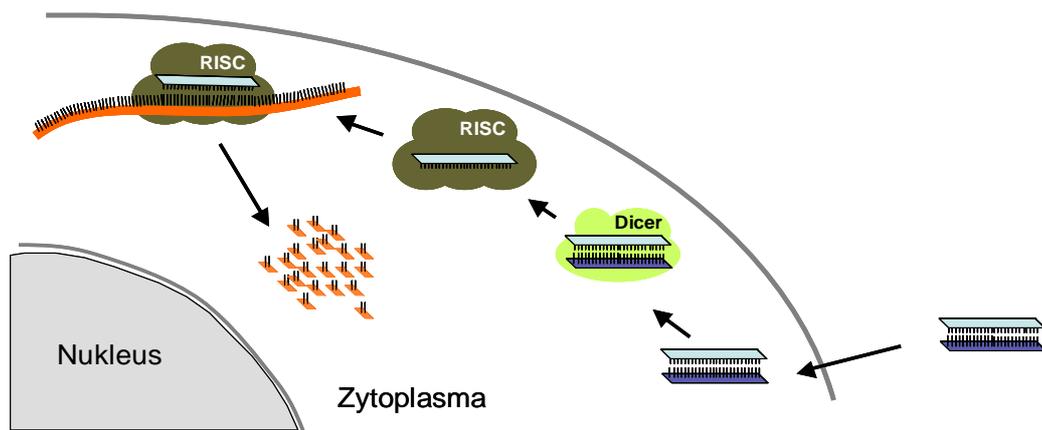


Abbildung 4.5 Modell der RNA-Interferenz

Maßgeschneiderte ds-RNA von 18-21 bp Länge werden mittels Elektroporation oder Lipofektion ins Zytoplasma der Zelle eingebracht und in die Enzym-Komplexe Dicer bzw. RISC eingebaut. Im RISC wird jedoch nur der antisense-Strang gebunden, der komplementär an die entsprechende mRNA bindet, die dann durch die Enzyme des RISC abgebaut werden kann.

Für die Transfektion wurden die Bak-positiven JCAM-Zellen einmal mit PBS durch Zentrifugation über 5 min bei 1200 rpm bei RT gewaschen. Durch Zugabe von RPMI Vollmedium ohne Phenolrot wurde eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. 200 μ l dieser Zellsuspension - entsprechend 2×10^6 Zellen - wurden für die Transfektion eingesetzt. Diese erfolgte über Elektroporation mit einem Rechteckpulse erzeugenden Elektroporator (EPI 2500 von Dr. L. Fischer) in 4 mm-Elektroporationsküvetten bei 400 V für 10 ms. Dabei wurden jeweils 1 μ M Bak siRNA bzw. non-targeting siRNA eingesetzt. Direkt nach der Elektroporation wurden die Ansätze in RPMI-Vollmedium ohne Phenolrot überführt und auf eine Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml eingestellt sowie 24 h nach der Transfektion 6 ml RPMI-Vollmedium je Transfektionsansatz zugegeben. Nach weiteren 24 h wurden die Ansätze ausgezählt und für weitere Versuche ausgesät:

2×10^5 Zellen wurden eingesetzt für Viabilitäts-Messungen im FACS, um zu überprüfen, wie viele Zellen bei der Transfektionsprozedur abgestorben sind.

3×10^5 Zellen je Ansatz wurden für Versuche ausgesät, in denen die Zellen mit 10 Gy bestrahlt, mit 25 μ M ErPC3 oder 1 ng/ml TRAIL behandelt wurden bzw. den jeweiligen Kombinationsbehandlungen aus IR und Wirkstoff unterzogen wurden. 24h nach der Stimulation wurde im FACS die Apoptoserate über Nicoletti bestimmt sowie der Status des mitochondrialen Membranpotentials mittels TMRE gemessen.

Der verbleibende Teil der Zellen wurde für Lysate eingesetzt, um im WB die Effizienz und Spezifität des Silencing zu überprüfen.

5. Ergebnisse

5.1 Die Alkylphosphocholine ErPC sowie ErPC3 und ihre Wirkung auf Glioblastom- / Astrozytomzellen nach Kombinationsbehandlung mit Bestrahlung (IR)

5.1.1 ErPC und ErPC3 induzieren Apoptose in humanen Gliomzellen

Bereits in früheren Untersuchungen konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass die antineoplastische Aktivität von ErPC auf Apoptose-Induktion zurückzuführen ist (Jendrossek et al., 1999; Jendrossek et al., 2001; Jendrossek et al., 2003). Hierbei spielen vor allem Signalwege des intrinsischen Apoptosesignalwegs eine entscheidende Rolle. Um frühere Ergebnisse bezüglich der Bedeutung von Apoptose für den zytotoxischen Effekt des Alkylphosphocholins ErPC zu vertiefen, wurden Dosis-Wirkungs-Analysen sowie Zeitverlaufs-Studien für die Substanz in verschiedenen Gliomzellen durchgeführt. Zum Einsatz kamen dabei die Glioblastomzelllinien T98G und U87MG sowie die Astrozytomzelllinie A172. Für die Zelllinie T98G wurden außerdem Dosis-Wirkungs-Untersuchungen mit dem für klinische Studien geeigneteren ErPC-Derivat ErPC3 durchgeführt.

Im folgenden wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (12,5 - 100 μM) an ErPC bzw. ErPC3 behandelt und die Zelltodrate mittels Hoechst/PI-Färbung im Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Der membrangängige Farbstoff Hoechst interkaliert in die DNA aller Zellen, wodurch sich diese nach Anregung im Fluoreszenzmikroskop blau darstellen lassen. Im Gegensatz zu Hoechst ist PI nicht membrangängig, weshalb man nekrotische von apoptotischen Zellen leicht abgrenzen kann.

Bereits am morphologischen Erscheinungsbild der Zellen konnte man in allen Gliomzelllinien eine deutliche Hemmung des Zellwachstums feststellen, die mit der Dosis an ErPC bzw. ErPC3 korrelierte (Abbildung 5.1). Bei T98G trat dieser Effekt bereits ab 12,5 μM ErPC und deutlich verstärkt bei 12,5 μM ErPC3 auf, wohingegen A172 eine Wachstumsinhibierung erst ab 25 μM ErPC und U87MG erst ab 50 μM zeigten (Abbildung 5.1).

Neben dem Erscheinungsbild des Wachstumsstopps, das im Fluoreszenzmikroskop lediglich qualitativ beurteilt wurde, konnte mit steigender Dosis an ErPC bzw. ErPC3 aber auch ein zunehmendes Zellsterben (Apoptose und Nekrose) beobachtet werden, das außer einer qualitativen Begutachtung auch quantitativ über Zellzählung bestimmt wurde (Abbildung 5.2). In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe (Jendrossek et al., 2001) waren Konzentrationen von 25 bis 50 μM ErPC ausreichend, um Apoptose in T98G und A172 Zellen auszulösen (Abbildung 5.2). Bei U87MG waren höhere Konzentrationen ab

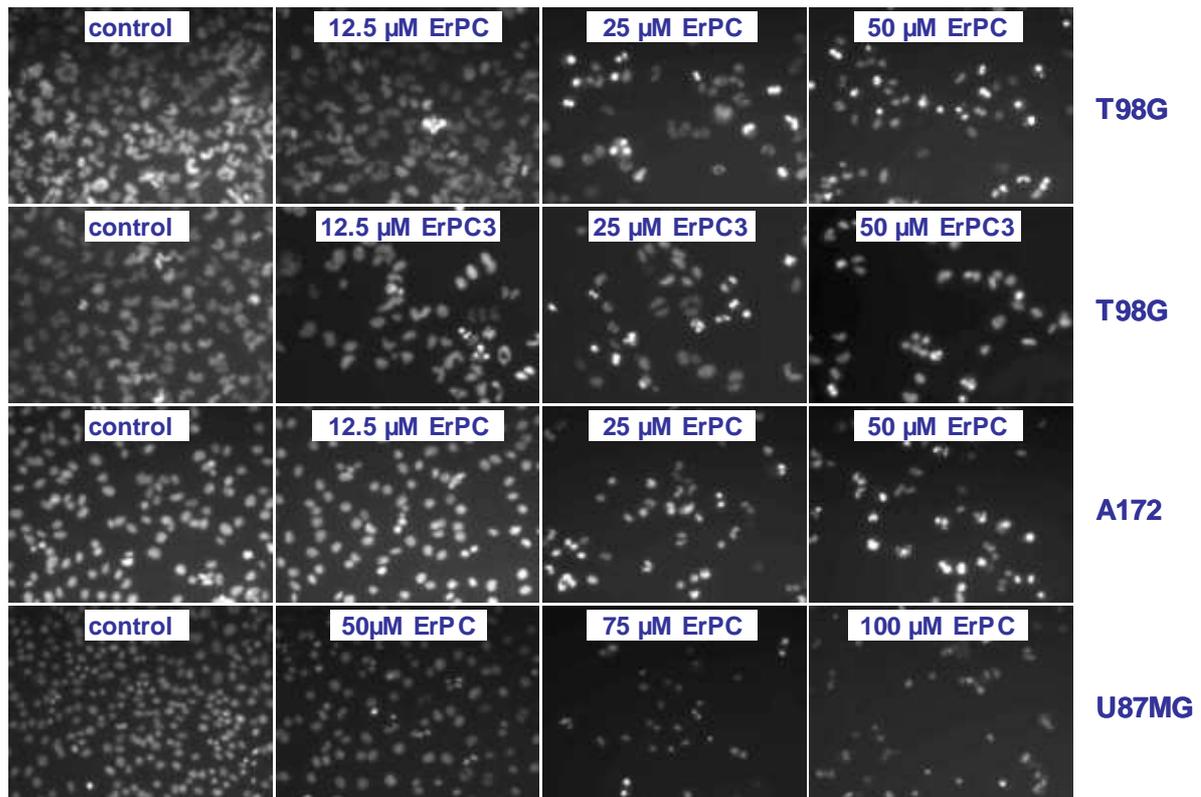


Abbildung 5.1 Wachstumsinhibierung und Apoptose-Induktion in humanen Gliomzellen nach Behandlung mit ErPC bzw. ErPC3

Dargestellt ist die Kernmorphologie von T98G, A172 und U87MG nach Hoechst/PI-Färbung im Fluoreszenzmikroskop 48h nach Behandlung der Zellen mit 12,5 -100 μM ErPC bzw. ErPC3. (Die Fotos zeigen je ein repräsentatives Beispiel aus drei unabhängigen Versuchen.) Mit steigender Dosis an ErPC bzw. ErPC3 konnten ein zunehmender Wachstumsstopp der Zellen sowie erhöhte Apoptose-Raten beobachtet werden.

50 μM bis 100 μM nötig, um vergleichbare Effekte zu erzielen. Im Vergleich der beiden Alkylphosphocholine war ErPC3 in T98G insgesamt etwas wirksamer als ErPC (Abbildung 5.2, A und B).

Bei allen drei Zelllinien ließen sich außerdem deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehungen für ErPC nachweisen: Mit steigender Konzentration an ErPC sank die Zahl lebender Zellen kontinuierlich (Abbildung 5.2, B,C,D). Dabei zeigte sich in T98G bereits bei Dosen ab 25 μM ErPC eine ausgeprägte Zeitabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung, während bei A172 erst ab 50 μM ErPC eine deutliche Verbesserung der Sterberate über die Zeit beobachtet werden konnte. In U87MG wurde eine erhöhte Absterberate der Zellen im Zeitverlauf erst ab Dosen von 100 μM ErPC festgestellt.

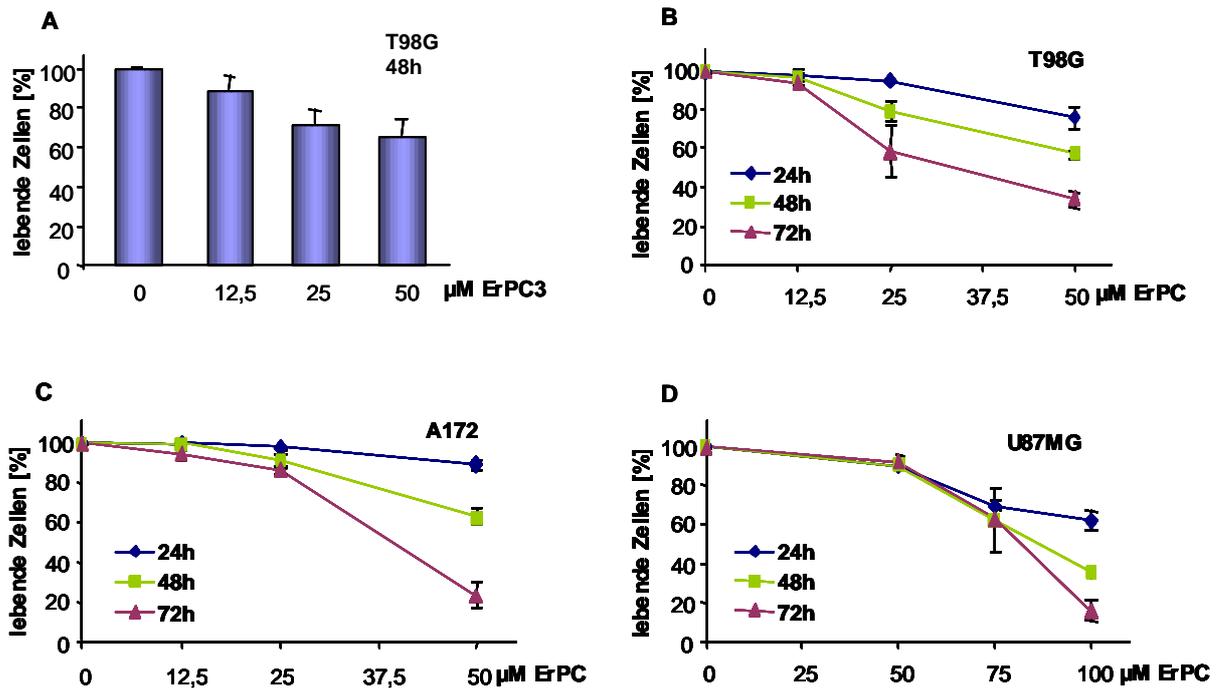


Abbildung 5.2 Zelltod-Induktion in Gliomzellen durch ErPC und ErPC3

Verschiedene Gliomzelllinien wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an ErPC bzw. ErPC3 stimuliert und die Zelltodinduktion im Fluoreszenzmikroskop mittels Hoechst/PI-Färbung analysiert. **[A]** Dosisabhängigkeit von ErPC3 in T98G zum Zeitpunkt 48h nach Stimulation, dargestellt durch den Verlust lebender Zellen.

[B,C,D] Dosisabhängigkeit von ErPC sowie die Zeitkinetiken der Wirkung in T98G, A172 und U87MG, angezeigt durch eine gesteigerte Abnahme an lebenden Zellen.

Der prozentuale Anteil lebender Zellen wurde dabei wie folgt berechnet:

lebende Zellen [%] = 100% - (Apoptose [%] + Nekrose [%])

Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit entsprechender Standardabweichung.

5.1.2 Die malignen Gliomzelllinien T98G, A172 und U87MG sind resistent gegenüber strahleninduzierter Apoptose

Intrinsische Resistenz von malignen Gliomzellen gegenüber ionisierender Strahlung führt zu mangelndem Ansprechen der Therapie und zu Resistenzen innerhalb des Tumors. Um zu untersuchen wie strahlenresistent die vorliegenden Gliomzellen gegenüber strahleninduzierter Apoptose sind, wurden in T98G, A172 sowie U87MG Dosis-Wirkungs-Untersuchungen und Zeitverlaufsstudien für strahleninduzierte Apoptose durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit Einzeldosen von 2,5, 5 oder 10 Gy bestrahlt und die Zelltodrate (Apoptose und Nekrose) über Hoechst/PI-Färbung nach 24, 48 und 72 h ermittelt. Im Gegensatz zur Behandlung mit ErPC oder ErPC3 zeigten sich die Zellen resistent gegenüber strahleninduziertem Zelltod (Apoptose oder Nekrose) (Abbildung 5.3). Sogar 72 h nach der höchsten

Einzeldosis von 10 Gy vermochte Bestrahlung kaum relevante Apoptose oder Nekrose zu induzieren mit maximalen Zelltodraten unter 15% (Abbildung 5.3).

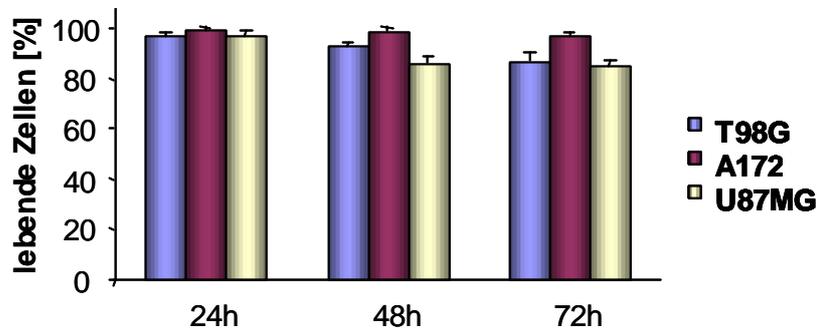


Abbildung 5.3 Resistenz der humanen malignen Gliomzellen T98G, A172 und U87MG gegenüber strahleninduziertem Zelltod

Die Zellen wurden mit einer Einzeldosis von 10 Gy bestrahlt und 24 h, 48 h sowie 72 h nach Bestrahlung wurde der Anteil apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen mittels Hoechst/PI-Färbung im Fluoreszenzmikroskop bestimmt und von der Gesamtzellzahl subtrahiert (ergibt die Zahl lebender Zellen in Prozent). Die Daten zeigen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente mit dazugehöriger Standardabweichung.

5.1.3 ErPC und ErPC3 steigern die zytotoxische Wirkung ionisierender Strahlung auf maligne Gliomzellen

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass ionisierende Strahlung (IR) gleichfalls wie ErPC Apoptose über den intrinsischen mitochondrialen Zelltodweg auslösen kann. Abgesehen von dieser Ähnlichkeit in Bezug auf die Ausführungswege der Apoptose, konnte ErPC jedoch Apoptose und Nekrose in Gliomzellen auslösen, die resistent gegenüber strahleninduziertem Zelltod sind (vgl. Abbildungen 5.2 und 5.3). Diese Beobachtung führte zu der Überlegung, ob eine kombinierte Behandlung aus ErPC bzw. ErPC3 und IR die Strahlenwirkung verbessert. Daher wurden die Zelllinien T98G, A172 und U87MG mit verschiedenen IR-Dosen von 2.5-10 Gy bestrahlt und im Anschluss daran mit Konzentrationen an ErPC von 12.5-100 μM behandelt. 24 bis 72 h nach Behandlung wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop nach Hoechst/PI-Färbung analysiert und die Induktion von Apoptose und Nekrose durch Zellzählung bestimmt. Ebenso wurde die Kombinationswirkung aus ErPC3 und IR nach 48 h in T98G Zellen untersucht.

Abbildung 5.4 A zeigt die Kernmorphologie von T98G Zellen 48h nach Behandlung mit 10 Gy, 50 μM ErPC oder der Kombination aus beiden und erlaubt eine qualitative Aussage über die Wirksamkeit der Behandlungen. Dabei ist deutlich erkennbar, dass Bestrahlung allein zwar einen starken Wachstumsstopp aber kaum Zelltod hervorrief. Stimulation mit ErPC allein erzeugte hingegen neben einem Arrest auch eine starke Induktion des Zelltods.

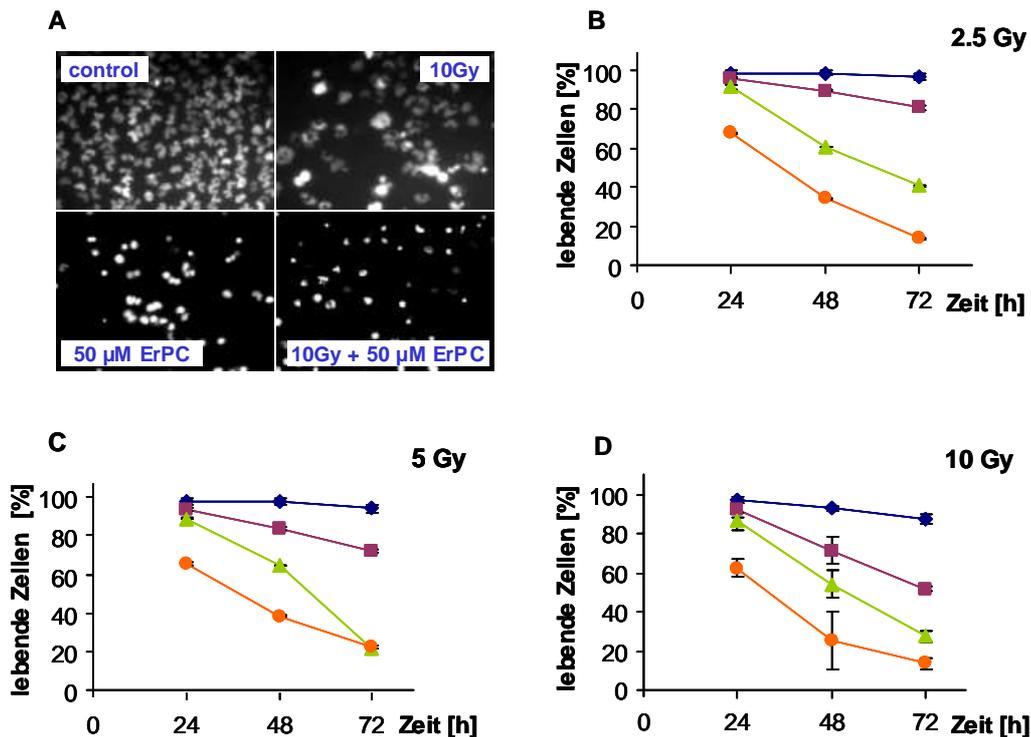


Abbildung 5.4 ErPC erhöht strahleninduzierten Zelltod in T98G

T98G wurden mit einer Einmaldosis von 2,5, 5 oder 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit ErPC in Konzentrationen von 12,5, 25 oder 50 µM ErPC (wie angezeigt) stimuliert. Die Induktion von Apoptose und Nekrose wurde 24, 48 oder 72 h nach Behandlung im Fluoreszenzmikroskop nach Hoechst/PI-Färbung ermittelt. Der prozentuale Anteil lebender Zellen wurde entsprechend Abbildung 5.2 ermittelt. Teil A zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen, in B, C und D sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen aufgetragen.

[A] Kernmorphologie von T98G 48h nach Behandlung mit Medium (control), 10 Gy, 50 µM ErPC oder kombinierter Behandlung aus IR und ErPC.

[B, C, D] Zeitverläufe und Abhängigkeit der kombinierten Wirkung von der ErPC-Dosis

Bei der kombinierten Behandlung aus IR und ErPC hingegen ließ sich ein Kombinationseffekt beobachten mit deutlich erhöhten Zelltodraten im Vergleich zu den Einzelbehandlungen. Die quantitative Auswertung der Ergebnisse ist in den Diagrammen B, C und D der Abbildung 5.4 dargestellt. Bei allen getesteten Strahlendosen war die Effizienz der kombinierten Behandlung abhängig von der Konzentration an ErPC und der Behandlungsdauer: Mit steigenden Dosen an ErPC sowie mit zunehmender Inkubationszeit sank der prozentuale Anteil lebender Zellen deutlich ab und erreichte bei 10 Gy und 50 µM ErPC zum Zeitpunkt 72 h einen minimalen Wert von 13,5 % (Abb. 5.4D).

Ähnlich den Ergebnissen für T98G konnte man auch bei A172 sensitivierende Effekte des ErPC bezüglich strahlendinduzierten Zelltods nachweisen (Abb. 5.5). Wie Abbildung 5.5 A qualitativ verdeutlicht, führte Bestrahlung mit 10 Gy lediglich zu starkem Wachstumsarrest der Zellen ohne Apoptose-Induktion. Im Gegensatz dazu zeigten sich nach Stimulation mit 50

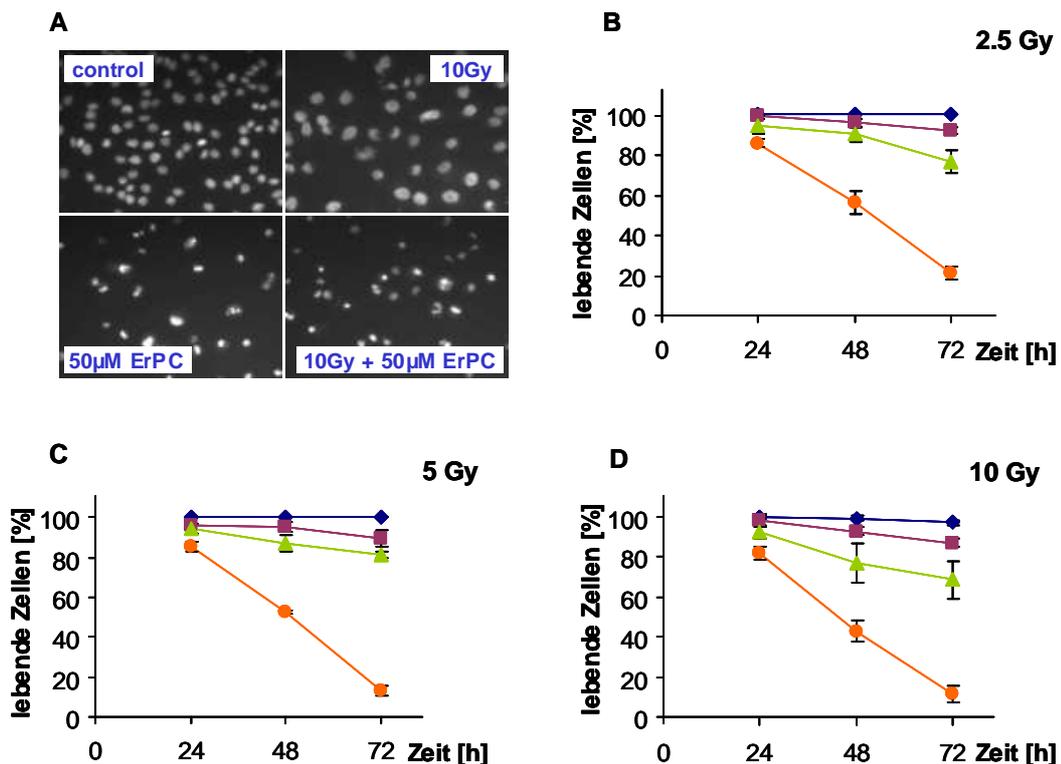


Abbildung 5.5 ErPC erhöht die Zytotoxizität der Bestrahlung in A172

Die Zellen wurden mit einer Dosis von 2.5, 5 oder 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit ErPC der Konzentration von 12.5, 25 oder 50 μM ErPC (wie angezeigt) behandelt. Die Induktion des Zelltods (Apoptose + Nekrose) wurde 24, 48 oder 72 h nach Behandlung im Fluoreszenzmikroskop über Hoechst/PI-Färbung bestimmt. Der Anteil lebender Zellen wurde entsprechend Abbildung 5.2 ermittelt. Teil A zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen, in B, C und D sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

[A] Kernmorphologie von A172 48h nach Behandlung mit Medium (control), 10 Gy, 50 μM ErPC oder kombinierter Behandlung aus IR und ErPC.

[B, C, D] Zeitverläufe sowie Abhängigkeit der Kombination von der ErPC-Dosis

μM ErPC die für Apoptose bzw. Nekrose typischen morphologischen Kernveränderungen, die bei der Kombinationsbehandlung aus IR und ErPC deutlich vermehrt auftraten. Die erhöhte Zytotoxizität der Kombination war dabei wiederum abhängig von der jeweiligen Dosis an IR bzw. ErPC und der Behandlungsdauer (Abb. 5.5C-D). Während die Kombination aus IR und 12.5 μM ErPC bzw. 25 μM ErPC die zytotoxische Wirkung der ionisierenden Strahlung nur mäßig verstärkte, war die Kombination mit 50 μM ErPC effektiver mit maximalen Zelltodraten von 80 bis 90 % nach 72h (Abb. 5.5C-D). Auffallend im Vergleich zu T98G ist die geringe Effizienz niedriger ErPC-Dosen (12.5 und 25 μM), bei Konzentrationen von 50 μM ErPC stimmen die Kurvenverläufe jedoch wieder sehr gut mit denen von T98G überein (Abb. 5.4D und 5.5D).

Wie bereits unter Absatz 5.1.1 beschrieben waren in U87MG Konzentrationen von 75 und 100 μM ErPC nötig, um signifikante Level an Wachstumsstop und Apoptose zu erzeugen

(Abb. 5.2D). Daher wurden für die Kombinationsversuche mit Bestrahlung Konzentrationen an ErPC von 50, 75 und 100 μM eingesetzt. In Abbildung 5.6A sind die Veränderungen der Kernmorphologien von U87MG nach Behandlung mit 10 Gy, 75 μM ErPC und der Kombination abgebildet: Bestrahlung der Zellen mit 10 Gy erzeugte einen Wachstumsarrest sowie eine geringe Induktion von Apoptose, während die Stimulation mit 75 μM ErPC hohe Raten an Apoptose und Arrest auslösen konnte. Die kombinierte Behandlung aus IR und ErPC resultierte in einem weiteren Anstieg der Zelltodraten.

Ähnlich zu den für T98G und A172 erhaltenen Ergebnissen war die Effizienz der kombinierten Wirkung abhängig von der Strahlendosis sowie der eingesetzten ErPC-Konzentration und stand in direkter Relation zur Behandlungszeit (Abb. 5.6). In Übereinstimmung mit der geringeren Sensitivität von U87MG gegenüber ErPC allein waren auch in den kombinierten Behandlungsansätzen Konzentrationen von 100 μM ErPC nötig, um Zelltodraten von über 90% zu bewirken (Abb. 5.6B-D).

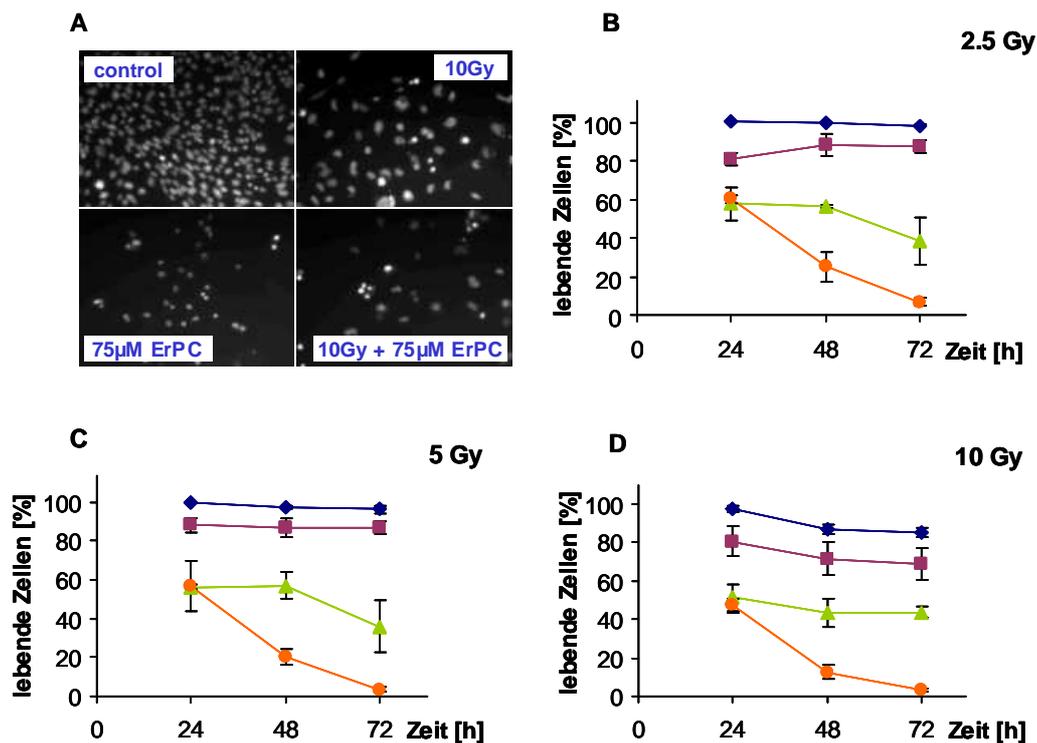


Abbildung 5.6 Erhöhte Zytotoxizität der IR durch ErPC in U87MG

Die Zellen wurden mit einer Dosis von 2.5, 5 oder 10 Gy bestrahlt und im Anschluss mit 50, 75 oder 100 μM ErPC behandelt. Die Induktion des Zelltods (Apoptose + Nekrose) wurde über Hoechst/PI-Färbung 24, 48 oder 72 h nach Behandlung im Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Der prozentuale Anteil lebender Zellen wurde gemäß Abbildung 5.2 ermittelt. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen (A) oder Mittelwerte mit Standardabweichung, $n=3$ (B, C und D).

[A] Kernmorphologie von U87MG 48h nach Behandlung mit Medium (control), 10 Gy, 75 μM ErPC oder kombinierter Behandlung aus IR und ErPC.

[B, C, D] Zeitverläufe sowie Abhängigkeit der Kombination von der ErPC-Dosis

- ◆ 0 μM ErPC
- 50 μM ErPC
- ▲ 75 μM ErPC
- 100 μM ErPC

Insgesamt fällt bei allen drei Zelllinien auf, dass bei Kombinationsbehandlung die höchste Dosis an ErPC bei der Verstärkung des strahleninduzierten Zelltods fast überall unabhängig von der Strahlendosis gleich effektiv wirkte. So wurde z.B. bei 50 μM ErPC und 2.5 Gy nach 72h im Prinzip derselbe Wert erreicht wie für 50 μM ErPC und 10 Gy (Abb. 5.4-6.6 B+D). Man muss dabei jedoch im Auge behalten, dass es sich hierbei um die Effekte des strahleninduzierten Zelltods innerhalb relativ kurzer Zeiträume (bis zu 72h) handelt. Erst im Langzeitversuch können evtl. auftretende weitere Differenzierungen der verschiedenen Dosen genauer untersucht werden.

Ebenso wie bei ErPC-Behandlung induzierte auch das Derivat ErPC3 in T98G Zellen Arrest und Zelltod (Abbildung 5.7 A). Auch in der Kombinationsbehandlung zeigte sich eine deutliche Wirkungssteigerung gegenüber Einzelbehandlungen aus Bestrahlung oder ErPC3 (Abbildung 5.7 A). Dabei war die Kombinationswirkung abhängig von der Strahlendosis und der Konzentration an ErPC3.

ErPC3 wirkt in der Kombinationswirkung insgesamt sogar noch etwas effizienter als ErPC, da z.B. unter 10 Gy und 12.5 μM ErPC3 nach 48 h bereits ebenso viel Zelltod erreicht wurde wie mit 10 Gy und 12.5 μM ErPC in T98G nach 72 h (Abb. 5.4.D und 5.7.B). Vergleichbares galt auch für andere Kombinationen mit ErPC3 nach 48 h versus ErPC nach 72 h.

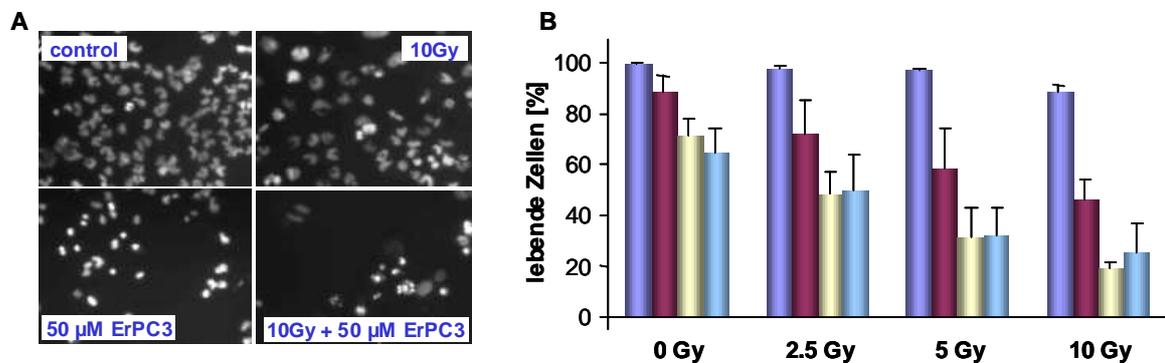


Abbildung 5.7 ErPC3 verstärkt den strahleninduzierten Zelltod in T98G

T98G wurden mit einer Einmaldosis von 2.5, 5 oder 10 Gy bestrahlt und im Anschluss mit 12.5, 25 oder 50 μM ErPC3 (wie dargestellt) behandelt. Die Induktion des Zelltods (Apoptose + Nekrose) wurde 48 h nach Behandlung im Fluoreszenzmikroskop durch Hoechst/PI-Färbung detektiert und der prozentuale Anteil lebender Zellen entsprechend Abbildung 5.2 ermittelt.

[A] Fotografie der Kernmorphologie von T98G nach Behandlung mit Medium (control), 10 Gy, 50 μM ErPC oder kombinierter Behandlung aus IR und ErPC3 (repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen)

[B] Dosisabhängigkeit der Kombination von IR-Dosis und ErPC3-Konzentration (Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen)

Interessanterweise scheint mit 25 μM ErPC3 in der Kombinationsbehandlung mit IR bereits ein Maximum an Effizienz erreicht, zumindest hinsichtlich des strahleninduzierten Zelltods im kurzfristigen Bereich innerhalb 48 h (Abb. 5.7B). Während mit 50 μM ErPC3 allein noch ein

Benefit gegenüber 25 μM ErPC3 allein erzielt wurde, konnte in der Kombination mit Bestrahlung kein weiterer Unterschied mehr beobachtet werden.

A		T98G		B		A172	
Zeit	IR [Gy]	ErPC [μM]	Effekt	Zeit	IR [Gy]	ErPC [μM]	Effekt
24h	2.5	12.5	additiv	24h	2.5	12.5	< additiv
	2.5	25			5	50	
	2.5	50	synergistisch		2.5	50	additiv
	5	12.5			2.5	12.5	
	5	25			5	25	
	5	50			10	12.5	
	10	12.5			10	25	
10	25	10	50				
48h	2.5	12.5	synergistisch	48h	2.5	12.5	synergistisch
	2.5	25			2.5	25	
	2.5	50			2.5	50	
	5	12.5			5	12.5	
	5	25			5	25	
	5	50			10	25	
	10	12.5			10	50	
72h	2.5	12.5	< additiv	72h	5	25	< additiv
	2.5	25			2.5	50	
	2.5	50	synergistisch		5	50	additiv
	5	12.5			10	12.5	
	5	25			10	25	
	5	50			10	50	
	10	12.5			2.5	12.5	
10	25	2.5	25				
10	50	5	12.5				

C		U87MG		D		T98G	
Zeit	IR [Gy]	ErPC [μM]	Effekt	Zeit	IR [Gy]	ErPC [μM]	Effekt
24h	2.5	100	< additiv	48h	2.5	50	additiv
	5	50			10	50	
	5	100	synergistisch		2.5	12.5	
	10	100			2.5	25	
	10	50			5	12.5	
48h	2.5	50	< additiv	5	25	synergistisch	
	5	50		5	50		
	10	50		10	12.5		
	2.5	75	additiv	5	25		
	2.5	100		5	50		
	5	75		10	12.5		
	5	100		10	25		
72h	2.5	50	< additiv	72h	2.5	75	additiv
	5	50			2.5	100	
	10	50			5	75	
	10	75	additiv		5	100	
	2.5	75			5	100	
	2.5	100			10	100	
	5	75			10	100	

Abbildung 5.8
Ergebnisse der aus den Hoechst/PI-Experimenten erstellten Isobologramm-Analysen nach allen Kombinationsbehandlungen in den Zelllinien T98G, A172 und U87MG

5.1.4 Isobologramm-Analysen zur Beurteilung der Effizienz kombinierter Behandlungsansätze

Um festzustellen, inwieweit die Interaktionen zwischen Bestrahlung und ErPC bzw. ErPC3 in humanen Gliomzellen sub-additiv, additiv oder sogar synergistisch sind, wurden Isobologramm-Analysen (Berenbaum, 1978) durchgeführt. Bei dieser biomathematischen Evaluation werden ausgehend von den gemessenen Werten für die Einzelbehandlungen Daten für die kombinierte Behandlung extrapoliert. Die auf diese Weise erhaltenen Daten definieren einen geometrischen Bereich, den „envelope of additivity“. Liegen nun die tatsächlich erhaltenen Werte aus der Kombinationsbehandlung unterhalb dieses „envelope of additivity“ kann man von Synergismus sprechen, befinden sie sich innerhalb liegt Additivität vor. Wenn die erhaltenen Ergebnisse oberhalb des „Envelope of additivity“ liegen, muss man von weniger als additiven Effekten ausgehen.

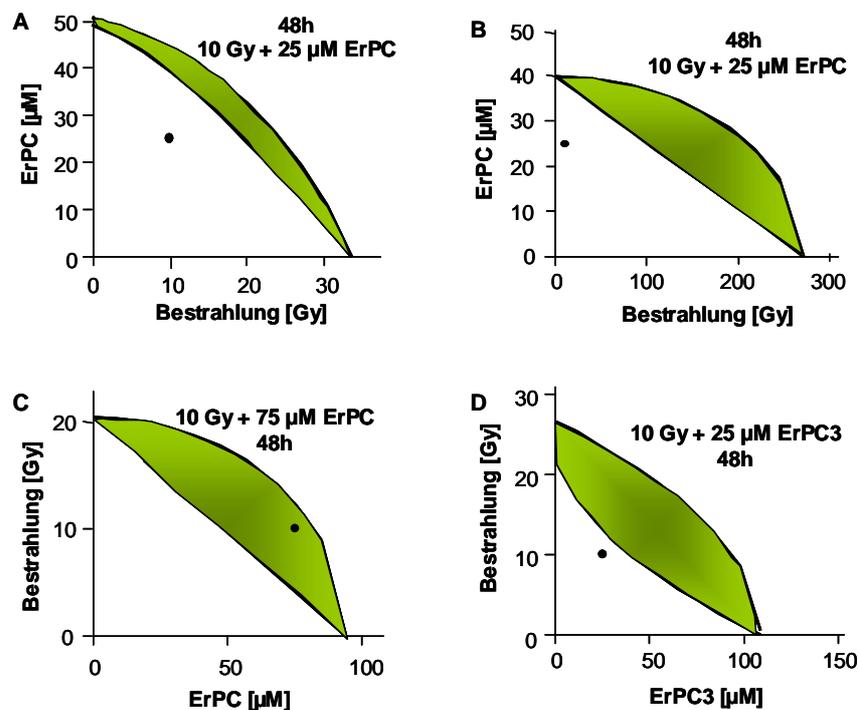


Abbildung 5.9 Ausgewählte Isobologramm-Analysen humaner maligner Gliomzellen nach Kombinationsbehandlung aus IR und ErPC bzw. IR und ErPC3

Die biomathematische Evaluation potentieller additiver oder synergistischer Effekte der Kombinationsbehandlung erfolgte über Isobologramm-Analysen (Berenbaum, 1978). Die zugrunde liegenden Daten der Zelltodinduktion wurden aus Hoechst/PI-Experimenten durch Analyse der Kernmorphologie im Fluoreszenzmikroskop gewonnen. Dabei wurden die Zellen mit drei verschiedenen Dosen bestrahlt, mit drei unterschiedlichen Konzentrationen an ErPC bzw. ErPC3 stimuliert und allen Kombinationsbehandlungen unterzogen. Die Abbildungen zeigen repräsentative Daten für T98G (A und D), A172 (B) sowie U87MG (C) mit den angezeigten Behandlungen.

Erscheint der schwarze Punkt der jeweiligen Behandlung innerhalb des grünen „envelope of additivity“ spricht man von additiven Effekten, liegt er unterhalb, handelt es sich um einen Synergismus. Würde der Punkt oberhalb dieser grünen Fläche liegen, dann wäre die Effizienz der kombinierten Behandlung weniger als additiv.

Generell war die Sensitivität der malignen Gliomzelllinien gegenüber der Kombinationsbehandlung abhängig von der Strahlendosis, der ErPC- bzw. ErPC3-Konzentration sowie der Behandlungsdauer. Die Ergebnisse aller Analysen für jede Kombinationsbehandlung sind in der Tabelle der Abbildung 5.8 zusammengefasst und repräsentative Einzel-Analysen für die Kombinationsbehandlungen sind in der Abbildung 5.9 dargestellt. Insgesamt waren T98G am sensitivsten hinsichtlich der kombinierten Behandlungsansätze mit beinahe ausschließlich synergistischen Kurzzeiteffekten 24, 48 und 72 h nach Behandlung (Abbildungen 5.8 A+D und 5.9 A+D). In A172 konnten nach 24 h und 72 h sub-additive bis synergistische Effekte je nach eingesetzter Kombination beobachtet werden, nach 48 h traten ausschließlich Synergismen auf (Abbildungen 5.8 B und 5.9 B). Mit sub-additiven bis additiven Effekten nach 48 h und 72 h sowie weniger als additiver bis synergistischer Wirkung nach 24 h zeigten U87MG insgesamt etwas geringeres Ansprechen auf die Kombination im Vergleich zu T98G und A172 (Abbildungen 5.8 C und 5.9 C).

5.1.5 Die Kombinationswirkung aus IR und ErPC bzw. IR und ErPC3 im Koloniebildungstest (Kobi)

Bisher konnte gezeigt werden, dass ErPC und ErPC3 den strahleninduzierten Zelltod verstärken. Mit dem Koloniebildungstest steht nun ein Langzeit-Assay zur Verfügung anhand dessen man die zytotoxische Effizienz von ErPC, ErPC3 bzw. der Kombinationsbehandlungen mit Bestrahlung auf klinisch relevanter Basis überprüfen kann. Dazu werden die Zellen vereinzelt ausgesät und nach ihrem Anwachsen auf der Platte oder Flasche erfolgt die jeweilige Behandlung. Anschließend wird beobachtet, wie viele der einzelnen Zellen zu Kolonien aus mind. 50 Zellen heranwachsen und die Anzahl der Kolonien pro Behandlung bestimmt. Diese setzt man in Relation mit der Anzahl an Kolonien auf der unbehandelten Platte/Flasche. Wie Abbildung 5.10 A+B verdeutlicht, konnte ErPC allein das klonogene Überleben von T98G ab Konzentrationen von 16 μM reduzieren, ErPC3 ab Konzentrationen von 12.5 μM . ErPC3 ist auch insgesamt etwas potenter in der Zerstörung klonogener Tumorzellen: Wo 16 μM ErPC3 ausreichen, um 90 % aller klonogenen Zellen auszulöschen, werden 20 μM ErPC benötigt (Abbildung 5.10 A+B).

Obwohl sich die T98G Zellen in den vorangegangenen Zelltod-Untersuchungen resistent gegenüber strahleninduzierter Apoptose zeigten, konnte die Bestrahlung im Langzeitversuch das klonogene Überleben der Zellen sehr deutlich und in Abhängigkeit von der eingesetzten Strahlendosis reduzieren (Abbildung 5.10 C+D).

Die Kombination aus Bestrahlung mit ErPC bzw. ErPC3 führte zu einem weiteren deutlichen Abfall des klonogenen Überlebens in Abhängigkeit von der eingesetzten ErPC bzw. ErPC3-Dosis (Abbildung 5.10 C+D). Auch in der Kombination mit IR war ErPC3 wieder etwas effizienter als ErPC: So löschte die Kombination aus 10 Gy und 16 μM ErPC3 fast ebenso viele Zellen aus wie 10 Gy mit 25 μM ErPC. Eine Kombination aus 10 Gy mit 20 μM oder 25 μM ErPC3 konnte nicht ausgewertet werden, da sie so effektiv war, dass keine einzige Kolonie mehr übrig blieb.

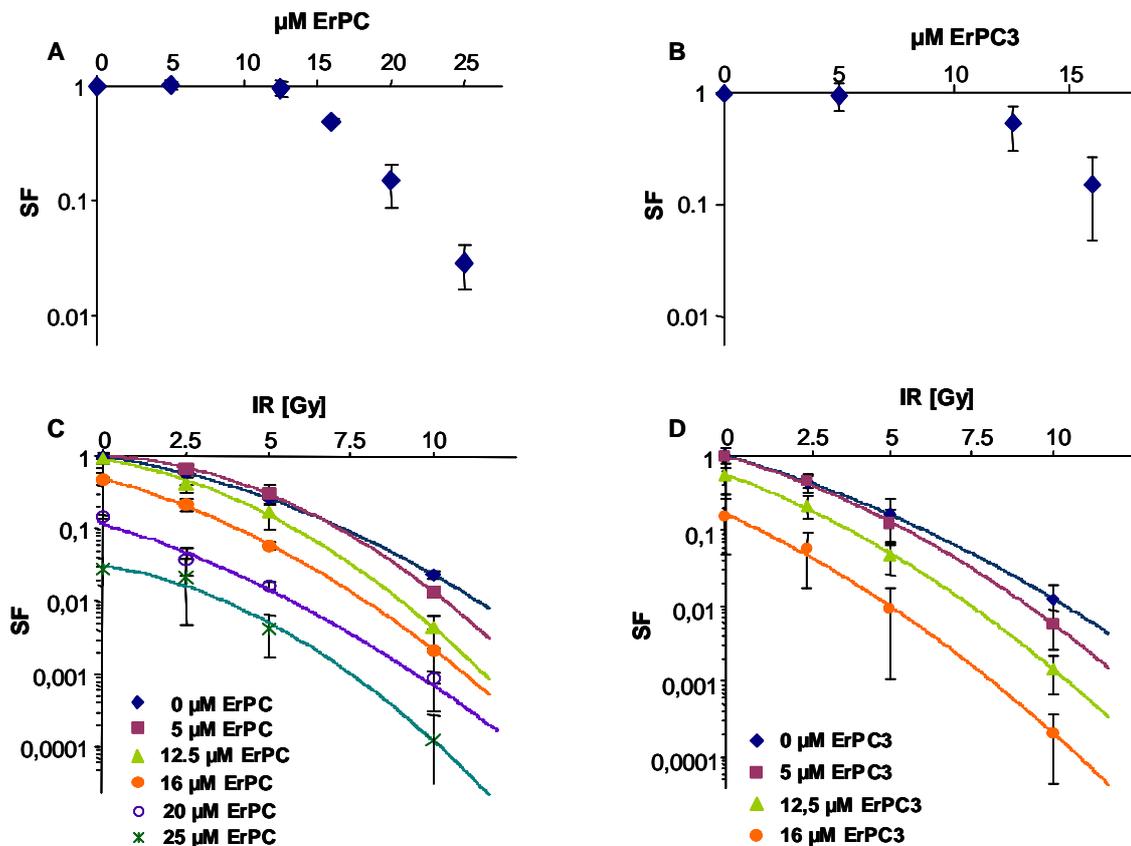


Abbildung 5.10 Koloniebildungstests in T98G nach ErPC, ErPC3 und den Kombinationsbehandlungen

24h nach der Aussaat wurden die Zellen bestrahlt, mit ErPC bzw. ErPC3 stimuliert oder der kombinierten Behandlung unterzogen. Anschließend wurden die Zellen unter Standardbedingungen je nach Wachstumsverhalten bis zu 4 Wochen kultiviert. Wenn die einzelnen Zellkolonien eine ausreichende Größe erreicht hatten, wurden die Zellen fixiert und mit Coomassie angefärbt. Kolonien, die aus mind. 50 Zellen bestanden wurden gezählt.

(A) Ergebnisse des Kobis nach ErPC-Behandlung

(B) Daten des Kobis nach ErPC3-Behandlung

(C) Darstellung der Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen mit ErPC

(D) Grafische Auswertung der Kombinationsbehandlungen mit ErPC3

Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.

Insgesamt bestätigte sich also auch im klinisch relevanten Langzeitversuch das gute Ergebnis der Kombinationswirkung aus den vorangegangenen Hoechst/PI-Untersuchungen:

Das Banding der Kurven für die einzelnen Kombinationen mit ErPC bzw. ErPC3 spricht für mindestens additive Effekte der Kombinationen.

5.1.6. Normalgewebstoxizität von ErPC und ErPC3

In den vorausgegangenen Kurz- und Langzeitversuchen zur zytotoxischen Wirkung von ErPC und ErPC3 allein und in Kombination mit Bestrahlung zeigten beide Substanzen sehr gute Effizienz in den verschiedenen Gliomzelllinien. Allerdings wurde eine mögliche Normalgewebstoxizität der Substanzen bisher nicht in die Untersuchungen einbezogen. Um herauszufinden, wie die Auswirkungen von ErPC bzw. ErPC3 auf Normalgewebe sind, wurden normale humane Astrozyten (NHA) jeweils mit 25 μM ErPC bzw. ErPC3 behandelt (Abbildung 5.11 A und B) und auftretende Schädigungen der Zellen anschließend über Hoechst/PI-Färbung im Fluoreszenzmikroskop begutachtet.

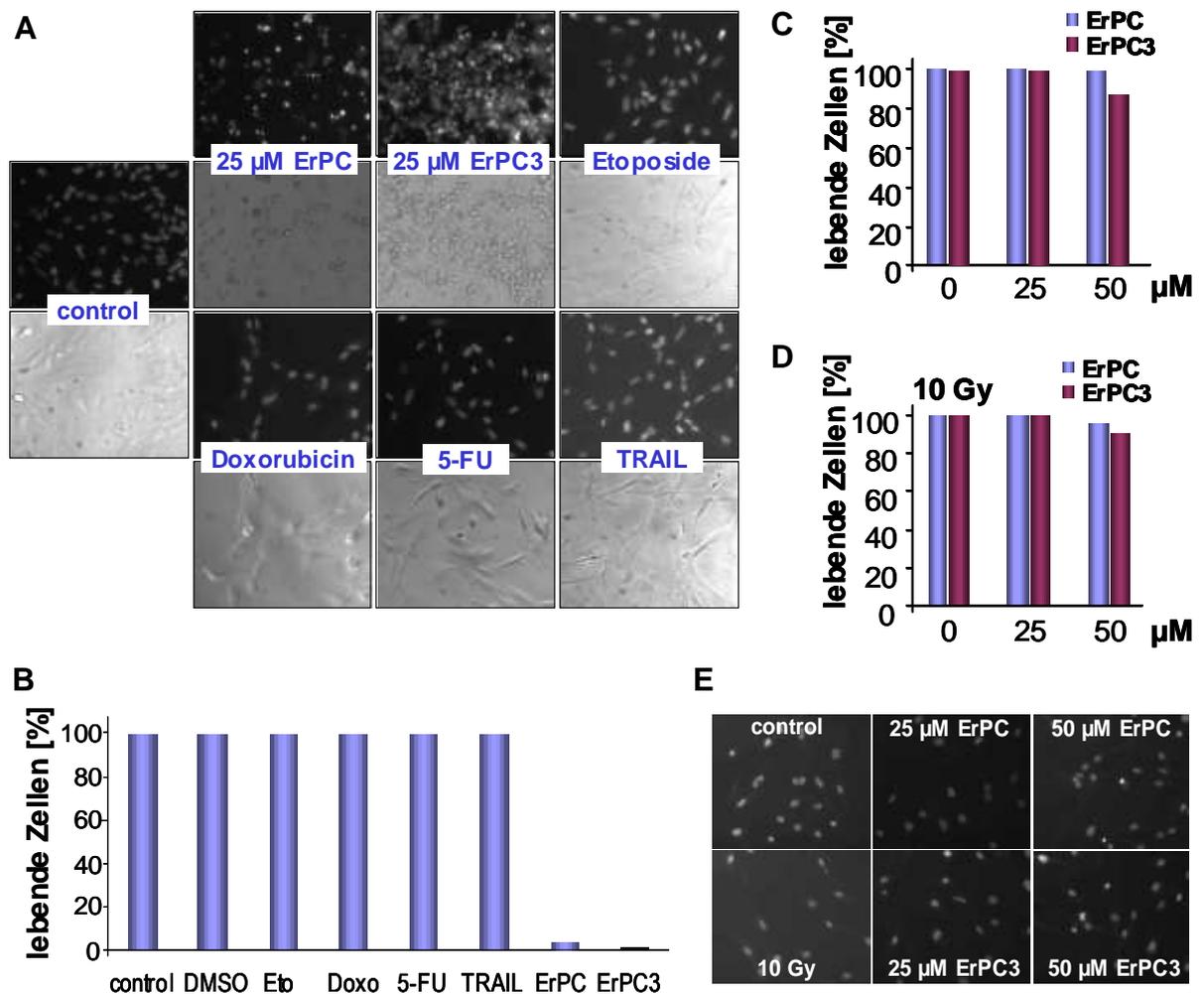


Abbildung 5.11 Normalgewebstoxizität von ErPC und ErPC3

Zur Feststellung der Normalgewebstoxizität von ErPC und ErPC3 wurden NHA Zellen (normale humane Astrozyten) für 24 h mit 25 μM ErPC bzw. ErPC3 behandelt. Um Vergleichswerte zu erhalten wurden die NHA mit verschiedenen anderen Chemotherapeutika für 24 h wie angezeigt behandelt. Als weiteres Normalgewebe wurden humane Fibroblasten HSF-7 mit 25 oder 50 μM ErPC bzw. ErPC3 allein sowie in Kombination mit 10 Gy behandelt. Die Zelltoxizität wurde über Hoechst/PI-Färbung im Fluoreszenzmikroskop ermittelt. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse aus mehreren Versuchen 24 h nach Behandlung.

- (A) Immunfluoreszenz- und Durchlichtmikroskopie der einzelnen Behandlungen in NHA
- (B) Lebende NHA Zellen nach 3 $\mu\text{g/ml}$ Etoposid, 5 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin, 10 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU, 100 ng/ml TRAIL sowie 25 μM ErPC bzw. ErPC3
- (C) Lebende HSF-7 Fibroblasten nach 0, 25 oder 50 μM ErPC bzw. ErPC3
- (D) Lebende HSF-7 Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy bzw. Kombinationsbehandlung aus 10 Gy mit 25 μM ErPC oder ErPC3
- (E) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der HSF-7 Fibroblasten nach Behandlung mit 10 Gy sowie 25 oder 50 μM ErPC bzw. ErPC3

Leider wirkten unter den gegebenen *in vitro* Bedingungen beide Substanzen äußerst zytotoxisch auf die Zellen und lösten Apoptose aus. Um auszuschließen, dass es sich um einen generellen, von den Substanzen unabhängigen Effekt handelt, da die NHA auf *in vitro*-Kultivierung empfindlich reagieren können, wurden die Zellen außerdem mit weiteren Chemotherapeutika behandelt. Nach Gabe von 3 $\mu\text{g/ml}$ Etoposid, 5 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin, 10 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU sowie 100 ng/ml TRAIL konnte jedoch keine Apoptose detektiert werden (Abbildung 5.11B). Als zweites Normalgewebe wurde außerdem die aus humanen Hautfibroblasten bestehende Zelllinie HSF-7 für Untersuchungen herangezogen. Hier traten im Gegensatz zu den NHA kaum Schädigungen auf und erst ab Konzentrationen von 50 μM ErPC3 waren wenige Apoptosen nachweisbar, deren Anteil sich auch durch Kombination mit Bestrahlung nur unwesentlich erhöhte (Abbildung 5.11 C+E).

5.2 Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Kombinationsbehandlung im Glioblastommodell

5.2.1 Genauere Differenzierung des Zelltods nach kombinierter Behandlung mit IR und ErPC/ErPC3

In der Absicht die Bedeutung der Apoptose für die additiv bis synergistische Zelltod-induktion nach kombinierter Behandlung detaillierter zu untersuchen, wurde zunächst der vorliegende Zelltodmechanismus hinterfragt. Wie in Abbildung 5.12 A für die einzelnen Kombinationen mit 10 Gy verdeutlicht, war ErPC3 in der Kombinationswirkung noch um einiges potenter als ErPC. So stieg die Kurve des Gesamtzelltods für ErPC3 in der

Kombination mit 10 Gy bis 25 μM steil an und erreichte dann einen Sättigungswert. Die Kurve für ErPC hingegen wuchs etwas flacher aber dafür stetig bis 50 μM und erreichte dann denselben Wert wie die Kurve für ErC3 (Abbildung 5.12A). Differenzierte man nun die beiden Gesamtzelltodkurven hinsichtlich Apoptose und Nekrose, was durch die Kernmorphologie im Fluoreszenzmikroskop möglich war, ergab sich folgendes Bild: Bei ErPC bestand der überwiegende Anteil des Zelltods bis zu Kombinationen mit 25 μM ErPC aus Apoptose, bei höheren Konzentrationen kam ein Überschuss an nekrotischen Zellen ins Spiel (Abbildung 5.12B). Bei ErPC3 jedoch konnte von Anfang an ein deutliches Übermaß apoptotischer Zellen beobachtet werden und selbst bei der Kombination aus 50 μM ErPC mit 10Gy war noch ein Gleichgewicht an Apoptose und Nekrose gegeben (Abbildung 5.12C). Interessanterweise induzierten beide Substanzen bei 12.5 und 25 μM gleiche Mengen an Nekrose, während ErPC3 die strahleninduzierte Apoptose im Vergleich zu ErPC deutlich effizienter steigerte. Somit lag bei ErPC3 in der Kombination mit Bestrahlung das für eine klinische Weiterentwicklung günstigere Verhältnis aus Apoptose und Nekrose vor, da ein zu hoher Anteil nekrotischer Zellen zu unerwünschten Immunreaktionen führt.

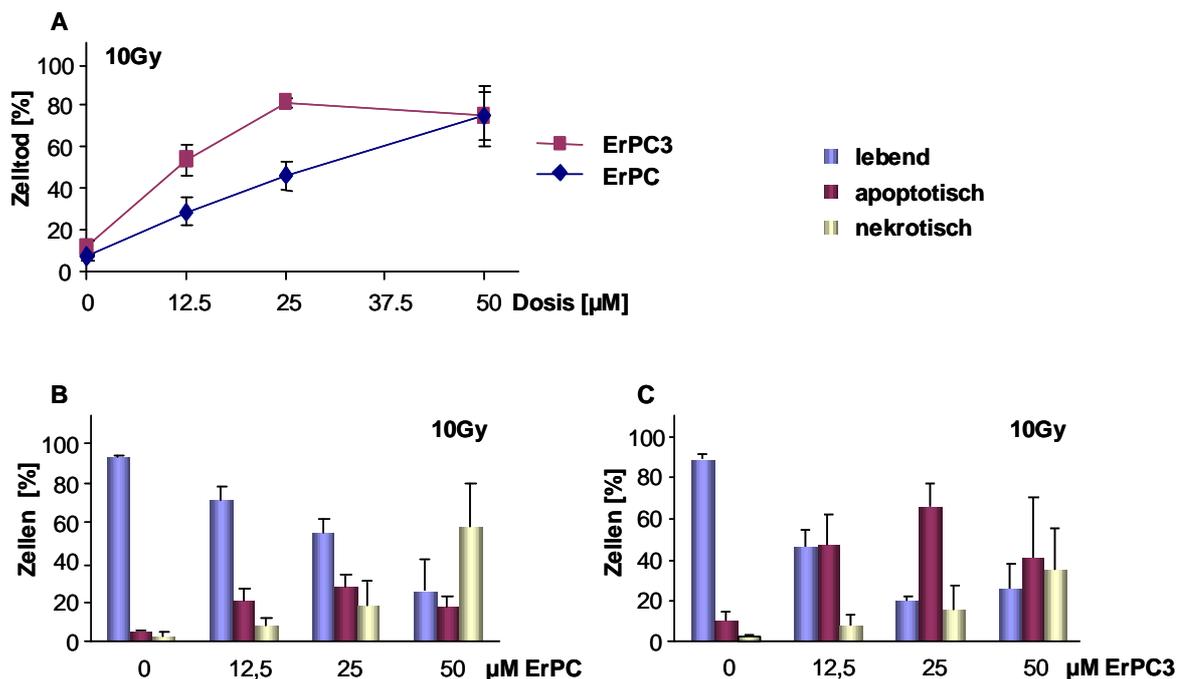


Abbildung 5.12 Zelltod nach 10 Gy in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen an ErPC/ErPC3

Die Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit 12.5, 25 oder 50 μM ErPC bzw. ErPC3 stimuliert. 48 h nach Behandlung wurden die Zellkerne mit Hoechst/PI gefärbt und die Zellen anhand ihrer Kernmorphologie im Fluoreszenzmikroskop typisiert.

- (A) Dosisabhängiger Anstieg des Zelltods nach Kombinationsbehandlung (10 Gy + ErPC/ErPC3)
 (B) Differenzierung des dosis-abhängigen Zelltods nach 10 Gy mit ErPC in Apoptose und Nekrose
 (C) Differenzierung des dosis-abhängigen Zelltods in Apoptose und Nekrose nach 10 Gy + ErPC3
 Die Daten zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit entsprechender Standardabweichung.

5.2.2 Caspasen-Aktivierung und PARP-Spaltung nach IR und ErPC

Da der Hauptanteil des Zelltods nach der kombinierten Behandlung mit Bestrahlung und ErPC bzw. ErPC3 aus Apoptose bestand, sollte die Bedeutung der Apoptose für die Kombinationsbehandlung anhand weiterer Untersuchungen hervorgehoben werden. Als Hauptexekutoren des apoptotischen Zelltods gelten spezielle Proteasen, die Caspasen (Riedl and Shi, 2004). Western Blot-Analysen sollten daher klären, ob die Effektor-Caspasen nach kombinierter Behandlung aus IR und ErPC entsprechend vermehrt aktiviert werden und ihr Substrat PARP, ein nukleäres Protein, das an der DNA-Reparatur beteiligt ist, vergleichbar gespalten wird. Wegen der ansteigenden Level an Nekrose ab Konzentrationen von 50 μM ErPC wurden für die folgenden Versuche zur Aufklärung des Wirkmechanismus nur Konzentrationen bis 25 μM eingesetzt. Wie in Abbildung 5.13 A verdeutlicht führte die

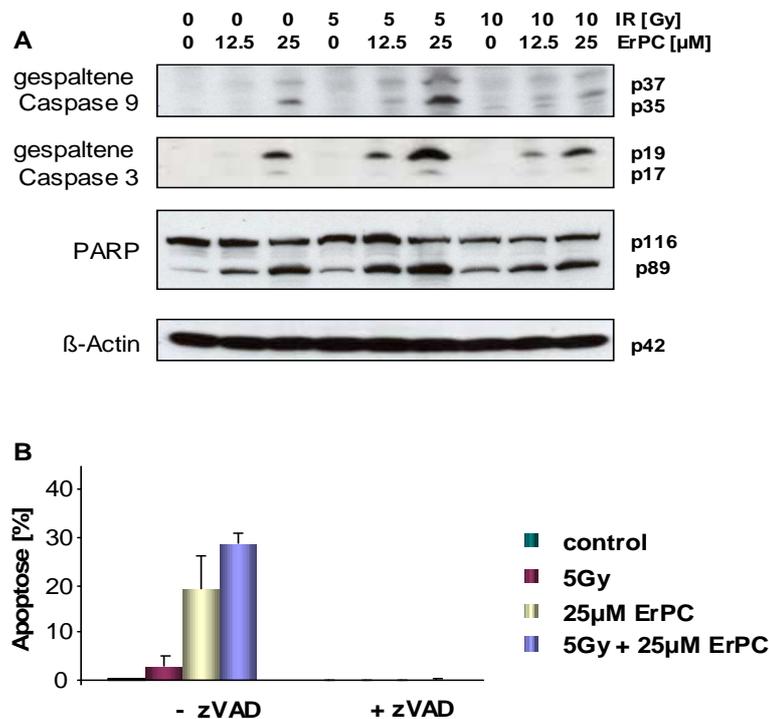


Abbildung 5.13 Caspasen-Aktivierung und PARP-Spaltung nach Kombinationsbehandlung mit IR und ErPC

T98G Zellen wurden mit 0, 5 oder 10 Gy bestrahlt und im Anschluss mit 0, 12.5, 25 oder 50 μM ErPC behandelt.

(A) 24 h nach Behandlung wurden die Zellen lysiert und die Caspase-Aktivierung im Western Blot überprüft. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment.

(B) Inhibierung der Caspase-Aktivierung durch zVAD verhindert die Apoptose-Induktion nach IR, ErPC und kombinierter Behandlung aus beiden Stimuli. (T98G wurden dabei vorbehandelt mit Medium oder 20 μM zVAD-fmk und 30 min später bestrahlt, mit ErPC stimuliert oder der kombinierten Behandlung unterzogen.) Die Apoptoseraten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Bestrahlung mit 5 oder 10 Gy zu keiner nennenswerten Aktivierung der Caspasen: weder erfolgte eine Spaltung der Caspasen noch zeigte sich eine deutliche Spaltung des Caspase-3-Substrates PARP. Im Gegensatz dazu triggerte Stimulation mit ErPC sowohl die Aktivierung der Caspasen 3 und 9 als auch PARP-Spaltung (Abbildung 5.13 A). Unter Kombinationsbehandlung wurden diese Effekte weiter verstärkt mit einer besonders deutlichen Ausprägung bei 5 Gy mit 25 μ M ErPC. Bei 10 Gy mit 25 μ M ErPC sind Caspasen-Aktivierung und PARP-Spaltung vergleichsweise etwas rückläufig, was wahrscheinlich daran liegt, dass das Maximum der pro-apoptotischen Wirkung dieser Kombination bereits zu einem früheren Zeitpunkt stattgefunden hat.

Um nun die funktionelle Relevanz der Caspasen-Aktivierung für die erhöhte Apoptose-Induktion unter kombinierter Behandlung zu evaluieren, wurde untersucht, wie sich eine Vorbehandlung der Zellen mit dem Pan-Caspasen-Inhibitor zVAD-fmk auf die Apoptoseraten der Behandlungen auswirkt. Während 25 μ M ErPC allein oder die Kombination mit 5 Gy nach 48 h effizient Apoptose auslösen konnte, war diese jedoch nach Vorbehandlung der Zellen mit zVAD-fmk vollständig geblockt (Abbildung 5.13 B). Dies zeigt, dass die Aktivierung von Caspasen essentiell für die zytotoxische Wirkung der von ErPC bzw. der Kombinationsbehandlung ist.

5.2.3 Rolle des Mitochondriums für die erhöhte Effizienz der Kombination

Frühere Untersuchungen bezüglich der Wirkung von ErPC in Jurkat Lymphomzellen hatten ergeben, dass ErPC einen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials inklusive Cytochrom c-Freisetzung herbeiführt (Jendrossek et al., 2003). Um die Bedeutung des Mitochondriums für die Kombinationswirkung aus IR und ErPC in den Glioblastomzellen T98G zu durchleuchten wurde der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nach kombinierter Behandlung im FACS gemessen. Dabei erhöhte ErPC den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der Dosis (Abbildung 5.14 A,B). Diese Ergebnisse deuten auf ein Zusammenwirken beider Substanzen auf dem Level des Mitochondriums hin. Man könnte daher die Hypothese aufstellen, dass beide Apoptosewege der Einzelbehandlungen auf der Ebene des Mitochondriums oder sogar oberhalb des Mitochondriums zusammenlaufen und so den Apoptosemechanismus verstärken.

Mittlerweile ist weitreichend akzeptiert, dass pro- und anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie wichtige Regulatoren des mitochondrialen Zelltods darstellen (Leber et al., 2007; van Delft and Huang, 2006). Dabei könnte eine verminderte Expression anti-

apoptotischer Proteine wie z.B. Bcl-2 und Bcl-x_L sowie eine verstärkte Expression pro-apoptotischer Proteine (z.B. Bax, Bak) von Bedeutung sein. Abgesehen von Änderungen im Verhältnis pro- und anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine zueinander kann auch vermehrte Aktivierung von pro-apoptischem Bax zu erhöhtem mitochondrialen Schaden führen (Dejean et al., 2005). Dabei durchläuft das im Zytoplasma zurückgehaltene Bax eine Konformationsänderung mit anschließender Translokation zum Mitochondrium und Insertion

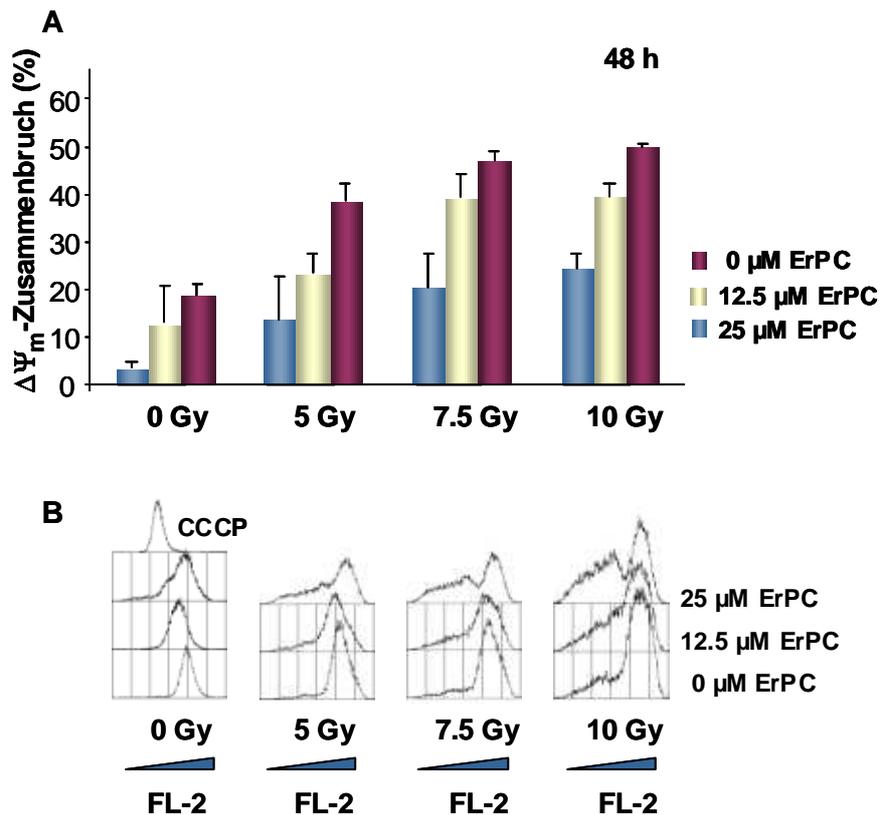


Abbildung 5.14 Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nach Kombinationsbehandlung mit IR und ErPC

T98G wurden mit 0, 5, 7.5 oder 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit 0, 12.5 oder 25 μM ErPC stimuliert. Der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials wurde 48 h nach Behandlung im FACS über TMRE-Färbung bestimmt.

(A) Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen

(B) Originalhistogramme einer repräsentativen Messung

in die äußere Mitochondrienmembran. Um zu analysieren, ob die unter kombinierter Behandlung vermehrt auftretenden mitochondrialen Schäden auf eine erhöhte Aktivierung von Bax durch effizientere Konformationsänderung zurückzuführen sind, wurden FACS-Analysen mit einem Bax-aktivierungsspezifischen Antikörper durchgeführt. Während Bestrahlung keine signifikante Aktivierung von Bax im Vergleich zu unbehandelten Zellen induzieren konnte, erhöhte Stimulation mit ErPC die durch Konformationsänderung bedingte Aktivierung von Bax deutlich (Abbildung 5.15). Bedeutenderweise konnte die Kombination

aus ErPC und Bestrahlung einen weiteren Anstieg der Bax-Aktivierung bewirken, was wiederum auf die Gewichtung des mitochondrialen Zelltodwegs für die kombinierte Behandlung hinweist.

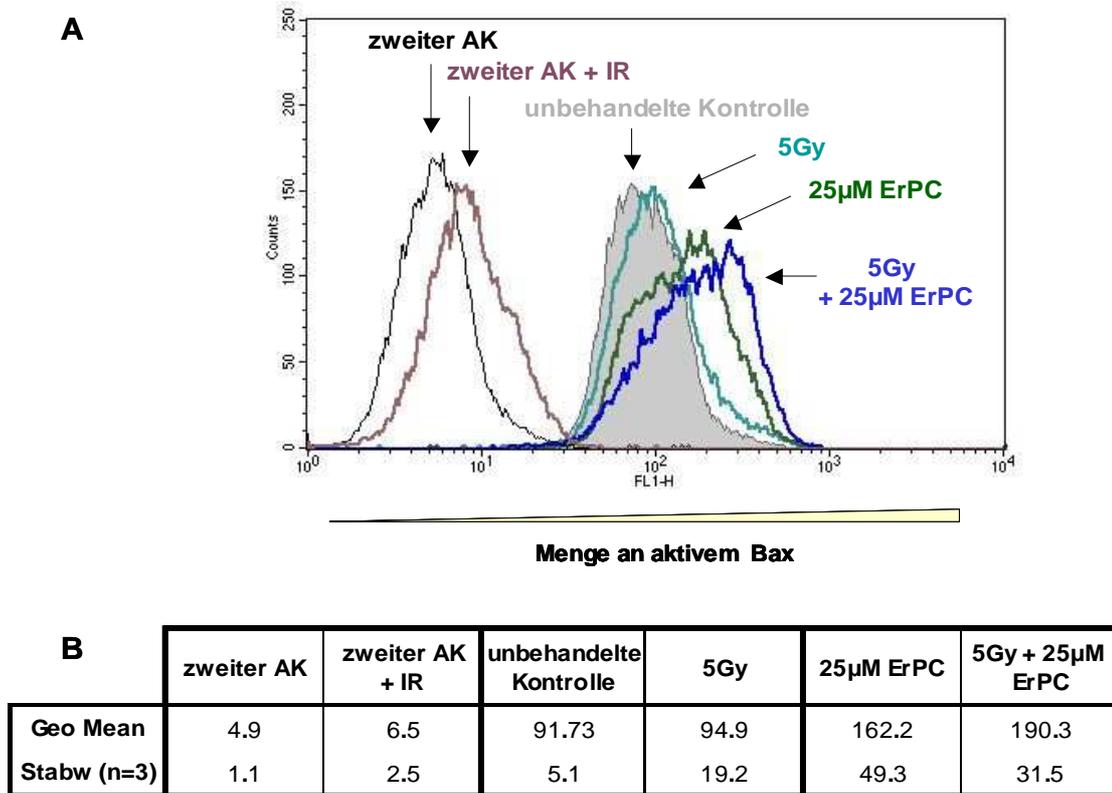
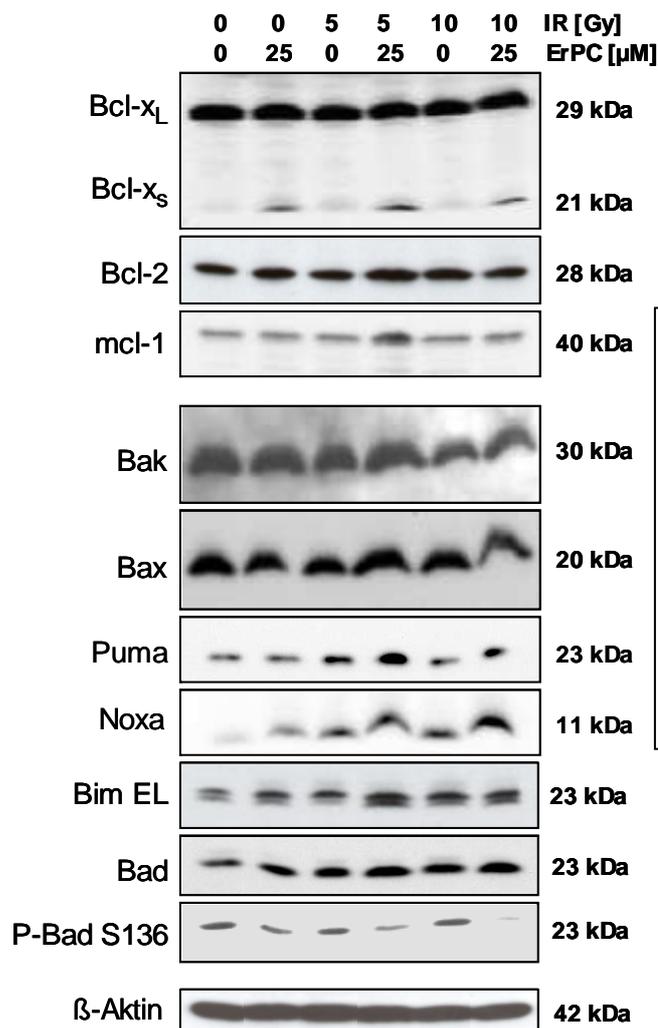


Abbildung 5.15 Bax-Aktivierung durch Konformationsänderung
 T98G wurden mit 5 Gy bestrahlt, 25 µM ErPC stimuliert oder der kombinierten Behandlung unterzogen. Die Bax-Aktivierung durch Konformationsänderung wurde 48 h nach Behandlung im FACS mittels eines aktivierungsspezifischen Antikörpers bestimmt.
(A) Originalhistogramme einer repräsentativen Messung
(B) Geo Mean-Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen

Um herauszufinden, inwieweit Veränderungen im Expressionsgleichgewicht pro- und anti-apoptotischer Proteine bei der kombinierten Wirkung aus IR und ErPC eine Rolle spielen, wurden 48h nach Bestrahlung, Stimulation mit ErPC oder kombinierter Behandlung Western Blot Analysen durchgeführt. Allerdings wurden keine signifikanten Änderungen in den Expressionsleveln der anti-apoptotischen Proteine Bcl-x_L, Bcl-2 und Mcl-1 festgestellt (Abbildung 5.16). Interessanterweise konnte jedoch ein Anstieg von Bcl-x_S in allen Lysaten nach Behandlung mit ErPC oder der Kombination mit IR beobachtet werden. Bcl-x_S ist eine Spleißvariante von Bcl-x_L, die in pro-apoptotischen Zusammenhang gebracht wird (Boise et al., 1993; Ealovega et al., 1996). Bisher liegen jedoch noch keine Daten funktioneller Relevanz für Bcl-x_S bezüglich ErPC-induzierter Apoptose in Gliomzellen vor. In den pro-apoptotischen Proteinen Bax, Bak oder Bad wurde keine Veränderung im Expressionsstatus

**Abbildung 5.16**

Änderungen verschiedener pro- sowie anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine nach IR, ErPC und kombinierter Behandlung

T98G wurden mit 0, 5 oder 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit 0 oder 25 μ M ErPC stimuliert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und der Status verschiedener pro- und anti-apoptotischer Proteine wurde im Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle wurde der Level an β -Aktin bestimmt.

Die Daten zeigen repräsentative Blots.

nach kombinierter Behandlung mit IR und ErPC detektiert (Abbildung 5.16). Allerdings konnte eine leichte Zunahme sowie deutliche Dephosphorylierung von P-Bad an Serin 136 nach Stimulation mit ErPC bzw. kombinierter Behandlung beobachtet werden. Da Dephosphorylierung von P-Bad zur Aktivierung des Proteins führt, könnte sie essentiell für die proapoptotische Wirkung von ErPC und der Kombinationsbehandlung sein. Zusätzlich dazu nahmen nach Bestrahlung sowie kombinierter Behandlung die Expressionsraten an proapoptotischem Puma sowie nach ErPC, IR und verstärkt in der Kombinationstherapie die Level an proapoptotischem Noxa zu (Abbildung 5.16).

5.2.4 Mögliche Regulatoren oberhalb des Mitochondriums

Nachdem alle Daten direkt auf eine Bedeutung des mitochondrialen Zelltodwegs für die kombinierte Behandlung hinwiesen, stellte sich die Frage, welche Proteine oberhalb des Mitochondriums regulierend ins Geschehen eingreifen könnten.

Maligne Gliomzellen sind nicht nur durch teils defekte Apoptosesignalwege gekennzeichnet, sondern auch durch Hochregulation der Aktivität des Überlebenssignalproteins PKB/Akt. Daher wurde der Expressionsstatus von PKB/Akt in den Gliomzelllinien T98G und A172 untersucht. Um außerdem herauszufinden, ob ErPC bzw. ErPC3 inhibierende Effekte auf das PKB/Akt-vermittelte Überlebenssignaling ausüben, was ursächlich für eine verbesserte pro-apoptotische Wirkung der kombinierten Behandlung sein könnte, wurde der Phosphorylierungs- und damit Aktivitätsstatus von Akt nach IR, ErPC bzw. kombinierter Behandlung im Western Blot analysiert.

Unbehandelte T98G und A172 Zellen exprimierten hohe Level an aktivem PKB/Akt, wie durch die starken Phosphorylierungsraten an Serin 473 (S473) und Threonin 308 (T308) angezeigt (Abbildung 5.17A). Während Bestrahlung keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von PKB/Akt hatte, führte Behandlung mit ErPC allein bereits nach 3 h zu einer massiven Dephosphorylierung von P-PKB/Akt an T308 und nach 6 h zu einer Abnahme von P-Akt S473, die sich im Zeitverlauf weiter verstärkte (Abbildung 5.17B). Kombinierte Behandlung führte ebenfalls zu einer massiven Abnahme beider Phosphorylierungsformen ab 3 h nach Behandlung, die sich mit der Zeit bis 24 h weiter intensivierte und für die Phosphorylierungsstelle an S473 auch deutlich ausgeprägter war als bei Einzelbehandlung (Abbildung 5.17B). Aktives PKB/Akt kann die Apoptosesignalwege an unterschiedlichen Ebenen über Phosphorylierung apoptoserelevanter Targetproteine negativ beeinflussen. Zum einen kann es direkt das proapoptotische Bad durch Phosphorylierung inaktivieren (Datta et al., 1997). Eine Hemmung von PKB/Akt durch Dephosphorylierung könnte daher zu einer verminderten Phosphorylierung von Bad und somit zu dessen Aktivierung führen. Die einer steigenden Dephosphorylierung von PKB/Akt im Dosisverlauf (Abbildung 5.17C) entsprechende verminderte Phosphorylierung von Bad konnte bereits beobachtet werden (vgl. Abbildung 5.15). Ein weiteres Zielprotein von Akt im Apoptosesignaling stellt der Transkriptionsfaktor FKHR dar. Er liegt in seiner durch Akt phosphorylierten Form inaktiv im Zytoplasma vor. Durch Dephosphorylierung gelangt FKHR in den Kern, wo er u.a. als Transkriptionsfaktor für pro-apoptotische Proteine wie Bim, Puma oder Noxa fungiert (Dijkers et al., 2002; Obexer et al., 2007; You et al., 2006). In Übereinstimmung mit der beobachteten dosisabhängigen Dephosphorylierung von P-Akt S473 48 h nach Behandlung (Abbildung 5.17C) nahm auch die Phosphorylierung von P-FKHR massiv ab (Abbildung 5.17C). FKHR kann somit in den Kern gelangen und die Transkription pro-apoptotischer Proteine vorantreiben. Bereits in Abbildung 5.15 wurde dargelegt, dass die Expression von Bim und Noxa, beides Targets von FKHR, nach ErPC und kombinierter Behandlung hochreguliert wurde.

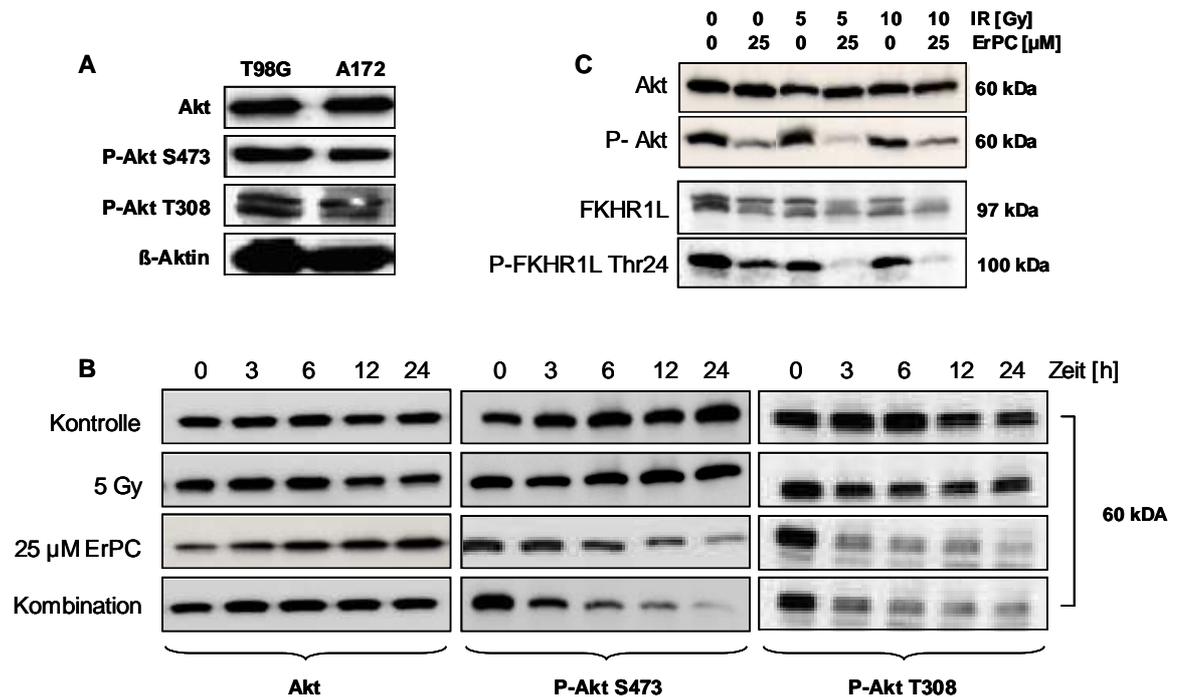


Abbildung 5.17 Phosphorylierungsstatus von Akt und FKHR nach IR, ErPC und kombinierter Behandlung

T98G wurden mit 0, 5 oder 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit 0 oder 25 μM ErPC stimuliert. Die Aktivierung von PKB/Akt sowie seinem Downstream-Target FKHR wurde im Western Blot mit spezifischen Antikörpern analysiert.

(A) Expressionsstatus von Akt und P-Akt in unbehandelten A172 und T98G

(B) Zeitabhängige Dephosphorylierung von P-Akt nach ErPC oder der Kombination

(C) Dosisverläufe 48 h nach Behandlung: die Dephosphorylierung von PKB/Akt ist assoziiert mit verminderten Phosphorylierungs-Leveln an P-FKHR

Die Daten zeigen repräsentative Blots.

5.2.5 ErPC und die kombinierte Behandlung beeinflussen Zellzyklusproteine

Bestrahlung von Zellen führt u.a. zu DNA-Schäden in der Zelle, was je nach Ausmaß der Schäden zum Arrest der Zellen in G1 und G2 führt oder direkt in Apoptose mündet (Gudkov and Komarova, 2003; Kastan and Bartek, 2004). Desgleichen wurde gezeigt, dass Behandlung von Zellen mit ErPC neben Apoptose auch einen Arrest der Zellen in G2/M auslösen kann (Jendrossek et al., 2001). An der Schaltstelle zwischen Apoptose und Arrest steht p53 als zentrales Regulatorprotein, das je nach Schadensmaß Reparaturprozesse unter Zellarrest initiiert oder Zelltodwege ansteuert (Gudkov and Komarova, 2003). Neben p53 greift aber auch Rb an der Schnittstelle zwischen Leben, Tod und Differenzierung regulierend ins Geschehen ein, was v.a. in den p53-negativen T98G Zellen von Bedeutung sein könnte. So ist seit längerem bekannt, dass die Zellzyklus-Proteine Rb und p27 eine wesentliche Rolle im G1-Arrest spielen und es gibt Hinweise darauf, dass auch ein dauerhafter G2-Arrest durch Abhängigkeit von Rb geprägt ist (Wang et al., 2001). Über den

Transkriptionsfaktor E2F1 kann Rb außerdem indirekt durch fehlende Inhibierung von E2F1 die Expression pro-apoptotischer Proteine wie Puma, Noxa, Bim und einiger Caspasen bewirken (Hershko and Ginsberg, 2004). Um zu eruieren, ob die kombinierte Behandlung aus Bestrahlung und ErPC in T98G die Proteine Rb und p27 beeinflusst, wurde ihr Status im Western Blot untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Phosphorylierung von Rb an S795 und S807/811 nach Bestrahlung leicht und nach Stimulation mit ErPC etwas stärker abnahm (Abbildung 5.18A). Kombinierte Behandlung führte jedoch zu einer deutlich verstärkten Reduktion des Phosphorylierungsstatus an den beiden untersuchten Phosphorylierungsstellen im Protein. Interessanterweise kam es allerdings nach Stimulation mit ErPC oder

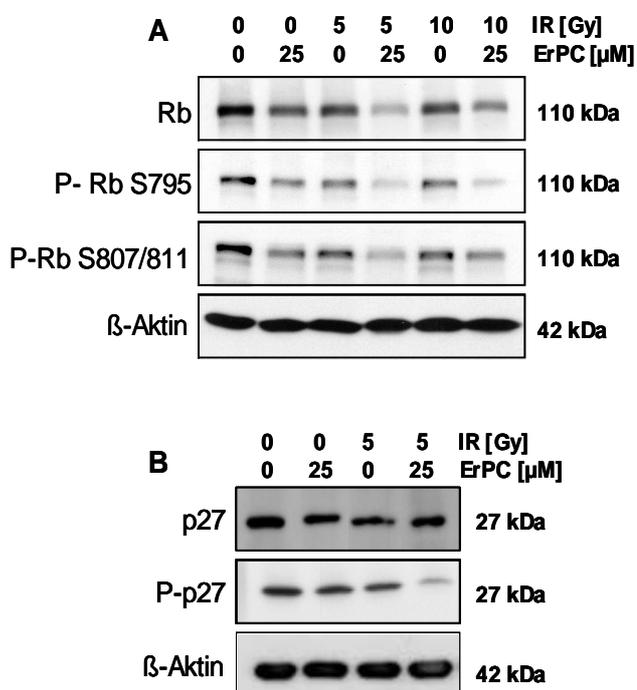


Abbildung 5.18 Status der Zellzyklusproteine Rb und p27 nach IR, ErPC und kombinierter Behandlung

T98G wurden mit 0, 5 oder 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit 0 oder 25 μ M ErPC stimuliert. Die Expressionslevel von Rb und p27 sowie ihr Phosphorylierungsstatus wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern überprüft.

(A) Expressionsstatus und Phosphorylierungsformen von Rb 48 h nach Behandlung

(B) Veränderungen bei p27 und P-p27 zum Zeitpunkt 24 h nach Stimulation

Die Daten zeigen repräsentative Blots. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet.

kombinierter Behandlung außerdem zu einer deutlichen Abnahme des Levels an unphosphoryliertem Rb.

Bei p27 zeigten sich hingegen kaum nennenswerte Veränderungen nach Behandlung, lediglich nach kombinierter Behandlung nahm die Phosphorylierung an T157 ab (Abbildung 5.18B).

5.2.6 ErPC3 verstärkt die strahleninduzierte Foci-Bildung von γ -H2AX

Nach Einwirkung ionisierender Strahlung auf Zellen kommt es unter anderem zur Bildung freier Radikale, die neben weiteren Reaktionen auch Doppelstrangbrüche (DS-Brüche) in der DNA verursachen. Diese führen zur Bildung von γ -H2AX, der phosphorylierten Form der

Histonvariante H2A (Rogakou et al., 1998). Dabei werden die DS-Brüche durch spezielle Kinasen (ATM, ATR, DNA-PK) erkannt, die auch für die Phosphorylierung von H2AX verantwortlich sind (Burma et al., 2001; Stiff et al., 2004). γ -H2AX lagert sich an die offenen

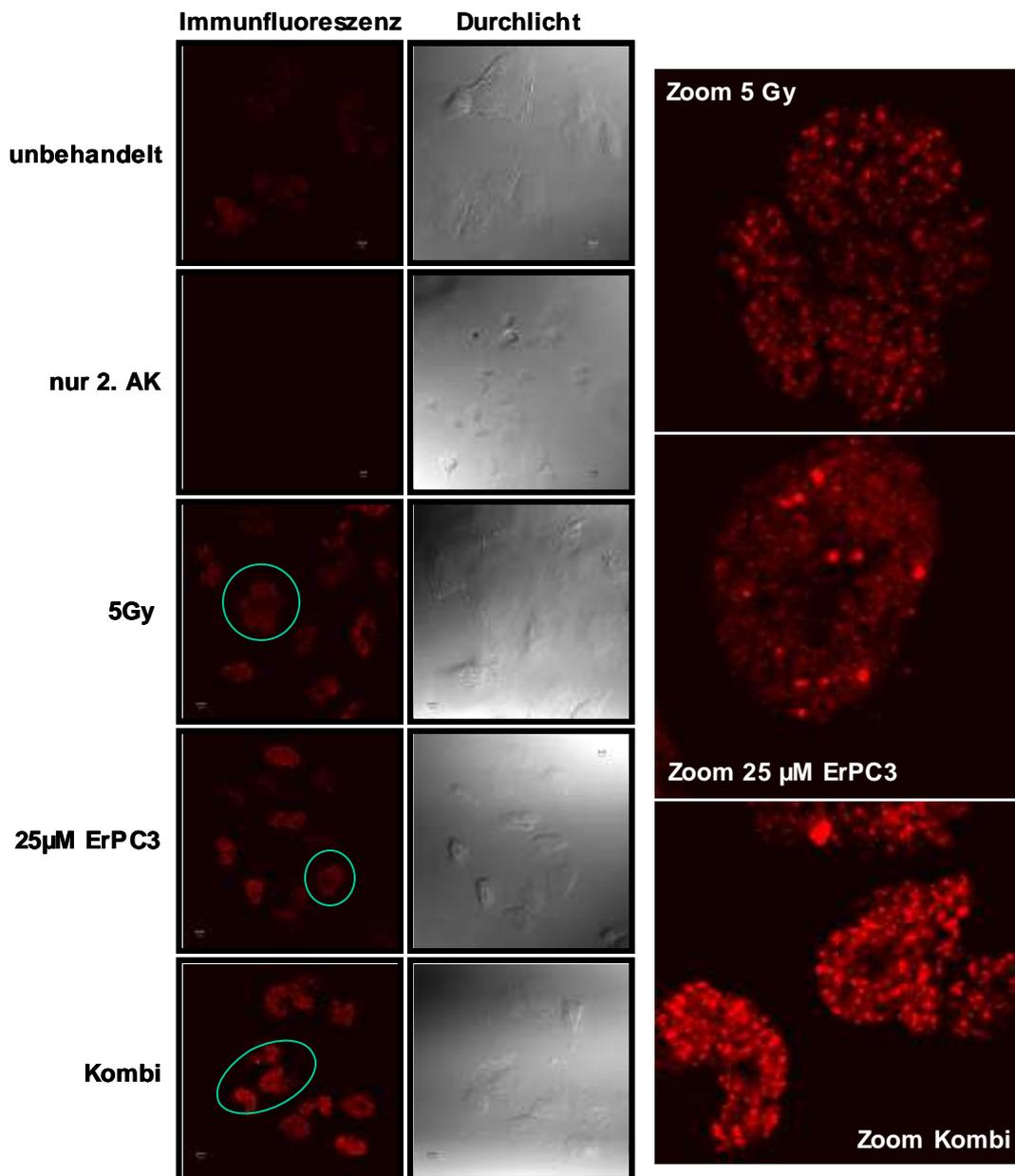


Abbildung 5.19 γ -H2AX-Focibildung nach IR, ErPC3 und Kombinationsbehandlung

T98G wurden mit 0 oder 5 Gy bestrahlt und anschließend mit 0 oder 25 μ M ErPC stimuliert. 40 min nach Behandlung wurden die Zellen in 4% PFA fixiert und dann mit 0,2 % Triton permeabilisiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem Primärantikörper γ -H2AX und dem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper. Die grün umrandeten Zellen sind rechts mit Zoom 4 vergrößert abgebildet.

Die Daten zeigen repräsentative Aufnahmen mit einem Laserscanmikroskop. Verwendet wurde ein 40er Objektiv und die Fotos links wurden mit einem Zoom von 1,5 aufgenommen.

Als Negativkontrolle und zum Ausschließen von unspezifischer Hintergrundfärbung wurden die Zellen nur mit Zweitantikörper inkubiert.

DS-Brüche an und bildet dort die sogenannten Foci, die man über Immunfluoreszenz nachweisen kann. Daher eignen sich diese Foci gut als Nachweis von DNA-Schäden in Form von DS-Brüchen. Allerdings kommt es in geringerem Anteil auch in der S-Phase des Zellzyklus unbehandelter Zellen vorübergehend zur Bildung von γ -H2AX, da während der Replikation kurzfristig offene DNA-Enden vorhanden sind.

Als ein weiterer möglicher Verstärkermechanismus der strahleninduzierten Apoptose durch kombinierte Behandlung mit ErPC/ErPC3 käme auch eine erhöhte Induktion von DNA-Schäden in Frage. Deshalb wurde über Immunfluoreszenz mit γ -H2AX-spezifischen Antikörpern die Focibildung nach 5 Gy, 25 μ M ErPC3 und kombinierter Behandlung untersucht. In unbehandelten Zellen war keine wesentliche Anfärbung von γ -H2AX nachweisbar (Abbildung 5.19). Teilweise war jedoch auch in manchen unbehandelten Zellen ein schwaches Fluoreszenzsignal nachzuweisen, was daran lag, dass sich ein Teil der Zellen in der S-Phase befand, wo im Zuge der Replikation offene Doppelstränge der DNA entstehen, an denen sich γ -H2AX anlagert. Bestrahlung mit 5 Gy führte zu einem deutlichen Anstieg der H2AX-Phosphorylierung in allen Zellen mit gleichmäßiger Verteilung der Foci im gesamten Zellkern (Abbildung 5.19). Interessanterweise induzierte auch Stimulation mit 25 μ M ErPC3 die Focibildung, wobei diese jedoch vereinzelter auftraten, dafür aber von stärkerer Ausprägung waren. Nach kombinierter Behandlung konnte jedoch im Vergleich zu den Einzelbehandlungen eine eindeutige Zunahme der Focibildung beobachtet werden mit gleichmäßiger Verteilung im Zellkern und von größerem Volumen als die Foci nach Bestrahlung allein (Abbildung 5.19).

Um die über die Immunfluoreszenz erhaltenen Ergebnisse weiter zu bekräftigen, wurde der Status von H2AX nach Behandlung im Western Blot mittels phosphorylierungsspezifischem Antikörper untersucht. Wie zu erwarten blieben die Expressionslevel an H2AX unbeeinflusst von jeglicher Behandlung (Abbildung 5.20). Der Phosphorylierungsstatus von H2AX änderte

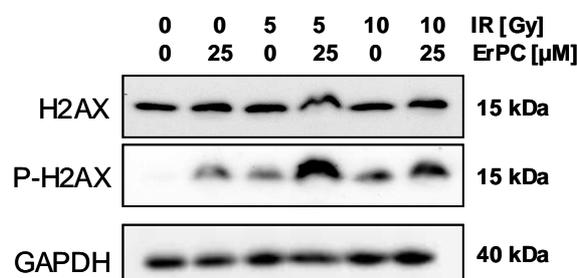


Abbildung 5.20 Phosphorylierungsstatus von H2AX nach IR, ErPC oder Kombinationsbehandlung

T98G wurden mit 0, 5 oder 10 Gy bestrahlt und anschließend mit 0 oder 25 μ M ErPC stimuliert. 48 h nach Behandlung wurden die Zellen lysiert und der Status von H2AX im Western Blot untersucht.

Die Daten zeigen repräsentative Blots. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

sich jedoch entsprechend der zuvor durch Immunfluoreszenz gewonnenen Daten: Nach Behandlung mit ErPC und nach Bestrahlung wurde γ -H2AX induziert. Dabei waren die Level nach 25 μ M ErPC und 5 Gy vergleichbar, nach 10 Gy erwartungsgemäß etwas höher, da die Anzahl an DS-Brüchen mit der Strahlendosis ansteigt. Nach Behandlung aus IR und ErPC konnte ein deutlicher Kombinationseffekt beobachtet werden, der sich in einem massiven Anstieg der Phosphorylierungsraten äußerte (Abbildung 5.20). Dabei erschien interessanterweise die Kombination aus ErPC mit 5 Gy noch effizienter als ErPC mit 10 Gy.

5.3 ErPC3 und Bestrahlung im Jurkat-Lymphoma-Modell

Anhand der verschiedenen Experimente zum Wirkmechanismus der kombinierten Behandlung aus IR und ErPC bzw. ErPC3 in T98G ließ sich eine klare Beteiligung des mitochondrialen Zelltodwegs ableiten. Um nun herauszufinden, ob dieser Weg übers Mitochondrium essentiell für die kombinierte Behandlung ist oder durch weitere Mechanismen kompensiert werden kann, wurden zusätzliche funktionelle Analysen dazu im Jurkat Modell durchgeführt. Mit dem Jurkat Modell stehen verschiedene Zellvarianten mit unterschiedlichen Defekten zur Verfügung wie z.B. solchen im mitochondrialen Zelltodweg. Für die folgenden Untersuchungen zur kombinierten Wirkung aus Bestrahlung und ErPC3 wurde auf zwei verschiedene Jurkat-T-Lymphomzellpaare zurückgegriffen. Zum einen wurden Jurkat vector und Jurkat Bcl-2 Zellen verwendet, zum anderen JCAM Bak-positive und JCAM Bak-negative Zellen eingesetzt. Die Jurkat vector Zellen sind mit einer leeren Vector-Kontrolle transfiziert und dienen somit als Kontrolle zu den Jurkat Bcl-2, die mit einem Vector transfiziert sind, der Bcl-2 enthält, das dauerhaft in den Zellen überexprimiert wird. Somit hat man bei diesem Zellpaar die Möglichkeit, über eine massive Hochregulation des anti-apoptotischen Bcl-2 die mitochondriale Apoptose stark zu hemmen. Mit dem zweiten Zellpaar hingegen kann man die Apoptosewege, die über das Mitochondrium laufen, komplett ausschalten: Dadurch, dass Jurkat Zellen kein Bax exprimieren, haben die Bak-negativen JCAM keine Alternative in der mitochondrialen Apoptose, während bei den Bak-positiven Zellen die Rolle von Bax durch Bak kompensiert werden kann. Diese werden daher als Kontrollzellen verwendet.

5.3.1 Verifizierung der Zellsysteme im Western Blot

Vorab wurde der Expressionsstatus von Bcl-2 der Jurkat-Zellen sowie der Expressionsstatus von Bak der JCAM-Zellen im Western Blot überprüft. Außerdem wurden alle Zellen auf ihre

zuvor beschriebene p53-Negativität und Bax-Negativität (Brimmell et al., 1998; Cheng and Haas, 1990) getestet.

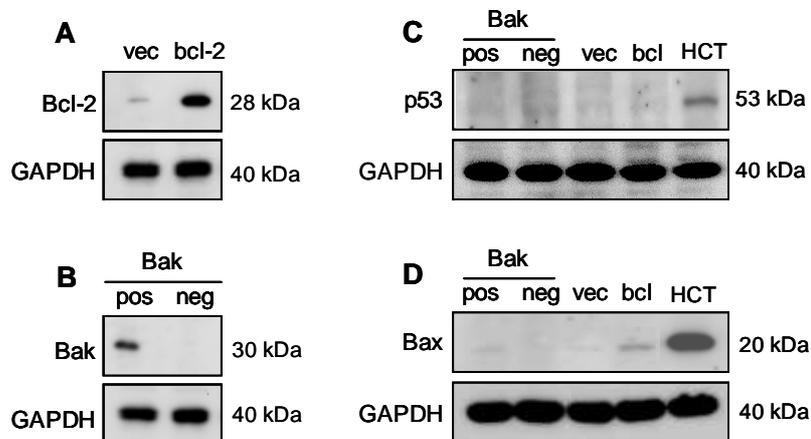


Abbildung 5.21 Expressionsstatus von Bcl-2, Bak, p53 und Bax in Jurkat-Zellen

Unbehandelte Jurkat vector und Bcl-2 Zellen sowie Bak-positive und Bak-negative JCAM wurden lysiert und anschließend im Western Blot zur Verifizierung des Expressionsstatus analysiert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

- (A) Bcl-2 Expression in Jurkat vector und Jurkat Bcl-2 Zellen
 (B) Bak Expression in Bak-positiven und Bak-negativen JCAM
 (C) p53-Negativität der Jurkat vector und Bcl-2 Zellen sowie der JCAM-Zellen
 (Verwendung von HCT-116 wt Zellen als Positivkontrolle für p53)
 (D) Bax Expressionslevel der Zellen mit HCT-116 wt als Positivkontrolle

Wie in Abbildung 5.21A verdeutlicht, zeigten die Bcl-2-überexprimierenden Jurkat Bcl-2 Zellen eine deutliche Expression an Bcl-2 während die Jurkat vector Zellen kaum Bcl-2 exprimierten. Bei den Bak-positiven Zellen ergab sich ein klares Signal für Bak, während die Bak-negativen Zellen kein Bak exprimierten (Abbildung 5.21B). Außerdem wiesen alle Zellen die in der Literatur beschriebene p53-Negativität auf (Abbildung 5.21C). Bei der Überprüfung des Bax-Status wiesen manche Zellen eine ganz schwache Hintergrund-Expression des Proteins auf (Abbildung 5.21 D). Allerdings zeigt sich das Phänomen nicht in den Bak-defizienten Zellen, so dass diese auf jeden Fall keine Möglichkeit haben, Apoptose über das Mitochondrium auszuführen. Alle Zellen erfüllen also in vollem Umfang ihre Funktionalität und können für die weiteren Versuche eingesetzt werden.

5.3.2 ErPC3 und kombinierte Behandlung induzieren hocheffizient Apoptose in Jurkat vector Zellen

Zunächst sollte in einem erstem Versuch geklärt werden, ob ErPC/ErPC3 bzw. die kombinierte Behandlung mit Bestrahlung auch im Jurkat-Zellsystem effizient Apoptose

auslösen. Dazu wurden die Zellen bestrahlt, direkt im Anschluss mit ErPC3 behandelt und die Apoptoseraten über Nicoletti-Färbung im FACS bestimmt.

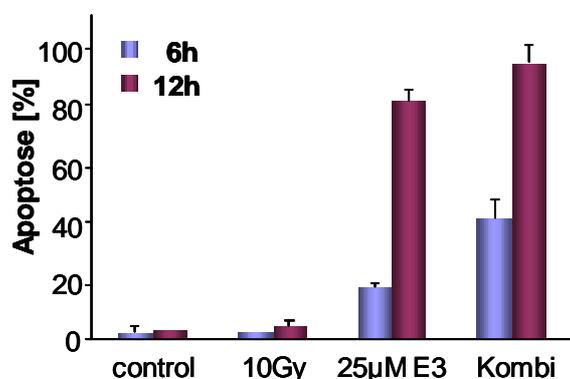


Abbildung 5.22 Apoptose-Induktion nach IR, ErPC3 und kombinierter Behandlung in Jurkat vector Zellen

Jurkat vector Zellen wurden mit 0 oder 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit 0 oder 25 µM ErPC3 behandelt. 6 bzw. 12 h nach Behandlung wurden die Apoptoseraten über Nicoletti-Färbung im FACS ermittelt. Die Daten zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.

Wie in Abbildung 5.22 verdeutlicht, induzierte Bestrahlung im Untersuchungszeitraum noch keine Apoptose. Stimulation mit ErPC3 führte jedoch in Abhängigkeit vom Behandlungszeitraum zu massiver Apoptose, die durch kombinierte Behandlung mit Bestrahlung weiter gesteigert wurde (Abbildung 5.22).

5.3.3 Bcl-2-Überexpression kann die Wirkung der kombinierten Behandlung hemmen aber nicht vollständig blocken

5.3.3.1 Der Einfluss einer Bcl-2-Überexpression auf den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials

Nachdem der Beweis erbracht war, dass das System ErPC3 und Bestrahlung mindestens ebenso effizient Apoptose in Jurkat Zellen auslöste wie in T98G, konnten die Untersuchungen zur Abhängigkeit der kombinierten Wirkung vom mitochondrialen Zelltodweg durchgeführt werden. Zunächst wurde geprüft, ob eine Verschiebung des Gleichgewichts pro- und anti-apoptotischer Proteine zugunsten des Überlebens ausreicht, um die kombinierte Wirkung zu blocken. Dazu wurden Jurkat vector und Jurkat Bcl-2 Zellen bestrahlt, mit ErPC3 stimuliert und als Endpunkt nach Behandlung der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials über TMRE-Färbung im FACS analysiert.

Während Jurkat vector Zellen erst nach 24 h auf Bestrahlung allein reagierten, konnten nach Stimulation mit ErPC bzw. der kombinierten Behandlung bereits nach 6-12 h deutliche Apoptose-induzierende Effekte beobachtet werden (Abbildung 5.23A). Für ErPC3 sowie die kombinierte Behandlung ergab sich außerdem eine Dosis- und Zeitabhängigkeit im Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (Abbildung 5.23A). In der Dosiskinetik scheint es jedoch zwischen 12.5 und 25 µM irgendwo einen drastischen Sprung

in der Wirksamkeit zu geben, denn trotz der sehr guten Kombinationswirkung aus 12.5 μM ErPC3 und 10 Gy wirkte 25 μM ErPC3 allein besser. Durch Überexpression von Bcl-2 wurde zum Zeitpunkt 6 h die Apoptose-Induktion bei allen Behandlungen vollständig geblockt (Abbildung 5.23B). Nach 12h war ein leichter Anstieg an Zellen mit zusammengebrochenem mitochondrialen Membranpotential nach 25 μM ErPC3 sowie der Kombination aus 10 Gy mit 25 μM ErPC3 zu erkennen, während die übrigen Behandlungen weiter geblockt waren. Bestrahlung mit 10 Gy sowie Stimulation mit 12.5 μM ErPC allein konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum durch Bcl-2-Überexpression vollständig blockiert werden (Abbildung 5.23B). Die Inhibierung beider Kombinationsbehandlungen sowie der Stimulation mit ErPC3 allein war nach 24 h jedoch ineffektiv und die Zahl an Zellen mit geringem $\Delta\Psi_m$ stieg rapide an (Abbildung 5.23B).

Zusammenfassend kann man daher feststellen, dass Überexpression von Bcl-2 die kombinierte Behandlung zwar kurzfristig hemmen aber nicht blocken kann.

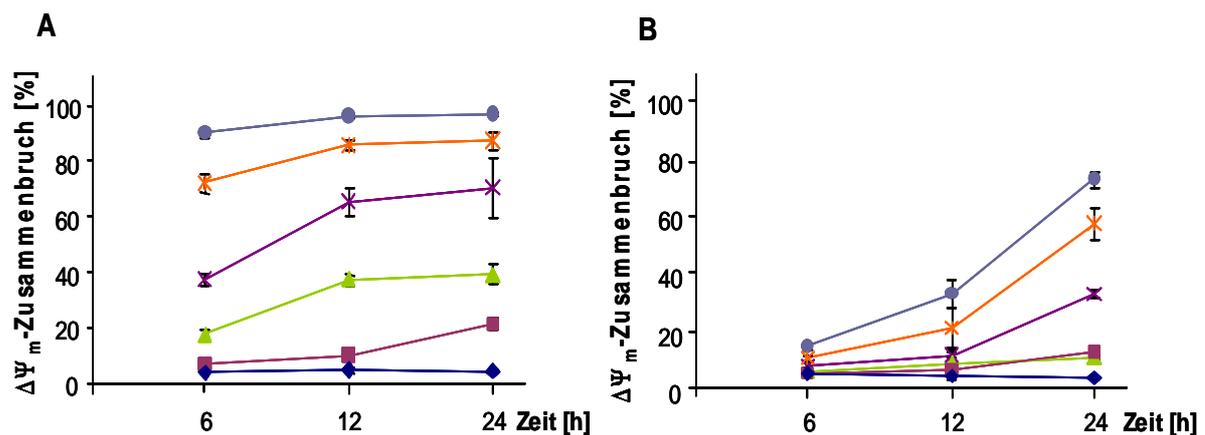


Abbildung 5.23 Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nach IR, ErPC3 (E3) und kombinierter Behandlung

Jurkat vector Zellen wurden mit 0 oder 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit 0, 12.5 oder 25 μM ErPC3 behandelt. 6, 12 oder 24 h nach Behandlung wurde der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials über TMRE-Färbung im FACS bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit entsprechender Standardabweichung.



5.3.3.2 Der Einfluss einer Bcl-2-Überexpression auf die Caspasen-Aktivierung

Nachdem ersichtlich war, dass Bcl-2-Überexpression den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials zwar hemmen und zeitverzögern, aber nicht vollständig blockieren kann, sollten die Ergebnisse im Western Blot durch Analysen der Caspasenaktivierung verifiziert werden.

Die Aktivierung der Caspasen wurde durch Bcl-2-Überexpression zwar deutlich verzögert, aber wie auch nach den Messungen zum Membranpotential zu erwarten war, nicht vollständig geblockt (Abbildung 5.24). Während in Jurkat vector Zellen bereits nach 6 h eine deutliche Spaltung der Caspasen 9, 3 und 8 zu beobachten war (Abbildung 5.24A), erfolgte dies in Jurkat Bcl-2 Zellen erst nach 12 h und war auch sichtbar vermindert (Abbildung 5.24B). Entsprechend wurde auch PARP in den vector-Zellen nach kombinierter Behandlung ab 12 h vollständig durchgespalten, was indikativ für aktive Caspasen ist. Im Gegensatz dazu waren in den Bcl-2 überexprimierenden Zellen selbst nach 24 h noch ungespaltene Reste an PARP übrig.

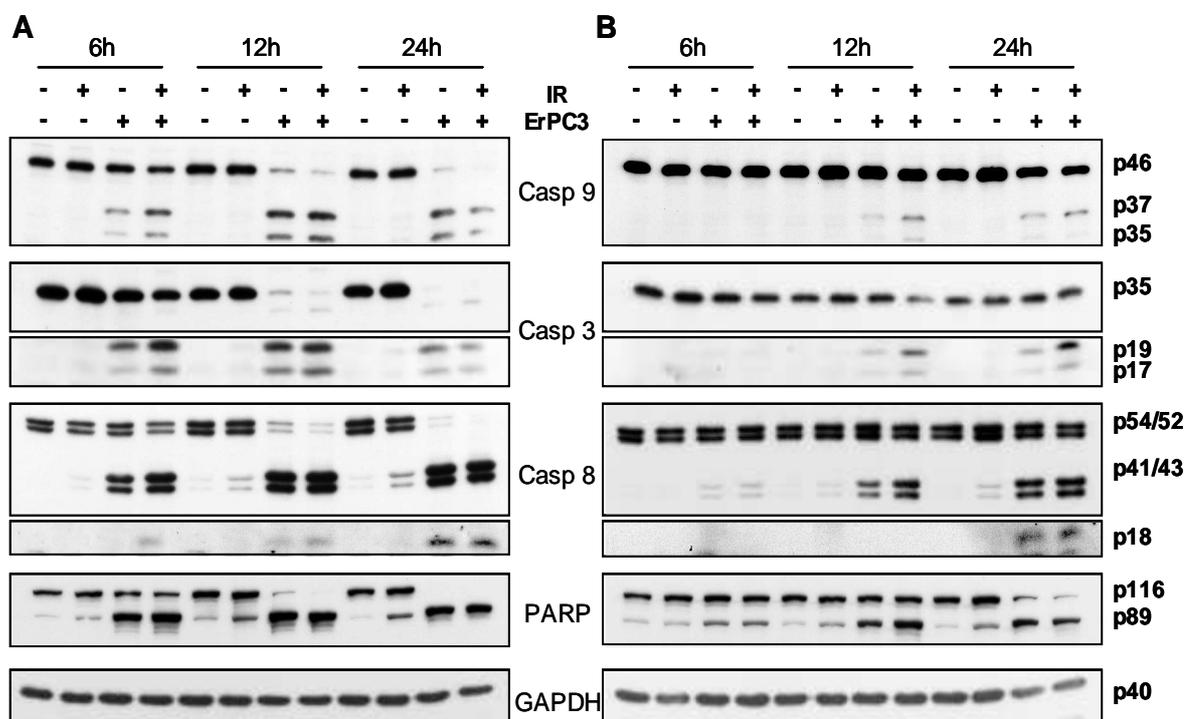


Abbildung 5.24 Caspasen-Aktivierung in Abhängigkeit der Bcl-2-Überexpression

Jurkat vector und Bcl-2 Zellen wurden mit 0 oder 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit 0 oder 25 μ M ErPC3 stimuliert. 6, 12 oder 24 h nach Behandlung wurden die Zellen lysiert und die Caspasen-Aktivierung sowie PARP-Spaltung im Western Blot untersucht.

Die Daten zeigen repräsentative Blots. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

(A) Jurkat vector Zellen

(B) Jurkat Bcl-2 Zellen

5.3.4 Veränderungen pro- und anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine nach Kombinationsbehandlung in Jurkat vector und Bcl-2 Zellen

Da sich herausgestellt hatte, dass Bcl-2-Überexpression einen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und Caspasenaktivierung hemmt, stellte sich die Frage,

inwiefern die Kombinationsbehandlung das Gleichgewicht pro- und anti-apoptotischer Proteine am Mitochondrium beeinflussen kann.

Dazu wurde in Jurkat vector und Bcl-2 Zellen der Zustand verschiedener pro- und anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine im Western Blot nach Bestrahlung, Stimulation mit ErPC3 oder kombinierter Behandlung analysiert.

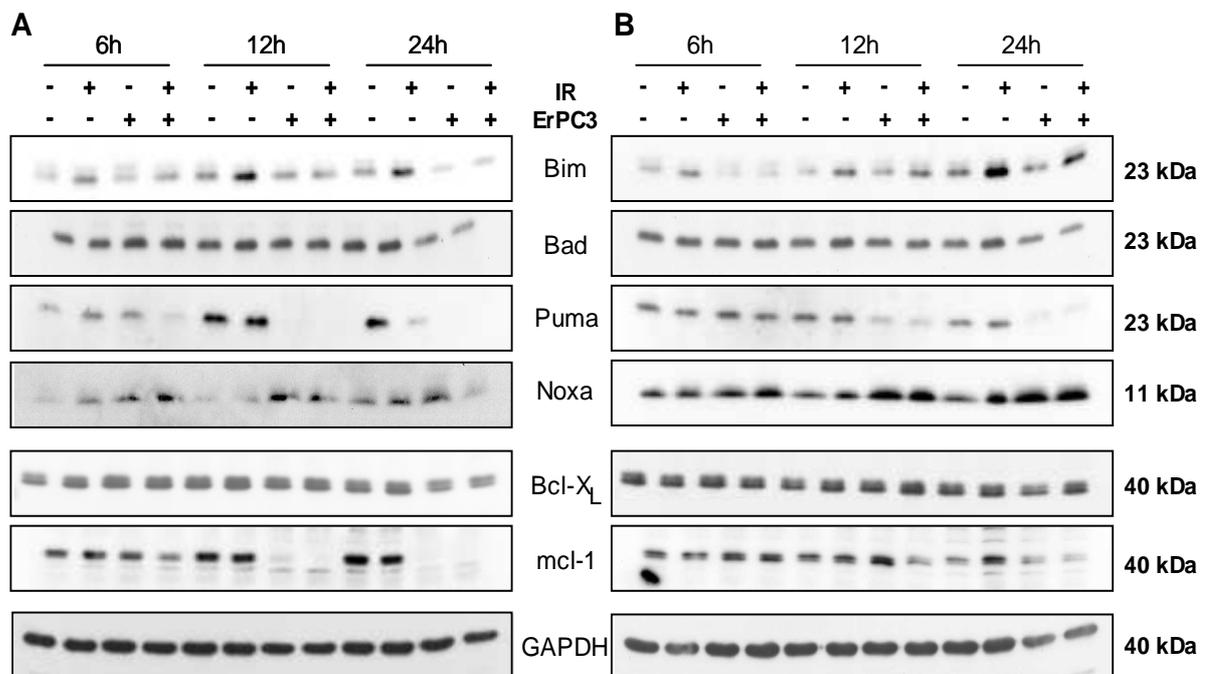


Abbildung 5.25 Änderungen verschiedener pro- und anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine in Abhängigkeit der Bcl-2-Überexpression

Jurkat vector und Bcl-2 Zellen wurden mit 0 oder 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit 0 oder 25 μ M ErPC3 stimuliert. 6, 12 oder 24 h nach Behandlung wurden die Zellen lysiert und der Status verschiedener pro- und anti-apoptotischer Proteine im Western Blot analysiert.

Die Daten zeigen repräsentative Blots. Als Ladekontrolle wurde der Level an GAPDH bestimmt.

(A) Jurkat vector Zellen

(B) Jurkat Bcl-2 Zellen

In Übereinstimmung mit den für T98G erhaltenen Daten ergaben sich keine Veränderungen der Proteinlevel für Bad und Bcl-x_L nach IR, ErPC3 oder kombinierter Behandlung (Abbildung 5.25A). Dies änderte sich auch nicht bei Überexpression von Bcl-2 (Abbildung 5.25B).

Durch Bestrahlung, Gabe von ErPC3 sowie nach Kombination aus beidem konnte die bereits für T98G beobachtete Zunahme an Noxa in Jurkat vector bestätigt werden (Abbildung 5.25A). Überexpression von Bcl-2 schien diese Zunahme an Noxa weiter zu verstärken (Abbildung 5.25B).

Die für T98G erfasste Induktion von Bim nach kombinierter Behandlung konnte in den Jurkat vector Zellen nicht gefunden werden, tauchte jedoch in Jurkat Bcl-2 Zellen wieder auf. Interessanterweise bewirkte jedoch Bestrahlung allein in beiden Jurkat-Zelllinien eine deutliche Induktion von Bim.

Obwohl unverändert in T98G wurde Mcl-1 in Jurkat vector Zellen nach ErPC und kombinierter Behandlung abgebaut und Bcl-2 Überexpression verzögerte diesen Abbau und schwächte ihn ab (Abbildung 5.25A und B).

Überraschenderweise wurden die Proteinlevel von Puma nicht wie in T98G gesteigert sondern 12 und 24 h nach Behandlung reduziert. Dieser Vorgang war in den Bcl-2 Zellen ebenfalls verlangsamt.

5.3.5 Veränderungen oberhalb des Mitochondriums durch Überexpression von Bcl-2

In T98G wurde festgestellt, dass ErPC und die kombinierte Behandlung die Aktivität von Akt negativ beeinflussen und auf diese Weise die Überlebenssignalübertragung in den Zellen inhibieren könnten. Um festzustellen, ob in Jurkat Zellen die Hemmung von Akt ebenfalls einen Beitrag zur ausgezeichneten Wirkung der Kombination leisten könnte, wurde der Status von Akt und seinem Downstream-Target FKHR nach IR, ErPC3 oder kombinierter Behandlung im Western Blot überprüft.

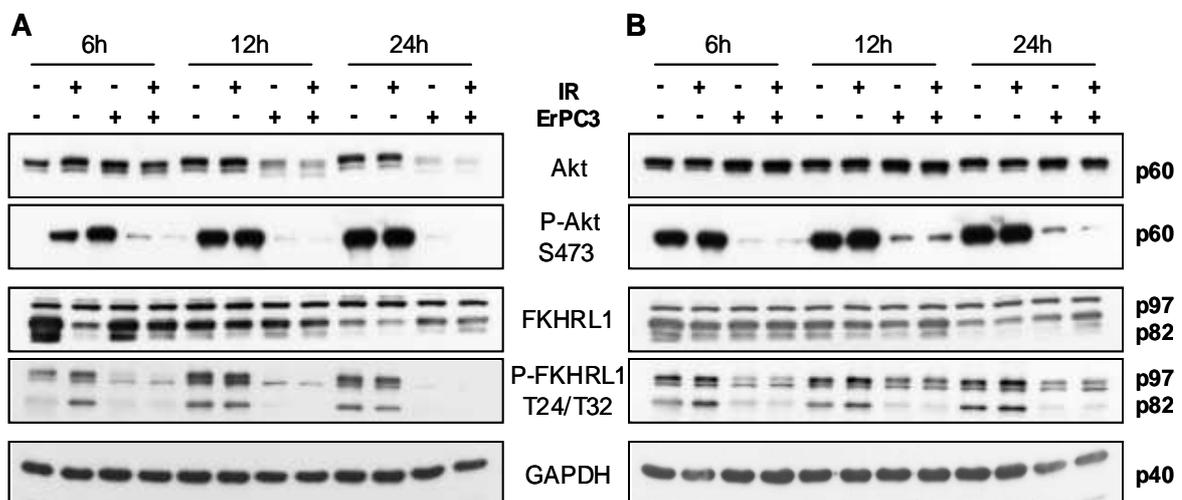


Abbildung 5.26 Phosphorylierungsstatus von Akt und FKHR in Abhängigkeit der Bcl-2-Überexpression

Jurkat vector und Bcl-2 Zellen wurden mit 0 oder 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit 0 oder 25 μ M ErPC3 stimuliert. 6, 12 oder 24 h nach Behandlung wurde die Aktivierung von PKB/Akt und FKHR im Western Blot analysiert.

Die Daten zeigen repräsentative Blots. Als Ladekontrolle diente der Level an GAPDH.

(A) Jurkat vector Zellen

(B) Jurkat Bcl-2 Zellen

Äquivalent zu den in T98G gemachten Beobachtungen wurde P-Akt S473 nach 25 μ M ErPC3 sowie kombinierter Behandlung dephosphoryliert (Abbildung 5.26A). Die Dephospho-

rylierung setzte bereits nach 6 h ein und führte zu einer kompletten Dephosphorylierung des Proteins. Dieser massive Aktivitätsverlust übertrug sich vergleichbar auf Phospho-FKHRL1 an T24/T32, welches nun in entsprechendem Maße nicht mehr phosphoryliert werden konnte (Abbildung 5.26A). Interessanterweise kam es nach 12 und 24 h durch ErPC3 und kombinierte Behandlung in Jurkat vector Zellen zu einem Abbau von unphosphoryliertem Akt, der in Bcl-2 Zellen nicht zu beobachten war.

Eigentlich sollte man durch Hemmung der frühen Apoptose am Mitochondrium durch Überexpression von Bcl-2 keine Beeinflussung von Proteinen aus Signalwegen oberhalb des Mitochondriums erwarten. Allerdings war in den Bcl-2 Zellen die Dephosphorylierung von Akt nicht so vollständig wie in den vector Zellen und es war deutlich mehr phosphoryliertes FKHR vorhanden (Abbildung 5.26B). Des Weiteren blieb der Level an unphosphoryliertem Akt konstant und es wurde nicht abgebaut. Dies deutet darauf hin, dass Akt und dadurch auch FKHL1 als Downstream-Targets von Bcl-2 über einen bislang unbekanntem Weg reguliert werden könnten.

5.3.6 Der Einfluss einer Überexpression an Bcl-2 auf Rb und den Zellzyklus

Bei Behandlung von T98G mit ErPC sowie ErPC + IR wurden Veränderungen im Phosphorylierungsstatus von Rb sowie in der Menge an vorhandenem Protein festgestellt. Daher sollte auch in den Jurkat Zellen abgeklärt werden, ob Umgestaltungen bezüglich Rb nach kombinierter Behandlung auftreten und ob diese durch Überexpression von Bcl-2 beeinflusst werden. Dazu wurden zum einen Western Blot Analysen zum Rb-Status durchgeführt, zum anderen in FACS-Versuchen über Nicoletti-Färbung Zellzyklusveränderungen untersucht.

Im Western Blot zeigten Jurkat vector Zellen ähnliche Reaktionen bezüglich Rb wie T98G, nur deutlich verstärkt: Stimulation mit ErPC3 sowie kombinierte Behandlung führte zu einem massiven Abbau an Rb nach 12 und 24 h (Abbildung 5.27A). 24 h nach kombinierter Behandlung war kein Rb mehr nachweisbar. Im selben Maße wie Rb abnahm war auch eine verminderte Phosphorylierung des Proteins an S795 sowie S807/811 zu erkennen (Abbildung 5.27A). Im Gegensatz zu den vector Zellen trat in den Bcl-2 Zellen keinerlei Abbau des Rb-Proteins auf. Interessanterweise waren auch keine Veränderungen im Phosphorylierungsstatus von Rb erkennbar (Abbildung 5.27B).

Die FACS-Versuche in Jurkat vector und Bcl-2 Zellen sollten zur Klärung beitragen, ob die im Western Blot detektierte Dephosphorylierung von Rb mit einem klassischen Zellzyklusarrest über Blockade von Promotorregionen durch Rb einhergeht.

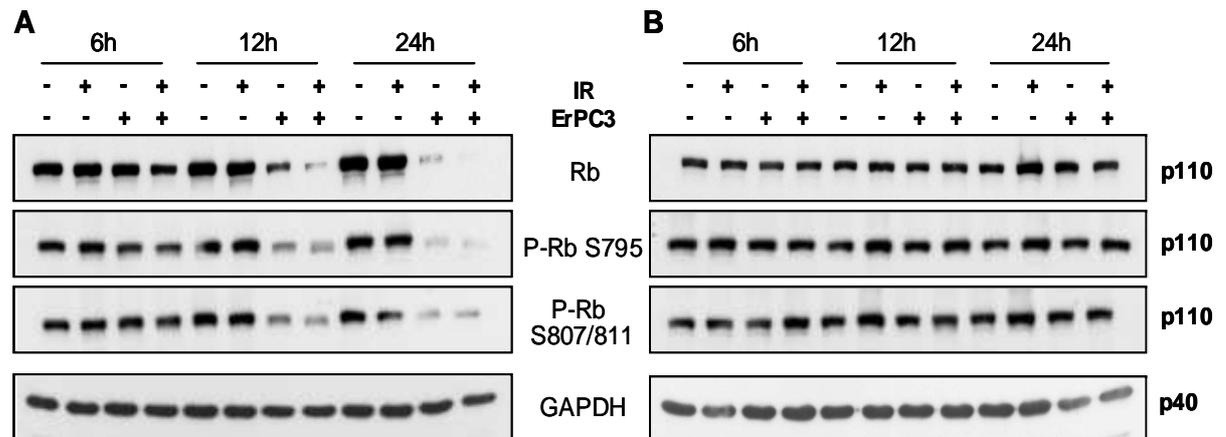


Abbildung 5.27 Status des Zellzyklusproteins Rb in Abhängigkeit der Bcl-2-Überexpression

Jurkat vector und Bcl-2 Zellen wurden mit 0 oder 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit 0 oder 25 μM ErPC3 stimuliert. 6, 12 oder 24 h nach Behandlung wurde der Status von Rb sowie die Phosphorylierungszustände im Western Blot untersucht.

Die Daten zeigen repräsentative Blots. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

(A) Jurkat vector Zellen

(B) Jurkat Bcl-2 Zellen

Dabei konnte beobachtet werden, dass Bestrahlung von Jurkat vector und Bcl-2 Zellen einen in beiden Zelllinien identischen G2/M Arrest hervorrief, der sich mit der Zeit weiter verstärkte (Abbildung 5.28 A). Stimulation der Zellen mit 12,5 oder 25 μM ErPC3 führte hingegen in keiner der beiden Zelllinien zu einem Arrest in G2/M (Abbildung 5.28 A).

Deutliche Unterschiede im Arrestverhalten der Zelllinien zeigten sich erst nach kombinierter Behandlung. In der Kombination mit 12,5 μM ErPC3 arretierten Jurkat Bcl-2 in vergleichbarem Ausmaß wie nach Bestrahlung allein, während der Arrest in den Jurkat vector Zellen deutlich geringer ausfiel (Abbildung 5.28 A). Dies ging einher mit einer entsprechend vermehrten Apoptoserate in den Jurkat vector Zellen (Abbildung 5.28 B). In der Kombination mit 25 μM ErPC3 war dann auch in den Jurkat Bcl-2 Zellen der strahleninduzierte Arrest deutlich reduziert, da die Zellen in Abhängigkeit von der Zeit in die Apoptose gingen (Abbildung 5.28 A und B). Jurkat vector Zellen hingegen zeigten nach dieser Kombination keinen Arrest mehr, vielmehr befanden sich nach 12 h so gut wie keine Zellen mehr in der G2/M-Phase des Zellzyklus, was auf die fast 100%ige Zelltodrate der Kombination (Abbildung 5.28 B) zurückzuführen war.

Abschließend kann man aus diesen Ergebnissen folgern, dass ErPC3 in geeigneter Konzentration die Zellen aus dem Arrest holen und in die Apoptose führen kann. Dies wird durch Bcl-2 inhibiert, aber nur bis zu Konzentrationen von einschließlic 12,5 μM ErPC3.

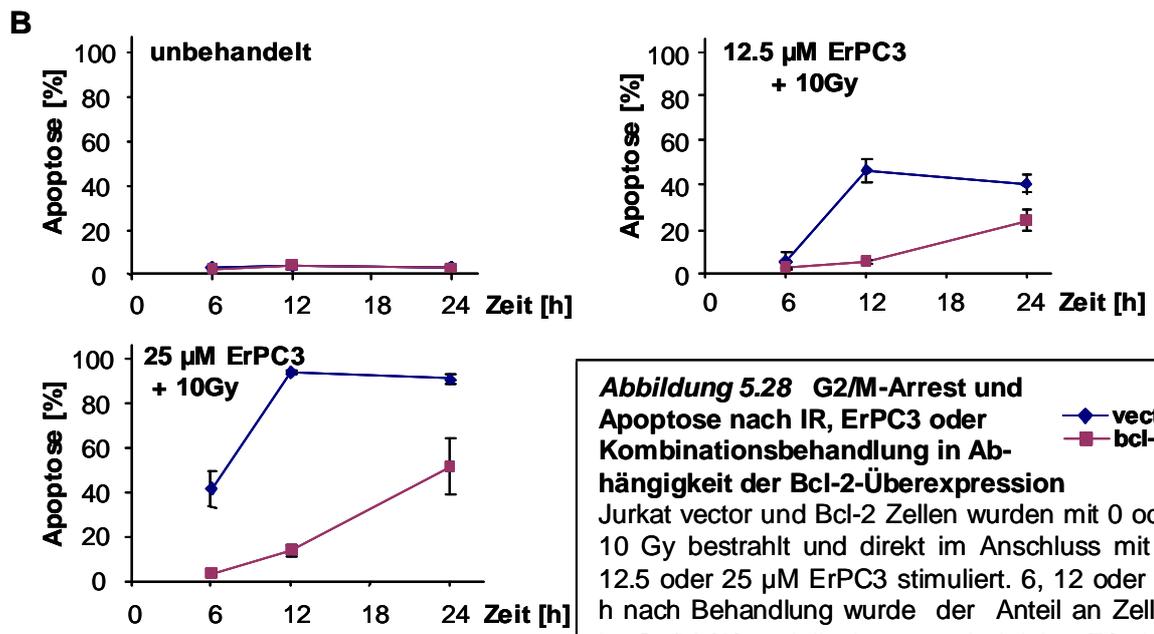
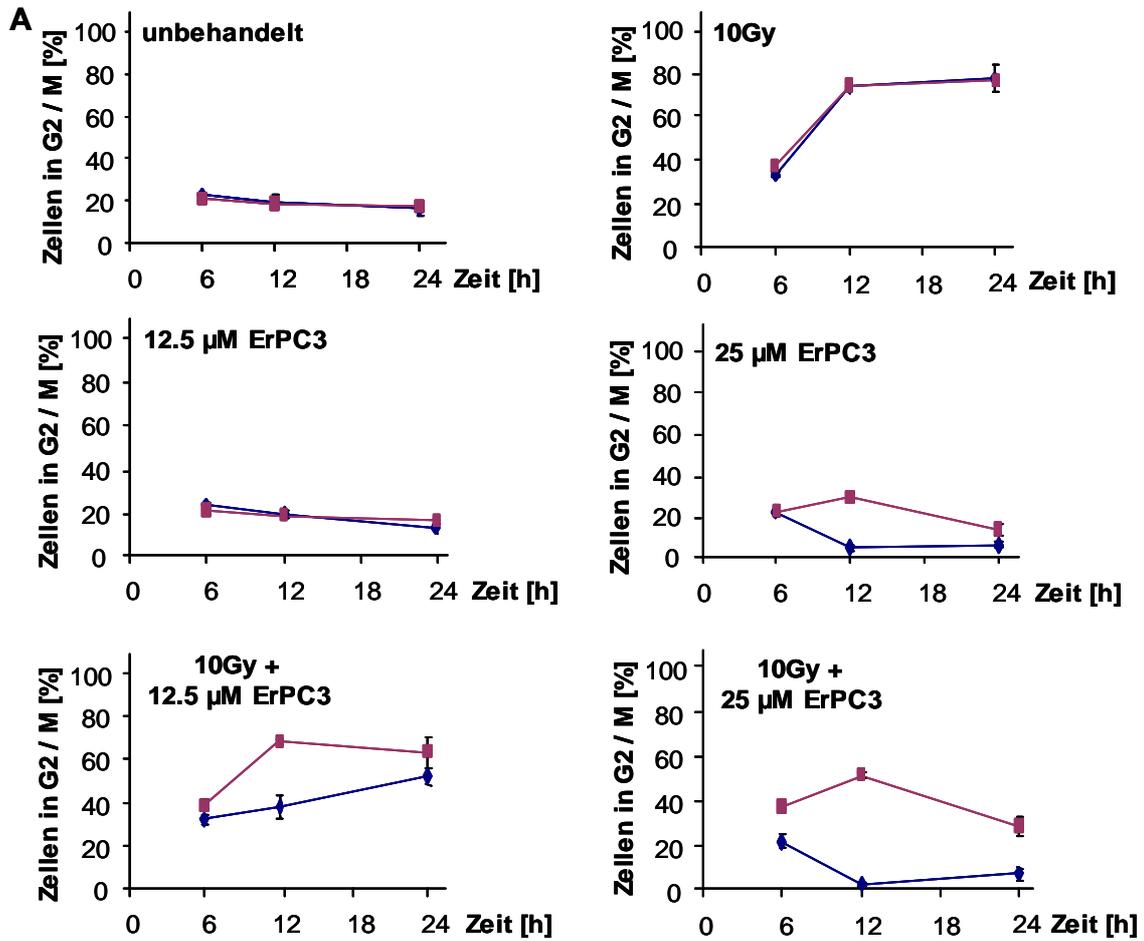


Abbildung 5.28 G2/M-Arrest und Apoptose nach IR, ErPC3 oder Kombinationsbehandlung in Abhängigkeit der Bcl-2-Überexpression
 Jurkat vector und Bcl-2 Zellen wurden mit 0 oder 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit 0, 12,5 oder 25 µM ErPC3 stimuliert. 6, 12 oder 24 h nach Behandlung wurde der Anteil an Zellen in G2/M (A) und die Apoptose-Induktion (B) über Nicoletti-Färbung im FACS bestimmt.

Die Daten zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit entsprechender Standardabweichung.

5.3.7 ErPC3 und kombinierte Behandlung induzieren hocheffizient Apoptose in Bak-positiven JCAM

Eine partielle Ausschaltung des mitochondrialen Zelltodwegs durch Bcl-2-Überexpression konnte die Apoptose-Induktion durch ErPC3 sowie kombinierte Behandlung zwar hemmen, aber nach einer gewissen Zeitverzögerung nicht mehr aufhalten. Es blieb nun zu klären, wie die Umstände aussehen, wenn der Apoptoseweg übers Mitochondrium durch eine Fehlen von Bax und Bak vollständig geblockt wird.

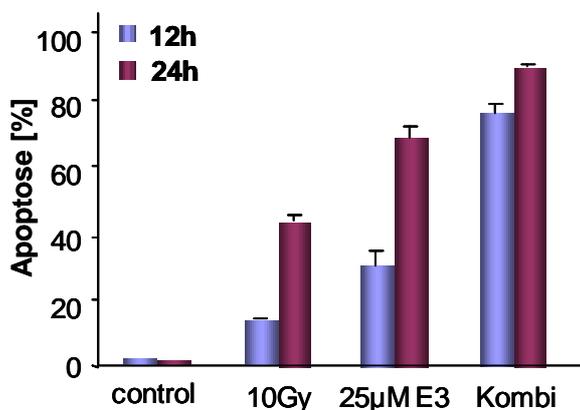


Abbildung 5.29 Apoptose-Induktion nach IR, ErPC3 und kombinierter Behandlung in Bak-positiven JCAM

Bak-positive JCAM Zellen wurden mit 0 oder 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit 0 oder 25 µM ErPC3 behandelt. 6 bzw. 12 h nach Behandlung wurden die Apoptoseraten über Nicoletti-Färbung im FACS ermittelt. Die Daten zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.

Zunächst wurde untersucht, ob ErPC3 effizient Apoptose in JCAM auslösen kann und die Wirkung von Strahlung entsprechend verstärkt. Dazu wurden Bak-positive JCAM mit 10 Gy bestrahlt, 25 µM ErPC3 stimuliert oder der kombinierten Behandlung unterzogen. Anschließend wurde die Apoptoserate 12 und 24 h nach Behandlung über Nicoletti-Färbung im FACS bestimmt. Im Gegensatz zu den Jurkat vector Zellen zeigten sich die Bak-positiven Zellen keineswegs resistent gegenüber strahleninduzierter Apoptose, sondern sprachen bereits innerhalb von 12 h auf die Bestrahlung mit 10 Gy an (Abbildung 5.29). Des weiteren waren die Zellen sehr sensitiv gegenüber ErPC3 und der kombinierten Behandlung. Nach 12 h war der Kombinationseffekt sehr ausgeprägt und der erhaltene Wert für die Apoptose-Induktion überragte eine Aufsummation der prozentualen Werte beider Einzelbehandlungen (Abbildung 5.29). 24 h nach kombinierter Behandlung war dieser Effekt aufgrund des überaus guten Ansprechens beider Einzelbehandlungen praktisch nicht mehr zu beobachten.

5.3.8 Das Fehlen von Bax und Bak blockt die Wirkung der Kombinationsbehandlung fast vollständig

5.3.8.1 Der Einfluss des defekten mitochondrialen Zelltodwegs auf die Apoptose-Induktion nach Stimulation mit ErPC3 oder kombinierter Behandlung

Nachdem auch im Zellsystem der JCAM erfolgreich Apoptose nach ErPC3 induziert werden konnte und außerdem ein sehr guter Kombinationseffekt von Bestrahlung und ErPC3 zu beobachten war, wurde im folgenden untersucht, was das Ausschalten des mitochondrialen Zelltodwegs in den Bak-negativen Zellen für die kombinierte Behandlung mit sich bringt. Daher wurden Bak-positive und Bak-negative Zellen bestrahlt, mit ErPC3 stimuliert oder kombiniert behandelt. Nach 12 und 24 h wurde die Apoptoserate über Nicoletti-Färbung im FACS bestimmt.

Aus Abbildung 5.30 geht klar hervor, dass die durch Bestrahlung, ErPC3 oder kombinierte Behandlung in Bak-positiven JCAM ausgelöste Apoptose in den Bak-defizienten JCAM fast komplett verhindert wurde. Selbst zum Zeitpunkt 24 h wurden nach kombinierter Behandlung aus 10 Gy und 25 μ M ErPC3 maximale Apoptoseraten von lediglich ca. 10% erreicht (Abbildung 5.30). Die Ausführung des mitochondrialen Zelltodwegs scheint damit unabdingbar zu sein für die Exekution der Apoptose nach Bestrahlung, ErPC3 und kombinierter Behandlung, zumindest in diesem Zellsystem.

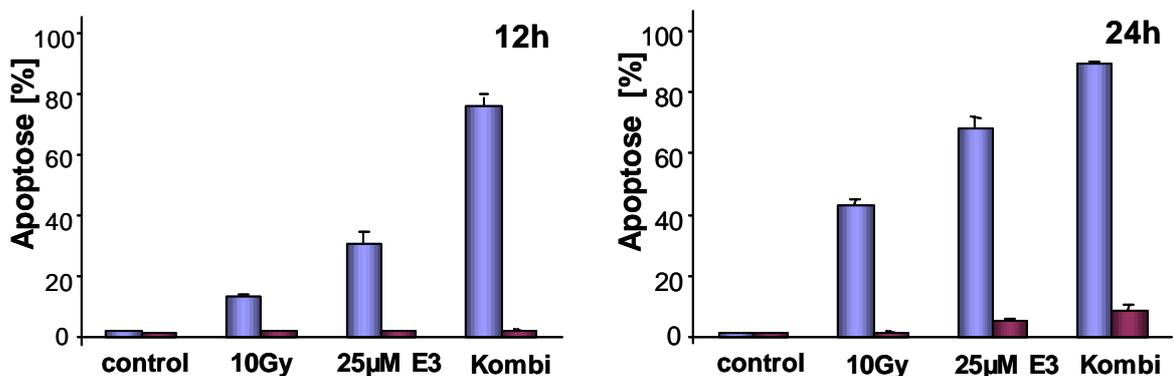


Abbildung 5.30 Apoptose nach IR, ErPC3 und kombinierter Behandlung in Abhängigkeit vom mitochondrialen Zelltodweg

■ JCAM Bak-positiv
■ JCAM Bak-negativ

Bak-positive und -negative JCAM wurden mit 0 oder 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit 0 oder 25 μ M ErPC3 stimuliert. 12 oder 24 h nach Behandlung wurde der Anteil apoptotischer Zellen über Nicoletti-Färbung im FACS bestimmt.

Die Daten zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit entsprechender Standardabweichung.

5.3.9 Veränderungen pro- und anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine nach Kombinationsbehandlung in Bak-positiven und Bak-negativen JCAM

Mit den vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in den Bak-negativen JCAM durch den Ausfall des Mitochondriums die Apoptose-Induktion nach kombinierter Behandlung vollständig geblockt werden konnte, was mit einer fehlenden Aktivierung der Caspasen einherging. Offen bleibt jedoch die Frage, ob durch die Bax-Bak-Defizienz auch Signalwege oberhalb des Mitochondriums beeinflusst werden könnten. In den Jurkat Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass Überexpression von Bcl-2 die Expressionslevel bzw. Abbauraten mancher Bcl-2-Proteine veränderte. Daher war es von Interesse, den Status verschiedener pro- und anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine in den Bak-negativen und Bak-positiven JCAM nach kombinierter Behandlung im Western Blot zu vergleichen.

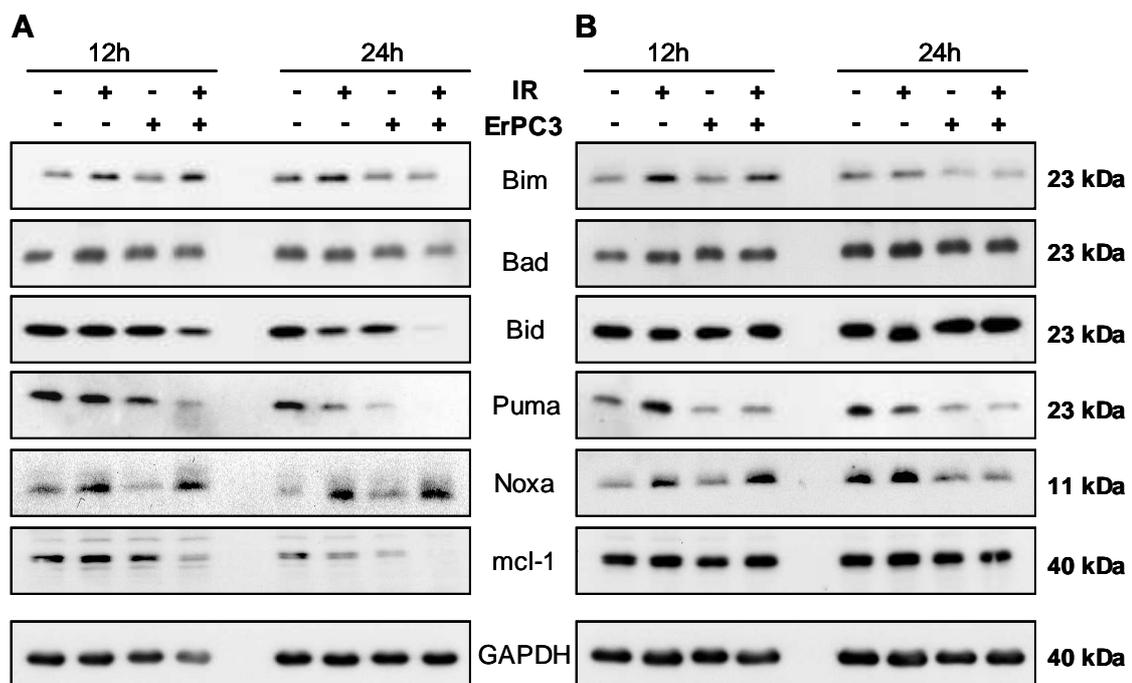


Abbildung 5.32 Änderungen verschiedener pro- und anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine in Abhängigkeit der Bax-Bak-Defizienz

Bak-positive und -negative JCAM wurden mit 0 oder 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit 0 oder 25 μM ErPC3 stimuliert. 12 oder 24 h nach Behandlung wurden die Zellen lysiert und der Status verschiedener pro- und anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine im WB untersucht. Die Daten zeigen repräsentative Blots. Als Ladekontrolle wurde GAPDH eingesetzt.

(A) Bak-positive JCAM

(B) Bak-negative JCAM

Die für die Bak-positiven JCAM erhaltenen Daten stimmten insgesamt sehr gut mit den Daten der Jurkat vector Zellen überein. Während Bad unverändert blieb, nahm Bim nach Bestrahlung und kombinierter Behandlung zu (Abbildung 5.32A). Puma und Mcl-1 nahmen

nach Bestrahlung, ErPC3 und Kombinationsbehandlung zunehmend ab, während Noxa ebenso wie Bim nach IR und kombinierter Behandlung deutlich induziert wurde (Abbildung 5.32A). Außerdem wurde Bid nach 12 h bei kombinierter Behandlung sowie nach 24h durch IR, ErPC3 und die Kombinationsbehandlung gespalten. Die Bak-negativen JCAM zeigten sich identisch mit den Bak-positiven JCAM was die Proteinlevel von Bad, Bim, Puma und Noxa betrifft. Allerdings wurden weder Bid gespalten noch Mcl-1 reduziert (Abbildung 5.32B). Dies spricht sehr dafür, dass Bid in den Bak-positiven Zellen durch einen Verstärkerloop über das Mitochondrium (über retrograde Spaltung von Caspase 8 durch Caspase 3) und nicht mittels direkter Caspase 8-Aktivierung gespalten wird.

Caspase 8 war in den Bak-negativen Zellen nicht aktiv. Erstaunlich war auch, dass Mcl-1 als Doppelbande erscheint, was auf eine mögliche Phosphorylierung des Proteins hindeutet.

Die Beobachtung, dass Bid und Mcl-1 nur in Bak-positiven JCAM gespalten werden, deutet auf einen Caspasen-vermittelten Effekt hin. Von Mcl-1 ist außerdem bekannt, dass es durch Caspasen gespalten werden kann.

Um Klarheit zu erhalten, ob es sich bei Mcl-1 um einen Caspasen-vermittelten Abbau und bei Bid um eine retrograd vermittelte Spaltung handelt, wurden Bak-positive JCAM 45 min vor Behandlung mit dem Pan-Caspasen-Inhibitor zVAD vorinkubiert und der Status der Proteine 12 und 24 h nach Behandlung im Western Blot analysiert.

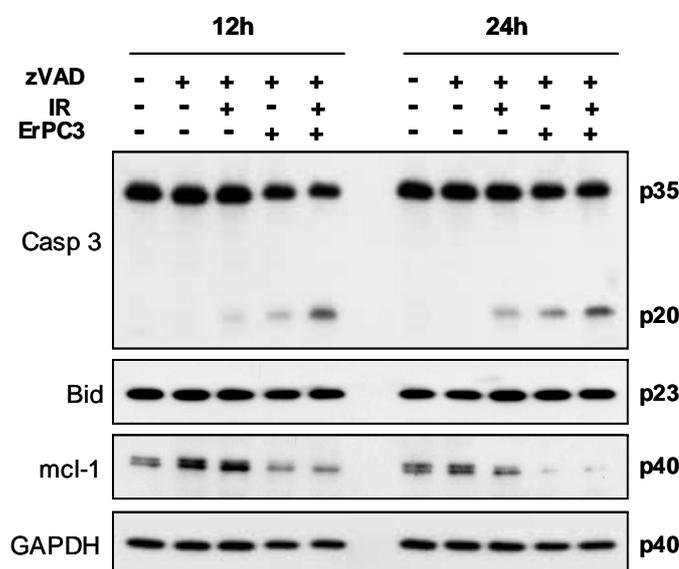


Abbildung 5.33 Status von Bid und Mcl-1 nach kombinierter Behandlung in Abhängigkeit aktiver Caspasen

Bak-positive JCAM wurden mit 20 μ M zVAD-fmk Pan-Caspasen-Inhibitor inkubiert und 45 min später mit 10 Gy bestrahlt, 25 μ M ErPC3 stimuliert oder kombinierter Behandlung unterzogen. 12 oder 24 h nach Behandlung wurden die Zellen lysiert und der Status von Caspase 3, Bid und Mcl-1 im WB untersucht.

Die Daten zeigen repräsentative Blots. Als Ladekontrolle wurde GAPDH eingesetzt.

Als Kontrolle im Western Blot für die Funktionsfähigkeit des Caspasen-Inhibitors wurde die Spaltung der Caspase 3 untersucht. Nach Behandlung mit IR, ErPC3 oder der Kombination aus beiden wurde lediglich das unvollständig prozessierte inaktive p20-Fragment gebildet (Abbildung 5.33). Wie aus Abbildung 5.33 klar hervorgeht, wurde die Spaltung von Bid tatsächlich nur durch Caspasen bedingt, da sie nach Hemmung der Caspasen vollständig unterbunden wurde. Überraschenderweise war Mcl-1 auch nach Hemmung der Caspasen weiter rückläufig, was bedeutet, dass der Rückgang von Mcl-1 nicht auf eine Spaltung durch Caspasen zurückzuführen ist (Abbildung 5.33).

5.3.10 Puma wird sehr früh nach Behandlung induziert und später abgebaut

Aufgrund der Beobachtung dass Puma durch ErPC3 und kombinierte Behandlung in T98G Zellen induziert wurde, war es sehr überraschend, dass in den Jurkat und JCAM Zellen durchweg ein Rückgang des Proteins nach Behandlung zu beobachten war. Da die Jurkat-T-Lymphomzellen aber insgesamt viel schneller auf den Wirkstoff reagierten, kam die Vermutung auf, dass Puma evtl. sehr viel früher hochreguliert werden könnte und nach entfalteter Wirkung schnell wieder abgebaut wird. Daher wurden nun Lysate zu früheren Zeitpunkten (3 und 6 h) nach 10 Gy, 25 μ M ErPC3 oder kombinierter Behandlung durchgeführt.

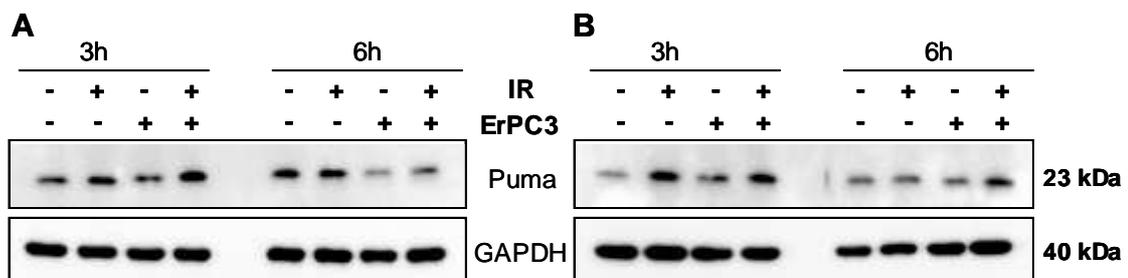


Abbildung 5.34 Status von Puma nach IR, ErPC3 und Kombinationsbehandlung zu sehr frühen Zeitpunkten nach Stimulation

Bak-positive und -negative JCAM wurden mit 0 oder 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit 0 oder 25 μ M ErPC3 stimuliert. 3 oder 6 h nach Behandlung wurde der Zustand von Puma im Western Blot analysiert.

Die Daten zeigen repräsentative Blots. Als Ladekontrolle diente der Level an GAPDH.

(A) Bak-positive JCAM

(B) Bak-negative JCAM

Interessanterweise wurde Puma tatsächlich in beiden Zelllinien zu frühen Zeitpunkten (3 h) nach Bestrahlung und kombinierter Behandlung induziert (Abbildung 5.34). Bereits nach 6 h war dieser Effekt jedoch wieder rückläufig und in den Bak-positiven JCAM wurde Puma sogar schon abgebaut.

5.3.11 Veränderungen oberhalb des Mitochondriums

Überraschenderweise hatten sich in den Jurkat vector und Bcl-2 Zellen Unterschiede im PKB/Akt-Weg oberhalb des Mitochondriums ergeben. Bei Bcl-2-Überexpression wurden die Dephosphorylierung von P-Akt und P-FKHRL1 sowie der Abbau von unphosphoryliertem Akt gehemmt. Deshalb sollte nun untersucht werden ob sich das unterschiedliche Verhalten der Zellen auch in den Bak-positiven und Bak-negativen Zellen fortsetzt und damit abhängig von einem funktionellen Mitochondrium ist. Dazu wurde der Phosphorylierungsstatus der Proteine Akt und FKHR im Western Blot untersucht.

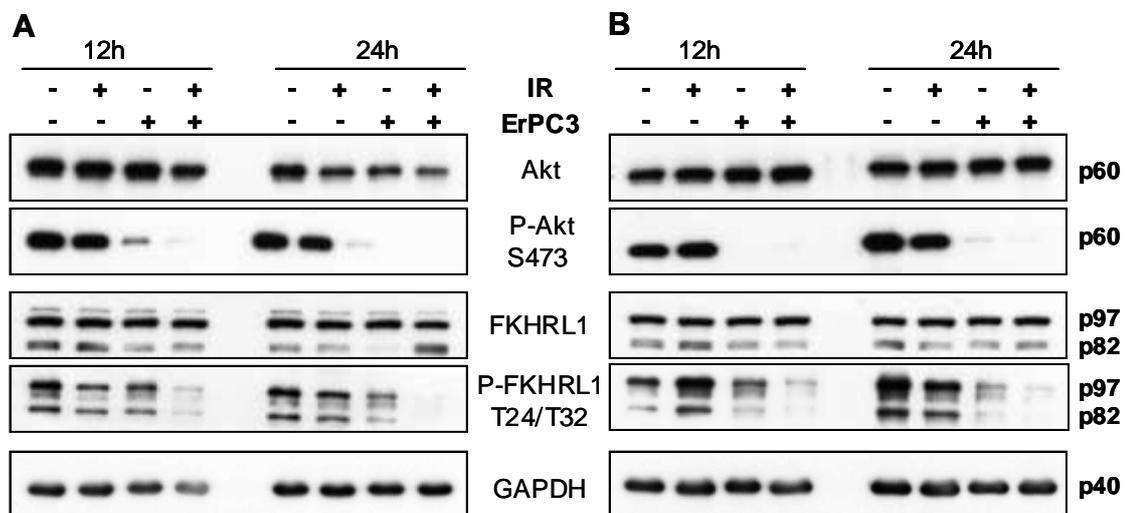


Abbildung 5.35 Phosphorylierungsstatus von Akt und FKHR nach IR, ErPC3 und Kombinationsbehandlung in Bak-positiven und -negativen JCAM

Bak-positive und -negative JCAM wurden mit 0 oder 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit 0 oder 25 μ M ErPC3 stimuliert. 12 oder 24 h nach Behandlung wurde die Aktivierung von PKB/Akt und FKHR im Western Blot analysiert.

Die Daten zeigen repräsentative Blots. Als Ladekontrolle diente der Level an GAPDH.

(A) Bak-positive JCAM

(B) Bak-negative JCAM

Vergleichbar mit den für Jurkat vector erhaltenen Daten nahm in den Bak-positiven JCAM die Expression an unphosphoryliertem Akt nach Behandlung mit 10 Gy, 25 μ M ErPC3 oder der Kombination aus beiden ab (Abbildung 5.35A). Des Weiteren wurde das Protein nach Bestrahlung mit 10 Gy leicht sowie nach Simulation mit ErPC3 und Kombinationsbehandlung fast vollständig an S473 dephosphoryliert. Während die Expression von FKHRL1 unter Behandlung nicht beeinflusst wurde, nahm die an T24/T32 phosphorylierte Form des Proteins nach Einzelbehandlung mit IR oder ErPC3 leicht und nach Kombinationsbehandlung sehr stark ab (Abbildung 5.35A). In den Bak-negativen JCAM wurde P-Akt an S473 genauso nach ErPC3 und kombinierter Behandlung dephosphoryliert wie in Bak-positiven Zellen, allerdings blieb der Expressionslevel von Akt selbst völlig unbeeinflusst von der Stimulation der Zellen (Abbildung 5.35B). FKHR blieb unverändert und die Phosphorylierung

an T24/T32 sank vergleichbar mit den Bak-positiven Zellen nach Behandlung ab. Aus diesen Ergebnissen erschließt sich die Vermutung, dass der Akt-Abbau von einem intakten Mitochondrium abhängt, während die Dephosphorylierung von P-Akt und P-FKHRL1 unabhängig von der Funktion des Mitochondriums an sich zu sein scheint, aber -wie bereits unter 5.3.5 gemutmaßt- regulatorisch Bcl-2 unterstellt sein könnte.

5.3.12 Bax-Bak-Defizienz und ihr Einfluss auf den Zellzyklus

Die Zellzyklusuntersuchungen in den Jurkat vector und Bcl-2 Zellen ergaben eine Abhängigkeit des Zellzyklus von der Bcl-2 Expression: Während die Level an Rb und beider phosphorylierten Formen des Proteins in vector Zellen abnahmen, blieben sie bei Bcl-2-Überexpression unbeeinflusst (vgl. Abbildung 5.27). Des weiteren ergaben sich Unterschiede bezüglich des Arrestverhaltens der Zellen in G2/M nach Bestrahlung und kombinierter Behandlung. Daher war von Interesse, herauszufinden, ob sich diese Unterschiede auch zwischen Bak-positiven und Bak-negativen JCAM ergeben. Dazu wurden Bak-positive und Bak-negative JCAM bestrahlt, mit ErPC3 stimuliert oder kombiniert behandelt. Nach 12 oder 24 h wurden die Zellen entweder lysiert und der Status von Rb im Western Blot bestimmt oder der Anteil an Zellen in G2/M über Nicoletti-Färbung im FACS ermittelt.

In den Bak-positiven JCAM nahm der Level an Rb und der phosphorylierten Form P-Rb S795 nach ErPC und kombinierter Behandlung ab (Abbildung 5.36A), während in den Bak-negativen Zellen keine nennenswerten Veränderungen beobachtet werden konnten (Abbildung 5.36B). Durch Bestrahlung mit 10 Gy arretierten die Bak-positiven und Bak-negativen JCAM in der G2/M-Phase des Zellzyklus, wobei der Arrest in den Bak-negativen Zellen deutlich höher ausfiel und sich im Gegensatz zu den Bak-positiven Zellen auch mit der Zeit weiter massiv verstärkte (Abbildung 5.36C). Stimulation mit 25 μ M ErPC3 erzeugte in keiner der beiden Zelllinien einen Arrest. Kombinierte Behandlung aus IR und ErPC3 hingegen führte zu keinem Arrest der Bak-positiven Zellen, während bei den Bak-negativen Zellen ein G2/M-Arrest ausgelöst wurde, der mit der Zeit auch weiter zunahm (Abbildung 5.36C). Insgesamt stimmen die Daten also recht gut mit den Ergebnissen aus den Jurkat-Versuchen überein, mit dem Unterschied, dass die Bak-Bax-defizienten Zellen auch 24 h nach kombinierter Behandlung nicht mehr aus dem Arrest heraus in die Apoptose gingen.

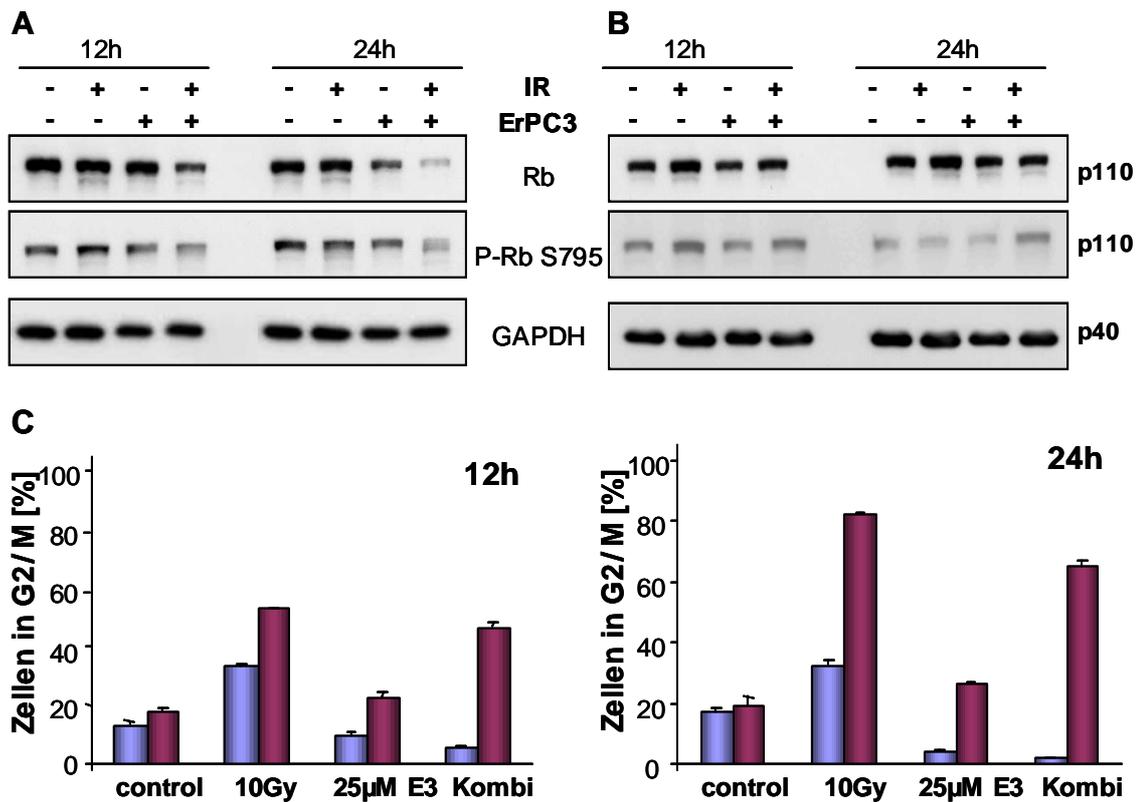


Abbildung 5.36 Status des Zellzyklusproteins Rb sowie G2/M-Arrest nach IR, ErPC3 und kombinierter Behandlung in Bak-positiven und -negativen JCAM

Bak-positive und -negative JCAM wurden mit 0 oder 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit 0 oder 25 µM ErPC3 stimuliert. 12 oder 24 h nach Behandlung wurde der Status von Rb im Western Blot untersucht sowie der Anteil an Zellen in G2/M über Nicoletti-Färbung im FACS bestimmt.

Die Daten zeigen repräsentative Blots mit GAPDH als Ladekontrolle (A und B) oder Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung (C).

(A) Western Blots zum Rb-Status in Bak-positiven JCAM

(B) Western Blots zum Rb-Status in Bak-negativen JCAM

(C) G2/M Arrest nach Nicoletti-Färbung im FACS

■ JCAM Bak-positiv
■ JCAM Bak-negativ

5.3.13 Verifizieren des JCAM-Zellsystems durch siRNA-Versuche

Die bisherigen Versuche in den JCAM indizierten, dass Bak in Zellen ohne Bax für die Apoptose nach kombinierter Behandlung aus Bestrahlung und ErPC3 essentiell ist. Allerdings waren die Bak-positiven und Bak-negativen JCAM Zellen unabhängig voneinander entstanden und nicht durch Retransfektion des Bak-negativen Klons mit Bak. Um nachzuweisen, dass die in den JCAM-Bak-negativen Zellen aufgetretenen Unterschiede zu den Bak-positiven Zellen tatsächlich auf das Fehlen von Bak zurückzuführen sind und nicht durch eventuelle andere in der Zelllinie entstandene Mutationen, wurde Bak durch siRNA in den Bak-positiven Zellen stillgelegt und die Effekte auf Apoptose und mitochondriales Membranpotential nach kombinierter Behandlung überprüft.

Dazu wurden die Zellen mit 1000 nM Bak-siRNA über Elektroporation transfiziert. Als Kontrolle wurden parallel Zellen mit non targeting siRNA transfiziert sowie ohne siRNA dem Elektroporationsprozedere unterzogen. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen aufgeteilt und mit 0 oder 10 Gy bestrahlt sowie 0 und 25 μ M ErPC3 stimuliert. Außerdem wurde ein Teil der Zellen lysiert, um die Bak-Expression im Western Blot und somit die Wirkung der siRNA zu überprüfen. Ein weiterer Teil der Zellen wurde mit PI-Lösung angefärbt und im FACS auf Viabilität überprüft, um den Anteil der Zellen zu ermitteln, die durch die Elektroporation geschädigt wurden. Mit den behandelten Zellen wurden 24 h nach Bestrahlung, ErPC3-Gabe oder kombinierter Behandlung Messungen zur Apoptose (Nicoletti-Färbung) und zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (TMRE-Färbung) im FACS durchgeführt.

Die Bak-Expression wurde nicht durch das Elektroporationsgeschehen oder durch die non targeting siRNA beeinflusst (Abbildung 5.37A).

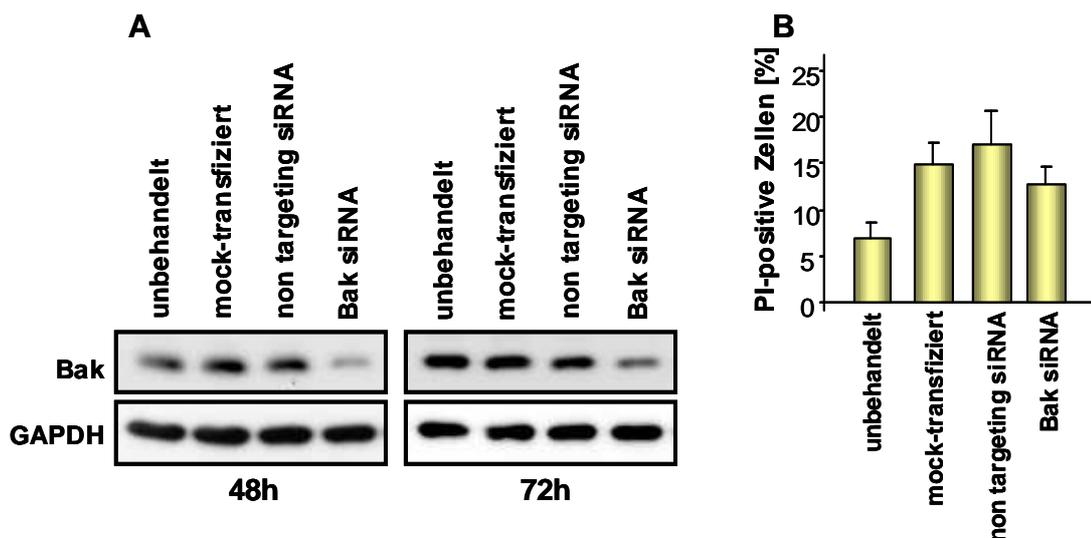


Abbildung 5.37 Bak-Expression nach Transfektion mit siRNA und „basaler Zelltod“ im Versuch

Bak-positive JCAM wurden leer (mock-transfiziert), mit non targeting siRNA oder Bak siRNA elektroporiert. 48 h nach Elektroporation wurde ein Teil der Zellen lysiert und die Expression von Bak im Western Blot untersucht. Mit einem weiteren Teil der Zellen wurde über PI-Färbung im FACS der Anteil toter Zellen vor eigentlichem Versuchsbeginn bestimmt.

Die Daten zeigen repräsentative Blots mit GAPDH als Ladekontrolle (A) oder Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung (B).

(A) Western Blots zur Bak-Expression 48 und 72 h nach Elektroporation

(B) Tote Zellen 48 h nach Elektroporation

Transfektion der Zellen mit Bak siRNA hingegen führte zu einer effizienten Herunterregulation der Bak-Expression nach 48 h. Daher wurde dieser Zeitpunkt für die Behandlung der Zellen ausgewählt. Nach 72 h, dem Zeitpunkt der FACS-Messungen nach Behandlung, stieg die Bak-Expression wieder etwas an, war aber im Vergleich zu den Kontrollen immer

noch deutlich reprimiert (Abbildung 5.37A). Abbildung 5.37B zeigt den Anteil toter Zellen, die durch die Elektroporation und damit verbundene Versuchsabläufe entstanden sind. Dabei wurden jeweils zwischen 12-17% Zellen verloren. Die Tatsache, dass auch in den nicht elektroporierten Zellen ein Verlust von 6.5% Zellen aufgetreten ist, könnte daran liegen, dass

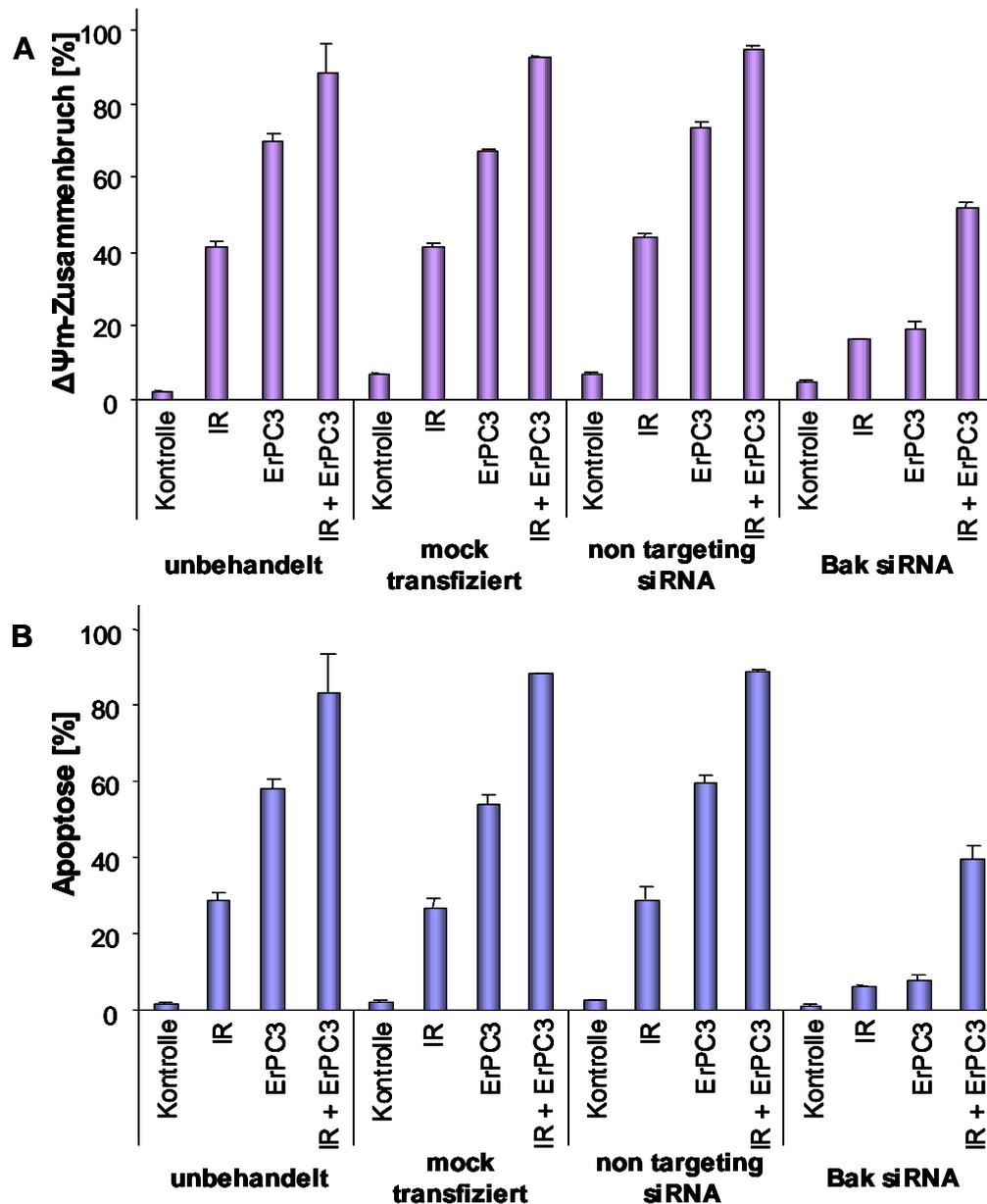


Abbildung 5.38 Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und Apoptose-Induktion durch IR, ErPC3 und kombinierte Behandlung in Bak-positiven JCAM nach Transfektion mit Bak siRNA

Bak-positive JCAM wurden leer (mock-transfiziert), mit non targeting siRNA oder Bak siRNA elektroporiert. 48 h nach Elektroporation wurden die Zellen mit 0 oder 10 Gy bestrahlt und anschließend mit 0 oder 25 μ M ErPC3 stimuliert. 24 h später wurde der Anteil an Zellen mit $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch (A) über TRME-Färbung sowie die Apoptoserate (B) über Nicoletti-Färbung im FACS ermittelt. Die Daten zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit entsprechender Standardabweichung.

diese Zellen während des gesamten Transfektionsablaufs denselben Bedingungen unterlagen wie die transfizierten (ca. 1h bei RT, starke Ankonzentrierung der Zellen).

Wie aus Abbildung 5.38 hervorgeht, beeinflusste die Elektroporation an sich (mock transfiziert) sowie Transfektion mit non targeting siRNA den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und die Apoptose-Induktion nach IR, ErPC3 oder kombinierter Behandlung nicht. In beiden Fällen wurde nach jeder Behandlung genauso viel $\Delta\psi_m$ -Zusammenbruch bzw. Apoptose induziert wie in der untransfizierten Kontrolle. Die Transfektion mit der Bak-siRNA inhibierte jedoch den $\Delta\psi_m$ -Zusammenbruch und die Apoptose-Induktion massiv (Abbildung 5.38 A und B). Die Einzelwirkungen von Bestrahlung und ErPC3 konnten fast vollständig geblockt werden, bei kombinierter Behandlung konnte die Effizienz um immerhin ca. 50% gesenkt werden. Ein vollständiges Blockieren der kombinierten Wirkung aus ErPC3 und IR wäre aufgrund der ausgezeichneten Effizienz der Behandlung nur bei einem 100%igen Silencen von Bak möglich, was aber durch die siRNA-Technologie nahezu nie erreicht werden kann. Damit ist klar, dass die in Bak-positiven und Bak-negativen beobachteten Unterschiede nach kombinierter Behandlung tatsächlich durch Abhängigkeit von Bak bedingt sind.

5.4 Kombinationseffekte von TRAIL und Bestrahlung in Jurkat-Lymphomzellen

In den vergangenen Kapiteln konnte die beachtliche Kombinationswirkung von ionisierender Strahlung und den Alkylphosphocholinen ErPC bzw. ErPC3 aufgezeigt werden. Dabei ist von besonderer Bedeutung, dass mit ErPC bzw. ErPC3 eine Substanzklasse zur Verfügung steht, die den mitochondrialen Zelltodweg unabhängig von p53 aktivieren kann. Somit steht ein optimaler Ergänzungspartner für ionisierende Strahlung in Zellsystemen zur Verfügung, die durch verschiedene Mutationen (wie u.a. in p53) gegen strahleninduzierte Apoptose resistent sind (z.B. T98G oder Jurkat vector Zellen). Allerdings scheitern ErPC und ErPC3 sobald der mitochondriale Zelltodweg vollständig blockiert wird, wie z.B. durch Fehlen von Bak und Bax. Hier wird eine Substanz benötigt, die unabhängig vom mitochondrialen Zelltodweg wirkt und ihren Effekt z.B. allein über den extrinsischen Todesrezeptorweg ausübt. Als geeignete Kandidaten hierfür kommen der Zelltodrezeptorligand TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) sowie der gegen den Zelltodrezeptor 2 gerichtete agonistische Antikörper ETR-2 in Frage. Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen *in vitro* als

auch im Xenograftmodell zeigten eine verbesserte Antitumorwirkung der Kombination aus TRAIL bzw. ETR-2 und Bestrahlung (Belka et al., 2001; Marini et al., 2006; Marini et al., 2003). Der Kombinationseffekt war dabei abhängig von einem intakten Todesrezeptor-Apoptosesignalweg. Weiterhin wurde eine komplexe Abhängigkeit der TRAIL-Wirkung von Proteinen der Bcl-2 Familie mit regulatorischer Wirkung auf den mitochondrialen Apoptosesignalweg (Bcl-2, Bax) beschrieben. Dabei wurde kontrovers diskutiert, ob der Verstärkerloop, der am Mitochondrium durch das Protein Bid eingeleitet wird, für die TRAIL-vermittelte Apoptose benötigt wird oder nicht, da in einigen Fällen Bcl-2 Überexpression die TRAIL-induzierte Apoptose verhinderte (Fulda et al., 2002; Munshi et al., 2001; Rokhlin et al., 2001) und in anderen Fällen wiederum nicht beeinflusste (Rudner et al., 2001b; Walczak et al., 2000). Um zum einen mehr über diese potentielle Abhängigkeit vom mitochondrialen Weg zu erfahren und zum anderen weitere Details über die kombinierte Wirkung von TRAIL und Bestrahlung zu erhalten, wurde am Jurkat-Lymphomzell-Modell die Bedeutung von proapoptotischen Bak für die Wirksamkeit der Kombination aus TRAIL und ionisierender Strahlung untersucht. Dazu wurde erneut das Zellpaar aus Bak-positiven und Bak-negativen JCAM eingesetzt.

5.4.1 TRAIL und ETR-2 induzieren effizient und scheinbar unabhängig vom mitochondrialen Zelltodweg Apoptose in Bak-positiven und -negativen JCAM

Bevor mit den eigentlichen Versuchen begonnen wurde, musste zunächst der Expressionsstatus des TRAIL-Rezeptor 1 (TR1) und TRAIL-Rezeptor 2 (TR2) überprüft werden. Dazu wurden zum einen die Gesamtexpression der Rezeptoren über Lysate im Western Blot bestimmt und zum anderen über FACS-Analysen die Oberflächenexpression beider Rezeptoren ermittelt. Für die FACS-Versuche wurden unbehandelte Bak-positive und Bak-negative JCAM sowie HCT-116 wt Zellen, von denen bekannt ist, dass sie sowohl TR1 als auch TR2 an der Oberfläche exponieren, mit Phycoerythrin-gelabelten TR1- und TR2-Antikörpern markiert und die Fluoreszenzintensität im FL2H-Kanal gemessen. Als Negativ-Isotypenkontrolle wurden die Zellen mit Phycoerythrin-markiertem IgG inkubiert.

Bei allen drei verwendeten Zelllinien lag die Kurve der Isotypenkontrolle exakt über der Kurve der ungefärbten Zellen (control) (Abbildung 5.39 A-C). In der Positivkontrolle HCT-116 wt war ein deutlicher Rechtsshift für beide Rezeptoren erkennbar, indikativ für ihre Expression an der Zelloberfläche (Abbildung 5.39C). Sowohl in Bak-positiven als auch Bak-negativen JCAM wurde kein TR1 an der Zelloberfläche exponiert, die erhaltene Kurve lag

direkt über der unbehandelten Zellen bzw. der Isotypenkontrolle (Abbildung 5.39 A und B). Allerdings besaßen beide Zelllinien TR2 an ihrer Oberfläche, wobei die Verteilung - angezeigt

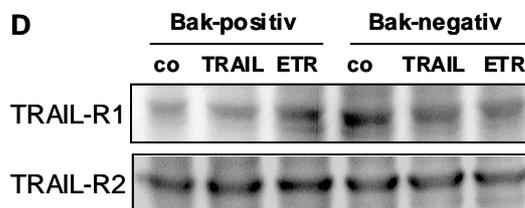
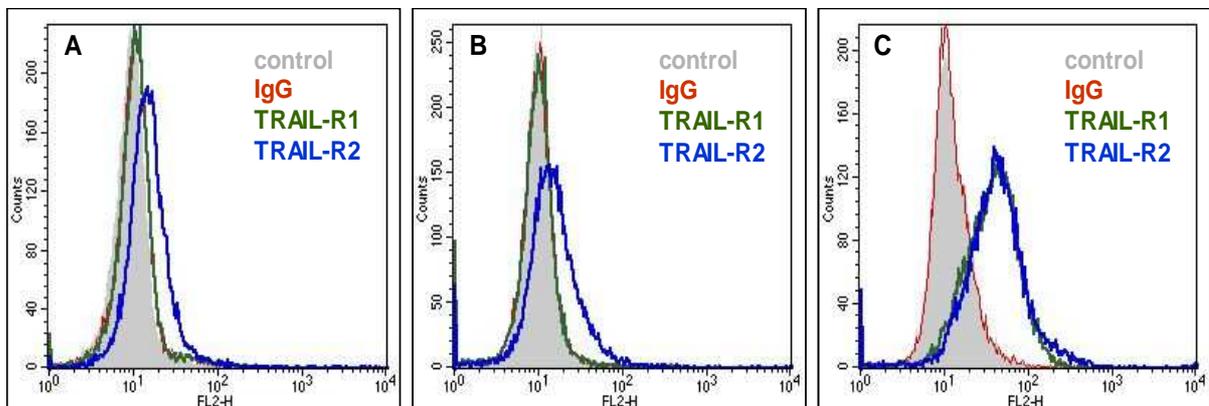


Abbildung 5.39 TRAIL-Rezeptor-Oberflächenexpression und TRAIL-Rezeptor-Gesamtexpression in Bak-positiven und Bak-negativen JCAM

Bak-positive und -negative JCAM wurden auf ihre Oberflächenexpression des TRAIL-R1 und 2

sowie auf die zelluläre Expression der Rezeptoren untersucht. Für ersteres wurden unbehandelte Zellen mit rezeptorspezifischen Phycoerythrin-markierten Antikörpern gefärbt und danach im FACS analysiert. Für die zellulären Expressionsraten wurden unbehandelte sowie mit 10 ng/ml TRAIL oder 1 µg/ml ETR-2 stimulierte Zellen lysiert und mit rezeptorspezifischen Antikörpern wurde der Status des TRAIL-R1 und 2 im Western Blot analysiert. Die Daten zeigen repräsentative Originaldiagramme (A, B und C) der FACS-Analysen von drei unabhängigen Versuchen oder repräsentative Blots (D).

(A) Oberflächenexpression des TRAIL-R1 und 2 auf Bak-positiven JCAM

(B) Oberflächenexpression des TRAIL-R1 und 2 auf Bak-negativen JCAM

(C) Oberflächenexpression auf HCT-116 wt Zellen als Positivkontrolle

(D) Gesamtexpression des TRAIL-R1 und 2 in Bak-positiven und -negativen JCAM

durch einen flacheren aber breiteren Peak im FACS - in den Bak-negativen Zellen pro Zelle insgesamt inhomogener war.

Um zu überprüfen, ob die JCAM tatsächlich keinen TR1 besitzen oder ihn nur nicht permanent an ihrer Oberfläche exponiert haben, wurden außerdem von unbehandelten sowie mit 10 ng/ml TRAIL oder 1 µg/ml ETR-2 stimulierten Bak-positiven und -negativen JCAM Zelllysate hergestellt und die Gesamtexpression des TR1 und TR2 im Western Blot analysiert. In Übereinstimmung mit den FACS-Analysen erhielt man deutliche Signale für den TR2, allerdings konnte im WB auch der TR1 nachgewiesen werden (Abbildung 5.39D).

Nachdem nun feststand, dass die Zellen die theoretischen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Behandlung mit TRAIL und ETR-2 mitbringen, wurde das Ansprechen der Bak-positiven und -negativen JCAM auf Bestrahlung und Stimulation mit TRAIL und ETR-2 untersucht. Dazu wurden die Zellen mit 10 Gy bestrahlt, 10 ng/ml TRAIL oder 1 µg/ml ETR-2 stimuliert. Nach 24 h wurde die Apoptose-Induktion durch Behandlung über Nicoletti-

Färbung im FACS bestimmt. Bestrahlung mit 10 Gy führte in ca. 50% der Bak-positiven Zellen zur Apoptose, während diese in den Bak-negativen Zellen aufgrund des blockierten mitochondrialen Zelltodwegs vollständig inhibiert wurde (Abbildung 5.40). Stimulation mit TRAIL hingegen löste unabhängig vom Mitochondrium ca. 50-60% Apoptose aus, wobei in den Bak-negativen Zellen sogar etwas mehr Zelltod ausgelöst wurde. Beide Zelllinien sprachen ebenfalls auf die Behandlung mit ETR-2 an, überraschenderweise jedoch die Bak-negativen mit 41% deutlich besser als die Bak-positiven JCAM mit nur 15 % Apoptose-Induktion (Abbildung 5.40).

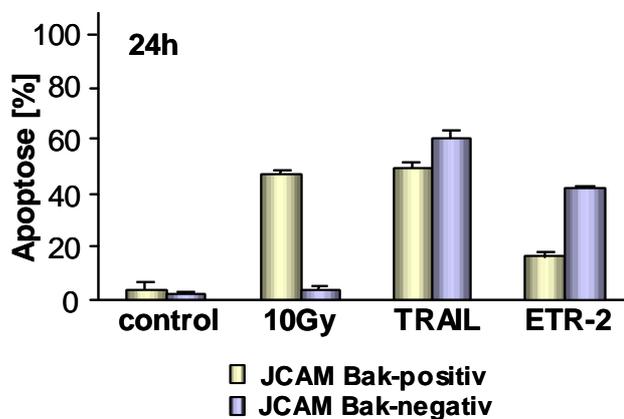


Abbildung 5.40 Apoptose-Induktion durch Bestrahlung, TRAIL und ETR-2 in Bak-positiven und Bak-negativen JCAM

Bak-positive und -negative JCAM wurden mit 10 Gy bestrahlt, mit 10 ng/ml TRAIL oder 1 µg/ml ETR-2 stimuliert. 24 h nach Behandlung wurde die Apoptose-Induktion über Nicoletti-Färbung im FACS ermittelt. Die Daten zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.

5.4.2 Die kombinierte Wirkung aus IR und TRAIL bzw. IR und ETR-2 ist zumindest teilweise abhängig vom Mitochondrium

In der Einzelbehandlung der JCAM Zellen mit TRAIL und ETR-2 schien die Wirkung völlig unabhängig von der Funktionsfähigkeit des mitochondrialen Zelltodwegs zu sein. Bestrahlung hingegen war vollständig auf einen intakten intrinsischen Zelltodweg angewiesen. Um herauszufinden, inwieweit der Kombinationseffekt aus beiden Behandlungen davon abhängig ist, wurden Bak-positive und -negative JCAM mit 0 oder 10 Gy bestrahlt und direkt mit Anschluss mit 0 oder 1 ng/ml TRAIL bzw. 0 oder 1 µg/ml ETR-2 stimuliert. Nach 24 h wurden über Zellzyklus-Analysen im FACS (Nicoletti-Färbung) die Apoptoseraten und der G2/M-Arrest nach den verschiedenen Behandlungen ermittelt. In beiden Zelllinien konnte ein Kombinationseffekt nach Bestrahlung plus Stimulation mit TRAIL oder ETR-2 nachgewiesen werden (Abbildung 5.41A). Aufgrund der sehr guten Einzelwirkung von TRAIL und Bestrahlung in den Bak-positiven JCAM konnte in der Kombination jedoch kein Apoptosewert erreicht werden, der einer Aufsummation beider Einzeleffekte gleich käme. Da ETR-2 im Vergleich zu TRAIL in diesen Zellen deutlich

schlechter wirkt, konnte hier in der Kombinationswirkung mit 66% Apoptose ein höherer Wert als durch Aufsummation der Einzeleffekte erzielt werden (Abbildung 5.41A). In den Bak-negativen Zellen wurde in beiden Kombinationsfällen ein um 5-10% höherer Apoptoselevel gemessen, als durch reine Addition der Einzelbehandlungen erzielt werden würde. Allerdings

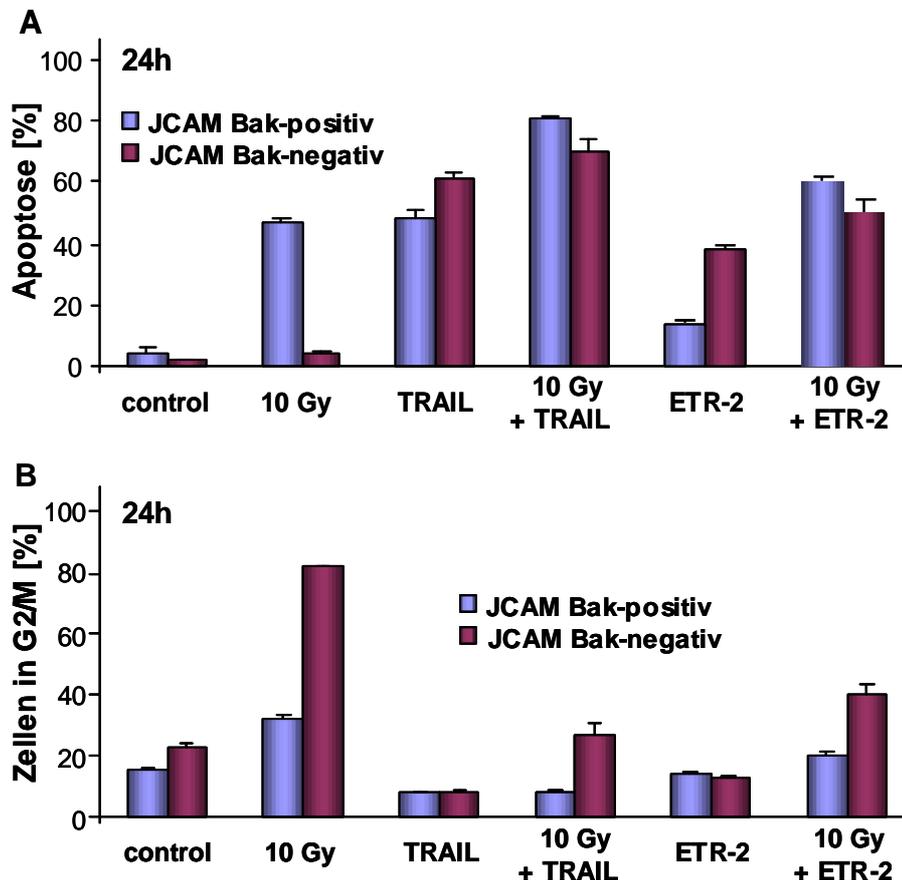


Abbildung 5.41 Apoptose-Induktion und G2/M-Arrest nach IR, TRAIL, ETR-2 und kombinierter Behandlung aus IR + TRAIL bzw. IR + ETR-2

Bak-positive und -negative JCAM wurden mit 10 Gy bestrahlt, 1 ng/ml TRAIL oder 1 µg/ml ETR-2 stimuliert oder der Kombination aus Bestrahlung und TRAIL sowie Bestrahlung und ETR-2 unterzogen. Nach 24 h wurden die Apoptose-Induktion (A) sowie der Anteil an Zellen in G2/M (B) über Nicoletti-Färbung im FACS bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.

unterschied sich die Gewichtung der Einzelanteile des Kombinationseffekts bei beiden Zelllinien: Während in den Bak-positiven Zellen die kombinierte Wirkung aus Bestrahlung und TRAIL annähernd zu gleichen Teilen aus beiden Einzelbehandlungen stammte, wurde sie in den Bak-negativen JCAM fast ausschließlich durch den TRAIL-Anteil getragen (Abbildung 5.41A). Durch die nach 24 h fast fehlende Wirkung der Bestrahlung in den Bak-negativen JCAM ergab sich trotz besseren Ansprechens von TRAIL und ETR-2 in der Kombinationsbehandlung ein geringerer Apoptosewert als für die Bak-positiven Zellen.

Wirft man einen Blick auf die weitere Zellzyklusverteilung, so war in beiden Zelllinien nach Bestrahlung mit 10 Gy ein Arrest in G2/M beobachten, der in den Bak-positiven Zellen nur leicht, in den Bak-negativen jedoch massiv erhöht war (Abbildung 5.41B). Nach Stimulation mit TRAIL oder ETR-2 wurde in keiner der Zelllinien ein Arrest erzeugt.

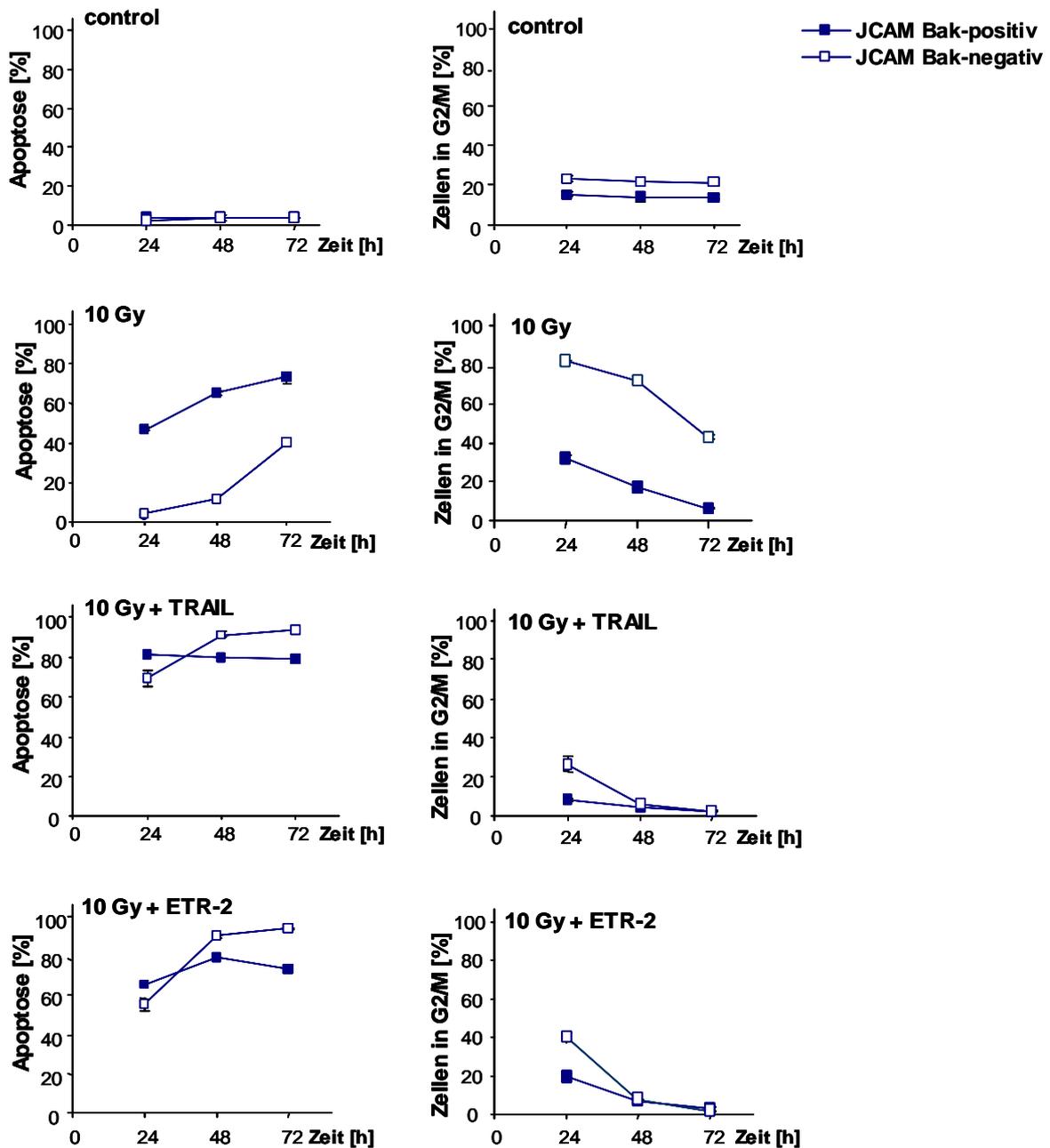


Abbildung 5.42 Apoptose-Induktion und G2/M-Arrest nach Bestrahlung und kombinierter Behandlung aus IR + TRAIL bzw. IR + ETR-2

Bak-positive und -negative JCAM wurden mit 10 Gy bestrahlt oder der Kombination aus Bestrahlung und 1 ng/ml TRAIL sowie Bestrahlung und 1 µg/ml ETR-2 unterzogen. Nach 24, 48 und 72 h wurde die Apoptose-Induktion (linke Seite) sowie der Anteil an Zellen in G2/M (rechte Seite) über Nicoletti-Färbung im FACS bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.

Kombinierte Behandlung aus IR plus TRAIL induzierte einen leichten G2/M-Arrest in den Bak-negativen Zellen, jedoch keinen in den Bak-positiven JCAM. Nach Kombinationsbehandlung mit ETR-2 wurde ein schwacher Arrest in den Bak-positiven JCAM ausgelöst und ein etwas stärkerer in den Bak-negativen (Abbildung 5.41B).

Insgesamt war die kombinierte Wirkung nach 24 h also insofern abhängig vom intrinsischen Zelltodweg, als dass die Bak-negativen Zellen noch teilweise in G2/M arretieren während die Bak-positiven Zellen in Apoptose gehen. Um zu überprüfen, ob dieser Arrest über die Zeit Bestand hat, oder die Bak-negativen Zellen zu späteren Zeitpunkten effizienter auf die kombinierte Behandlung reagieren, wurden die obigen Versuche auf spätere Zeitwerte (48 h und 72 h) ausgedehnt. Die anfängliche komplette Resistenz der Bak-negativen Zellen gegen strahleninduzierten Zelltod wurde mit der Zeit etwas relativiert, nach 48 h erreichten die Zellen ca. 11% Apoptose und nach 72 h immerhin 40% (Abbildung 5.42). Dennoch blieb zwischen Bak-positiven und Bak-negativen JCAM ein deutlicher Unterschied nach Bestrahlung zugunsten der Bak-positiven Zellen bestehen, der auch nach 72 h noch 33% betrug. Neben der Apoptoserate änderten sich auch die erhaltene Arrestdaten der Zellen: In gleichem Maß wie die Zelltodrate in den Bak-negativen Zellen nach 10 Gy anstieg, fiel der Anteil an Zellen in G2/M ab (Abbildung 5.42 rechte Spalte).

Auch das Gesamtbild der kombinierten Behandlungen änderte sich im zeitlichen Verlauf. Während nach 24 h die Bak-positiven Zellen noch besser auf die kombinierte Behandlung aus IR plus TRAIL bzw. IR plus ETR-2 ansprachen, zeigte sich nach 48 h und 72 h jedoch ein umgekehrtes Bild und die Apoptoseraten der Bak-negativen Zellen lagen über denen der Bak-positiven (Abbildung 5.42). Dabei blieb jedoch in den Bak-positiven Zellen die Zelltodraten im gesamten Zeitverlauf über konstant, während die der Bak-negativen Zellen weiter anstiegen und somit die Bak-positiven Zellen überragten. Einhergehend mit den ansteigenden Apoptosewerten der Bak-positiven JCAM fiel der prozentuale Anteil an Zellen in G2/M ab (Abbildung 5.42).

5.4.3 Die Caspasen-Aktivierung nach IR, TRAIL, ETR-2 und den kombinierten Behandlungen in Abhängigkeit des intrinsischen Zelltodweges

Da Bak anscheinend nicht absolut essentiell für die Zelltodinduktion nach TRAIL, ETR-2 und kombinierter Behandlung ist, wurde der Caspasen-Status sowie PARP-Spaltung nach Bestrahlung, Stimulation mit TRAIL oder ETR-2 und den kombinierten Behandlungen untersucht. Dazu wurden Bak-positive und Bak-negative Zellen mit 0 oder 10 Gy bestrahlt und im Anschluss mit 0 oder 1 ng/ml TRAIL bzw. 0 oder 1 µg/ml ETR-2 stimuliert. Nach 24 h

wurden die Zellen lysiert und im Western Blot auf Caspasen-Aktivierung sowie PARP-Spaltung getestet.

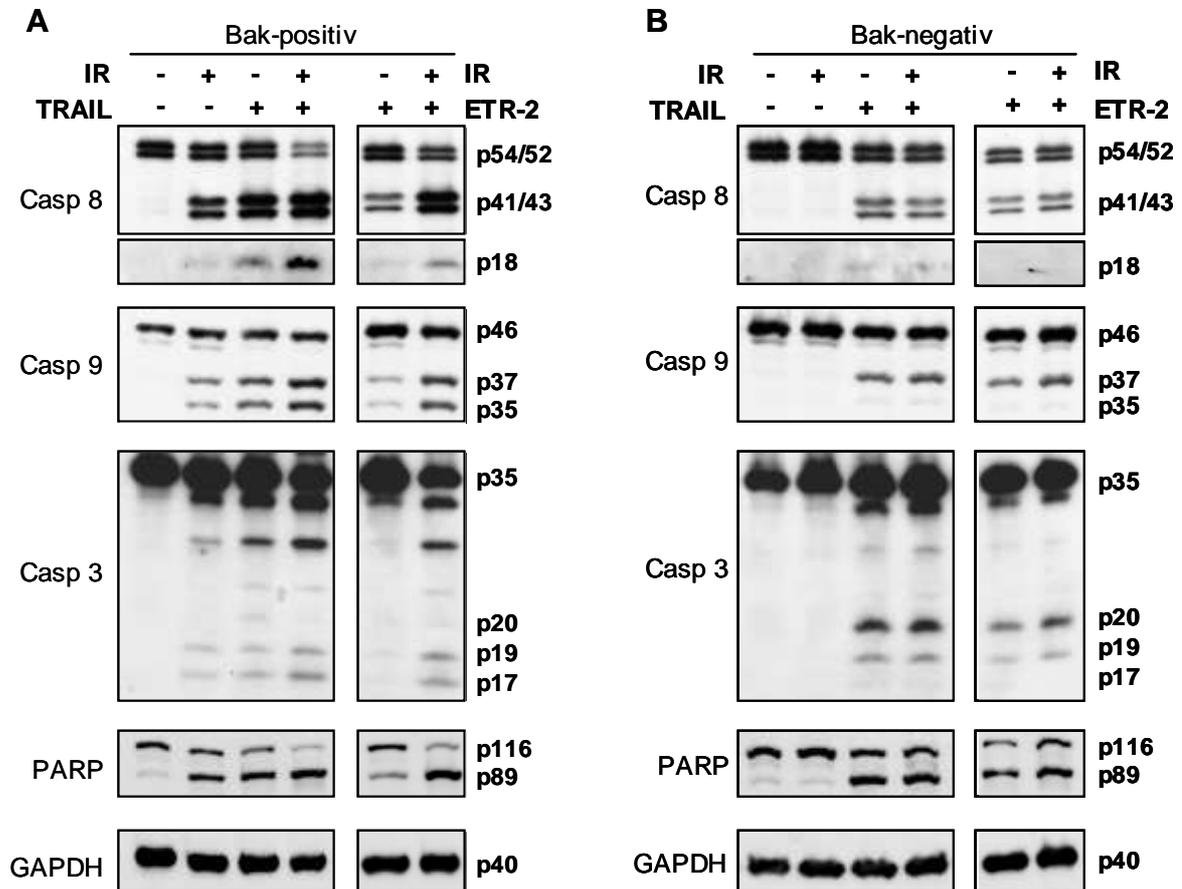


Abbildung 5.43 Caspasen-Aktivierung nach IR, TRAIL, ETR-2 und den Kombinationsbehandlungen in Abhängigkeit des intrinsischen Zelltodwegs

Bak-positive und -negative JCAM wurden mit 0 oder 10 Gy bestrahlt und direkt im Anschluss mit 0 oder 1 ng/ml TRAIL bzw. 0 oder 1 µg/ml ETR-2 stimuliert. 24 h nach Behandlung wurden die Zellen lysiert und der Status der Caspasen und des Reparaturenzyms PARP im Western Blot analysiert. Die Daten zeigen repräsentative Blots. Als Ladekontrolle wurde der Level an GAPDH bestimmt.

(A) Bak-positive JCAM

(B) Bak-negative JCAM

Bei Aktivierung der Caspase 8 entsteht ein gespaltenes Zwischenprodukt der Größen p41/p43 sowie das aktive p18 Fragment. In Bak-positiven Zellen konnte man das Intermediärprodukt p41/p43 nach allen Behandlungen deutlich nachweisen, allerdings war das Signal nach Stimulation mit ETR-2 etwas schwächer, was mit der geringeren Aktivität bei den FACS-Analysen übereinstimmt (Abbildung 5.43A). Außerdem wurde das p18-Fragment nach Bestrahlung und ETR-Stimulation leicht sowie nach TRAIL und den Kombinationsbehandlungen stärker detektiert. Insgesamt war im Prozessierungsverhalten der Caspase 8 ein deutlicher Kombinationseffekt zu beobachten. Man muss dabei jedoch beachten, dass die

Aktivierung der Caspase 8 nach Bestrahlung nicht über den extrinsischen Rezeptorweg erfolgt, sondern retrograd über Caspase 3. Vergleichbar zur Caspase 8 wurden auch Caspase 9 und 3 in den Bak-positiven Zellen prozessiert. Bei Caspase 9 wurde zum einen das durch autokatalytische Spaltung gebildete p35-Fragment nachgewiesen, sowie das retrograd durch Caspase 3 gespaltene p37-Fragment (Abbildung 5.43A). Auch hier war die Aktivierung nach ETR-2 etwas geringer als nach IR oder TRAIL. Außerdem war nach kombinierter Behandlung aus IR und TRAIL oder ETR-2 ein deutlicher Kombinationseffekt zu beobachten (Abbildung 5.43A). Die Caspase 3-Aktivierung verlief mit der Bildung der aktiven p19 und p17-Fragmente in Stärke und Verlauf äquivalent zur Caspase 9-Prozessierung und auch in der Spaltung des Reparaturenzyms PARP konnte ein der Caspasen-Aktivierung entsprechender Kombinationseffekt festgestellt werden (Abbildung 5.43A).

In Bak-negativen Zellen wurde nach Bestrahlung keine Caspasen-Aktivierung und auch keine PARP-Spaltung detektiert (Abbildung 5.43B). Nach Stimulation mit TRAIL oder ETR-2 sowie nach den kombinierten Behandlungen wurde jedoch sowohl Caspasen-Aktivierung als auch effizientes PARP-Cleavage beobachtet (Abbildung 5.43B). Allerdings wurde kein Kombinationseffekt festgestellt, was auf die fehlende Caspasen-Aktivierung nach Bestrahlung zurückzuführen war. Es bleibt zu erwähnen, dass bei der Caspase 9 fast ausschließlich das p37-Spaltprodukt nachweisbar war, welches nicht im Apoptosom sondern über retrograde Spaltung durch Caspase 3 entsteht, und somit das vollständige Fehlen einer Aktivierung des intrinsischen Zelltodweges bestätigt (Abbildung 5.43B). Des Weiteren war die Caspase 3 nicht vollständig zu den Fragmenten p17 und p19 prozessiert sondern vielmehr zu dem Vorläuferfragment p20 und dem durch Caspase 3 selbst prozessierten p19. Dennoch war die PARP-Spaltung vollständig und vergleichbar mit der in Bak-positiven JCAM (Abbildung 5.43 A+B).

5.4.4 Die Induktion des Zelltods nach Hemmung von Bak in den Bak-positiven JCAM

Die bisherigen anhand des JCAM-Zellpaares gewonnenen Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung des mitochondrialen Zelltodwegs an der kombinierten Wirkung zu frühen Zeitpunkten. Zu späteren Zeitpunkten verliert der mitochondriale Zelltodweg an Bedeutung, da auch in Bak-negativen JCAM Apoptose auftritt.

Für die Einzelkomponenten TRAIL und ETR-2 scheint der mitochondriale Weg zumindest bei den eingesetzten Konzentrationen auch zu frühen Zeitpunkten wenig essentiell zu sein, weswegen es sich bei den JCAM möglicherweise um Zellen vom Typ I handelt.

Um die Bedeutung von Bak funktionell abzusichern, wurde das Protein in den Bak-positiven Zellen durch siRNA stillgelegt und die Effekte auf die Apoptose nach Behandlung gemessen. Zunächst wurden Bak-positive JCAM mit 1000 nM Bak-siRNA über Elektroporation transfiziert und parallel dazu wurden als Kontrolle Zellen mit non targeting siRNA transfiziert sowie ohne siRNA der Elektroporation unterzogen. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen aufgeteilt und mit 0 oder 10 Gy bestrahlt sowie 0 oder 1 ng/ml TRAIL stimuliert. Ein weiterer Teil der Zellen wurde nicht behandelt sondern lysiert, um die Bak-Expression im Western Blot und somit die Effizienz der siRNA-Transfektion zu überprüfen. Ferner wurde ein Teil der Zellen mit PI-Lösung angefärbt und im FACS auf Viabilität überprüft, um den Anteil der Zellen zu ermitteln, die durch die Elektroporation geschädigt wurden. In den behandelten Zellen wurde 24 h nach Bestrahlung, Stimulation mit TRAIL oder kombinierter Behandlung die Apoptose-Induktion über Nicoletti-Färbung im FACS bestimmt.

Da die siRNA-Versuche parallel und mit denselben Ausgangsproben durchgeführt wurden wie die Experimente mit ErPC3 und Bestrahlung, gelten für das Bak-Silencing sowie die basalen Zelltodraten nach Transfektion und vor Behandlung die Ergebnisse aus Abbildung 5.37. Nach der Elektroporation wurden die transfizierten Proben aufgeteilt und ein Teil für die ErPC3-Versuche, der andere für die TRAIL-Versuche verwendet. Die Bak-Expression wurde weder durch die Elektroporation an sich noch durch die non targeting siRNA beeinflusst (Abbildung 5.37A). Die Transfektion der Bak-positiven JCAM mit Bak siRNA führte nach 48 h zu einem effizienten Silencing der Bak-Expression, die zwar nach 72 h wieder etwas anstieg aber im Vergleich zu den Kontrollen immer noch deutlich reprimiert war (Abbildung 5.37A). In Abbildung 5.37B ist der Anteil toter Zellen dargestellt, die durch die Elektroporation und damit verbundene Versuchsabläufe entstanden sind. Es handelte sich dabei um 12-17% der Zellen.

Elektroporation an sich (mock transfiziert) sowie Transfektion mit non targeting siRNA beeinflusste die Apoptose-Induktion nach IR, TRAIL oder kombinierter Behandlung nicht bzw. nur unwesentlich. Durch die Elektroporation an sich waren lediglich leicht erhöhte Apoptoseraten festzustellen (Abbildung 5.44).

Die Transfektion mit der Bak-siRNA inhibierte jedoch überraschenderweise die Apoptose-Induktion nicht nur nach Bestrahlung sondern auch nach Stimulation mit TRAIL oder kombinierter Behandlung (Abbildung 5.44). Dies steht im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen aus den Bak-positiven und Bak-negativen JCAM und deutet darauf hin, dass in Zellen mit defektem Mitochondrium andere Mechanismen zur Zelltod-Induktion greifen, als in Zellen mit funktionsfähigem Mitochondrium.

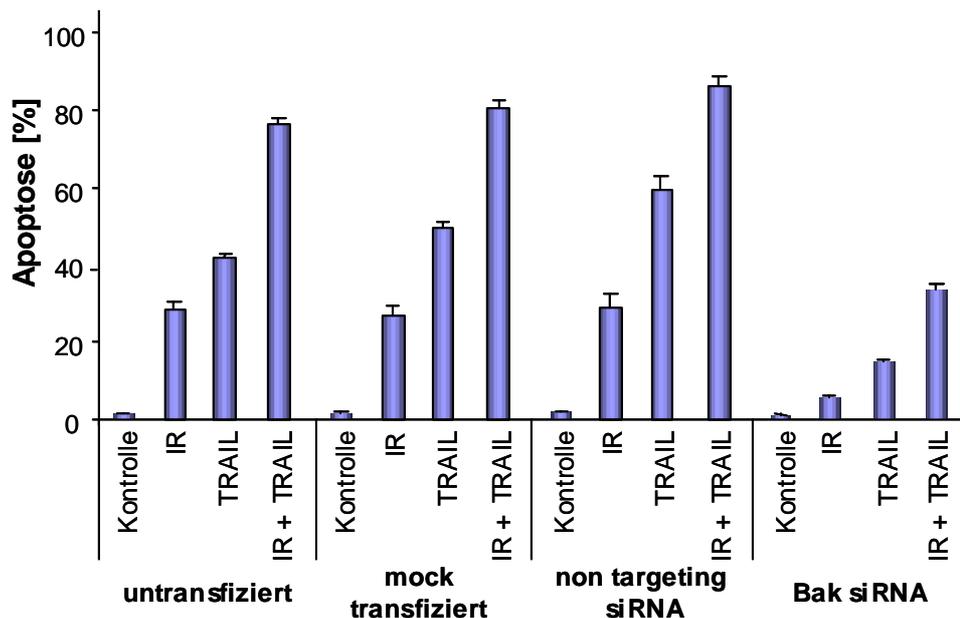


Abbildung 5.44 Apoptose-Induktion durch IR, TRAIL und kombinierte Behandlung in Bak-positiven JCAM nach Transfektion mit Bak siRNA

Bak-positive JCAM wurden leer (mock transfiziert), mit non targeting siRNA oder Bak siRNA elektroporiert. 48 h nach Elektroporation wurden die Zellen mit 0 oder 10 Gy bestrahlt und anschließend mit 0 oder 1ng/ml TRAIL stimuliert. Nach 24 h wurde die Apoptose-Induktion über Nicoletti-Färbung im FACS bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit entsprechender Standardabweichung.

5.5 Steigerung der Wirkeffizienz durch kombinierte Behandlungsansätze aus IR, TRAIL und ErPC3

– *in vitro* Untersuchungen an Jurkat-Lymphomzellen

Wie in den bisherigen Kapiteln der Arbeit gezeigt werden konnte, stellen die Kombinationsbehandlungen aus Bestrahlung und ErPC oder ErPC3 sowie Bestrahlung und TRAIL oder ETR-2 effiziente Werkzeuge zur Vernichtung verschiedener Tumorzellen mit unterschiedlichen Effekten in der Apoptose-Induktion dar. Die Effizienz kombinierter Behandlungsansätze kann zum einen darauf beruhen, dass durch die kombinierte Stimulation eventuelle Resistenzmechanismen der Zelle gegen Einzelbehandlung überwunden werden. Eine weitere Möglichkeit, die vor allem in der medizinischen Praxis von Bedeutung sein kann, ist die Tatsache, dass ein Tumor aus verschiedenen heterogen gearteten Zellen besteht und die einzelnen Substanzen der kombinierten Behandlungsansätze verschiedene Zellen des Tumors als Ziel haben. Da man also mit IR und ErPC3

sowie IR und TRAIL zwei hoch wirksame Kombinationen gefunden hat, sollte zuletzt auch die Dreifachkombination aus Bestrahlung, ErPC3 und TRAIL getestet werden. Dazu wurden Bak-positive JCAM Zellen mit 10 Gy bestrahlt, 0.6 ng/ml TRAIL behandelt oder 18 μ M ErPC3 stimuliert sowie allen Doppelkombinationen und der Dreifachbehandlung unterzogen. Die Dosisreduktion von TRAIL und ErPC3 war aufgrund der sehr guten Einzelwirkung beider Substanzen erforderlich, da man sonst den Kombinationseffekt im Kurzzeitversuch nicht mehr hätte auswerten können. 12 h nach Behandlung wurden die Apoptose-Induktion über Nicoletti-Färbung sowie der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials über TMRE-Färbung im FACS ermittelt.

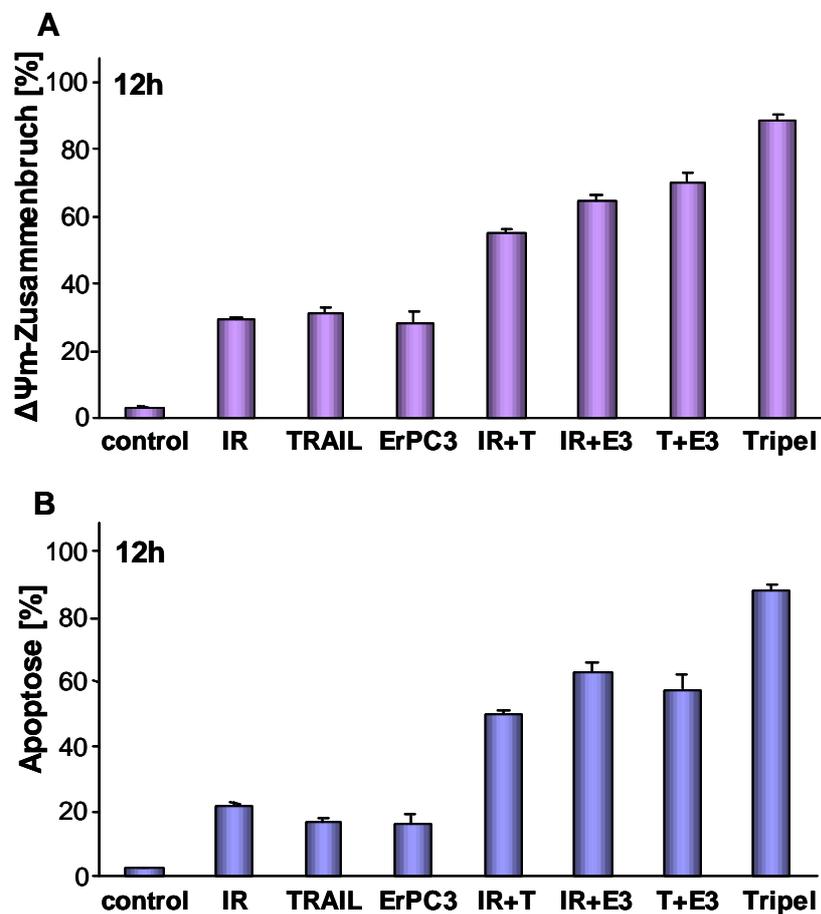


Abbildung 5.45 Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und Apoptose-Induktion nach kombinierter Behandlung mit IR, TRAIL und ErPC3

Bak-positive JCAM wurden mit 10 Gy bestrahlt, 0,6 ng/ml TRAIL stimuliert oder 18 μ M ErPC3 behandelt sowie allen Doppelkombinationen und der Dreifachbehandlung unterzogen. Nach 12h wurden Apoptose-Induktion über Nicoletti-Färbung sowie $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch über TMRE-Färbung im FACS bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.

(A) $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch 12 h nach Behandlung

(B) Apoptose-Induktion 12 h nach Behandlung

Der Anteil an Zellen mit $\Delta\psi_m$ -Zusammenbruch war abgesehen von der Kombination aus IR+ErPC3 sowie der Dreifachbehandlung in allen anderen Behandlungen leicht höher als die Apoptoseraten (Abbildung 5.45). Das mag zum größten Teil daher herrühren, dass der Apoptose ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials vorausgeht, es kann aber auch sein, dass ein kleiner Teil des Zelltods dort nicht über Apoptose sondern Nekrose eingeleitet wird, die auch in einem $\Delta\psi_m$ -Zusammenbruch resultiert, nicht aber in Caspase-vermittelter DNA-Fragmentierung. Bestrahlung sowie Stimulation mit TRAIL oder ErPC3 allein führte zu Apoptoseraten von jeweils ca. 17-20% und mit den Doppelbehandlungen erreichte man zwischen 50% und 60% Apoptose-Induktion (Abbildung 5.45B). Bei der Dreifachbehandlung jedoch konnten ca. 90% Apoptose und damit ein eindeutiger Kombinationseffekt erzielt werden: Weder durch Aufsummation der Apoptosewerte für die drei Einzelbehandlungen noch durch Addition der Werte für jede Doppelbehandlung plus passende Einzelbehandlung kann der Apoptosewert der Tripelbehandlung erreicht werden.

6. Diskussion

6.1 ErPC und ErPC3 in kombinierter Wirkung mit Bestrahlung

In der Annahme, dass die synthetischen Alkyllysophospholipide ErPC sowie ErPC3 und ionisierende Strahlung den intrinsischen Apoptoseweg über verschiedene Schnittstellen triggern, wurde die Effizienz einer Behandlung aus beiden Stimuli in malignen Gliomzelllinien untersucht. Dabei konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass die APC-Derivate ErPC und ErPC3 die Strahlenantwort in den untersuchten humanen malignen Gliomazellen T98G, A172 und U87MG erhöhen. In Kurzzeitversuchen von 24 bis 72 h erhöhten ErPC und ErPC3 die Sensitivität der höchst resistenten Zellen gegenüber strahleninduziertem Zelltod. Hierbei war jede Kombinationsbehandlung effektiver als die respektiven Einzelbehandlungen. In Abhängigkeit von Dosis und Behandlungsdauer ergaben sich für T98G hauptsächlich synergistische, für A172 hauptsächlich additive bis synergistische und für U87MG vor allem additive Kombinationseffekte. Teilweise und vornehmlich in U87MG kamen sub-additive Effekte vor. Insgesamt erschien ErPC3 noch potenter in der kombinierten Wirkung als ErPC. Nach den vielversprechenden Ergebnissen der Kurzzeitversuche wurde die Wirkung der kombinierten Behandlung aus ErPC und Bestrahlung bzw. ErPC3 und Bestrahlung mit den klinisch relevanten Koloniebildungstests auch im Langzeitversuch überprüft. Dabei ergab sich eine effektive Auslöschung klonogener Tumorzellen nach kombinierter Behandlung in zumindest additiver Weise. Wiederum war ErPC3 effektiver als ErPC.

Dass die kombinierte Behandlung aus Bestrahlung und ErPC bzw. ErPC3 auch bei anderen Tumoren erfolgreich sein könnte, zeigen die *in vitro* Daten aus den Jurkat und JCAM T-Lymphomzelllinien. Auch hier war nach der Kombinationsbehandlung eine deutliche Steigerung des strahleninduzierten Zelltods respektive der strahleninduzierten Apoptose beobachtet worden.

Bisher wurde die kombinierte Wirkung aus synthetischen Phospholipid-Analogen mit Bestrahlung erst in wenigen *in vitro* Studien untersucht. Das erste Alkyllysophospholipid, für das radiosensitivierende Eigenschaften gezeigt werden konnten, war der APC-Prototyp Miltefosine (HePC, Hexadecylphosphocholin) (Bruyneel et al., 1993). Allerdings war dieser Effekt limitiert auf Zellen, die aktiviertes Ras-Onkogen exprimierten. Für die Alkylphosphocholine Edelfosine (1-O-Octadecyl-2-O-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholin, Et-18-OCH₃), Miltefosine und Perifosine (Octa-decyl-(N,N-dimethyl-piperidinium-4-yl)-phosphat) konnte nachgewiesen werden, dass sie die strahleninduzierte Apoptose in humanen Leukämiezellen verstärken (Ruiter et al., 1999).

Passend zu den Beobachtungen nach Bestrahlung und ErPC bzw. ErPC3 konnten Berkovic und Mitarbeiter in Langzeitexperimenten zeigen, dass kombinierte Behandlung humaner epithelialer Tumorzelllinien (HTB 43 and KB Zellen) mit HePC und Bestrahlung sowie Edelfosine und Bestrahlung zu einer verstärkten Auslöschung klonogener Tumorzellen im Koloniebildungstest führt (Berkovic et al., 1997). Für Perifosine konnte kürzlich in KB Zellen ebenfalls eine Erhöhung der strahleninduzierten Zytotoxizität durch vermindertes klonogenes Überleben im Koloniebildungstest nachgewiesen werden.

Des weiteren gibt es erste Hinweise auf komplette Tumorregression nach Kombinationsbehandlung aus Perifosine und Bestrahlung in KB-Zell-Xenografts (Vink et al., 2006a). Diese scheint jedoch abhängig vom Tumorzelltyp zu sein, denn in U251-Gliomzell-Xenografts konnte Perifosine die Radiosensitivität nicht verstärken (de la Pena et al., 2006).

Bei der Analyse der Normalgewebstoxizität von ErPC und ErPC3 hatte sich bereits bei ErPC-Konzentrationen, die auch für die *in vitro* Tumorversuche eingesetzt wurden, eine starke Zytotoxizität auf normale humane Astrozyten ergeben. Andere Normalgewebszellen wie die humanen Hautfibroblasten hingegen wurden selbst nach Kombinationsbehandlung nicht geschädigt. Man könnte die empfindliche Reaktion der Astrozyten auf die Substanzen zwar als kritisch für eine weitere klinische Entwicklung insbesondere in Hinblick auf die Hirntumortherapie einstufen, allerdings erzeugte die Akkumulation der Substanz im Hirn von Mäusen oder Ratten keine nennenswerten Nebenwirkungen (Erdlenbruch et al., 1999) (Henke, persönliche Mitteilung). Weiter gilt es zu beachten, dass im Tumor aufgrund von Störungen der Blut-Hirn-Schranke deutlich mehr der Substanzen akkumulieren kann, als im umgebenden Nativgewebe. Schließlich sind die Astrozyten in ihrer Normalumgebung im Zellverband des Gewebes auch deutlich besser vor schädigenden Einflüssen geschützt als unter den *in vitro* Bedingungen der Kultivierung unter denen sie ohnehin sehr anfällig sind.

Insgesamt fehlen bisher jedoch eindeutige Daten zur tumorspezifischen Wirkung der Alkylphosphocholine. *In vitro* Studien an unterschiedlichen Tumorzellen zeigten, dass Zellen, die resistent gegenüber APCs sind, oft eine reduzierte Akkumulation der Substanzen aufweisen (Berkovic et al., 1996; Fleer et al., 1996; van der Luit et al., 2002). Außerdem korrelierte die selektive Zytotoxizität von Edelfosine gegenüber Leukämiezellen im Vergleich zu normalen Zellen mit der Aufnahme der Substanz in die Zellen (Mollinedo et al., 1997). Daher könnte man die tumorspezifische Wirkung der Alkylphosphocholine zumindest teilweise durch selektive Substanzakkumulation erklären. Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass weiterreichende Untersuchungen nötig wären, um eine tumorspezifische Wirkung der Substanzen eindeutig zu klären. Die Tatsache, dass nicht alle getesteten Normalgewebszellen mit einer Schädigung auf ErPC und ErPC3 reagiert haben und außerdem in den *in vivo* Untersuchungen zur Pharmakokinetik in Mäusen die Substanz

akkumuliert im Hirn nachgewiesen wurde, ohne dort Schäden verursacht zu haben, lässt die Substanzen ErPC und ErPC3 jedoch weiter als vielversprechende Kombinatoren mit Bestrahlung erscheinen.

6.2 Zum Wirkmechanismus der kombinierten Therapie

6.2.1 Die Bedeutung der Apoptose für die kombinierte Wirkung aus IR und ErPC bzw. ErPC3

Die Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Kombinationstherapie aus Bestrahlung und ErPC/ErPC3 zeigten einen wesentlichen Anteil Apoptose am Gesamtzelltod (Abbildung 5.12).

Weiterführende Untersuchungen zu ErPC/ErPC3 bestätigten dann, dass die erhöhte Zytotoxizität der kombinierten Wirkung mit einem verstärkten Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials sowie vermehrter Aktivierung der Caspasen und damit Spaltung des Reparaturenzyms PARP einhergeht. Des weiteren ließ sich die Apoptose-Induktion nach Kombinationsbehandlung komplett durch Vorinkubation mit dem Pan-Caspaseninhibitor zVAD blocken. Da die Substanzkonzentrationen, die im Kurzzeitversuch erfolgreich Apoptose induzierten auch im Langzeit-Koloniebildungstest effizient Tumorzellen auslöschten, liegt die Vermutung nahe, dass die Apoptose auch zum klonogenen Zelltod einen wesentlichen Beitrag leistet.

Dies bestätigt Untersuchungen von Ruiter und Mitarbeitern zur Bedeutung der Alkylphosphocholine Edelfosine, Miltefosine und Perifosine für die strahleninduzierte Apoptose (Ruiter et al., 1999).

Mit Konzentrationen ab 50 μM ErPC bzw. ErPC3 schwand der Apoptose-Anteil am Zelltod zugunsten nekrotischer Zellen, wobei ErPC3 im Vergleich zu ErPC das günstigere Verhältnis aus Apoptose versus Nekrose aufwies. Der zunehmende Anteil an Nekrose bei höheren ErPC/ErPC3-Konzentrationen deutet darauf hin, dass die Substanzen detergenz-ähnlich unspezifisch auf die Zellen zu wirken beginnen, eine Charakteristik aller Lysolipid-Strukturen bei höheren Konzentrationen. Für die weiteren mechanistischen Untersuchungen wurde daher 25 μM als ErPC bzw. ErPC3-Konzentration der Wahl eingesetzt. Bei diesen Bedingungen ist im Kurzzeitverlauf nach ErPC3 und Bestrahlung Apoptose die vorherrschende Zelltodform und man kann daher davon ausgehen, dass sie wesentlich zur kombinierten Wirkung beiträgt.

6.2.2 Die Bedeutung des Mitochondriums für die kombinierte Wirkung aus IR und ErPC bzw. ErPC3

Prinzipiell verfügt eine Zelle zur Ausführung der Apoptose über verschiedene Wege der Signalweiterleitung, von denen einige übers Mitochondrium zum Zelltod führen, andere jedoch unabhängig davon über Todesrezeptoren und Caspase 8 laufen. Somit gibt es auch für das Zusammenspiel aus Bestrahlung und ErPC/ErPC3 in der kombinierten Therapie hinsichtlich der Apoptose verschiedene Ansatzpunkte.

Bestrahlung selbst wirkt zum einen über die Bildung freier Radikale, die u.a. Schäden in der DNA verursachen. Diese werden über Kinasen registriert und als Folge dessen wird u.a. p53 induziert. p53 wiederum fungiert als Transkriptionsfaktor für Bax, Puma und Noxa (Fridman and Lowe, 2003; Nakano and Vousden, 2001; Oda et al., 2000; Vousden and Lu, 2002) und beeinflusst außerdem die Lokalisation von Bax und Bak am Mitochondrium. Neben diesen Regulationen, den mitochondrialen Weg betreffend, kann p53 jedoch auch die Transkription des TRAIL-Rezeptors aktivieren und so einen zusätzlichen Apoptoseweg antreiben, der als Ergänzung zum mitochondrialen Weg angesehen werden kann (Fulda et al., 1998; Reinke and Lozano, 1997). Als Alternative zum klassischen p53-Weg nach Bestrahlung wird dem Lipid-Signalmolekül Ceramid eine Bedeutung bei der strahleninduzierten Apoptose zugeschrieben. Dabei triggert Bestrahlung die Aktivierung des Enzyms Saure Sphingomyelinase in der Zytoplasmamembran, welches dann Sphingomyelin zu Ceramid umsetzt und dieses aus der Membran entlässt (Haimovitz-Friedman et al., 1994; Kolesnick and Fuks, 2003). Die Ceramidbildung führt schließlich u.a. zur Integration von Bax in die äußere Mitochondrienmembran, zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium und zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade (Liao et al., 1999).

Für die Alkylphosphocholine Edelfosine, Perifosine und Miltefosine wurde beschrieben, dass sie Apoptose über den stressinduzierten SAPK/JNK-Signalweg auslösen (Gajate et al., 1998; Ruiter et al., 1999) und durch Inhibierung von PKB/Akt sowie des MAPK-Signalings den Zelltod weiter verstärken können (Ruiter et al., 2003; Zhou et al., 1996). Edelfosine und Perifosine akkumulieren außerdem in den Lipid Rafts von Tumorzellen und verursachen Umverteilungen in der Proteinzusammensetzung der Rafts, was zum Clustern und der Aktivierung von CD95 führt (Gajate et al., 2004; Gajate and Mollinedo, 2001; Gajate and Mollinedo, 2007; Zarembek et al., 2005). Des Weiteren wurde über eine Ceramid-vermittelte Aktivierung von Bax berichtet (Wieder et al., 1998).

Es gibt also offensichtlich viele denkbare Möglichkeiten des Zusammenspiels aus Bestrahlung und ErPC/ErPC3 am Mitochondrium. So könnte der klassische intrinsische Apoptoseweg übers Mitochondrium nach Bestrahlung über stressinduziertes SAPK/JNK-Signaling oder Inhibierung des Überlebenssignalings nach ErPC/ErPC3 verstärkt werden.

Alternativ könnte es zu einer gesteigerten Ceramidbildung kommen und somit ebenfalls zu einer Verstärkung am mitochondrialen Zelltodweg. Ebenfalls denkbar wäre aber auch ein Zusammenwirken über den extrinsischen CD95-Weg oder über ein Wechselspiel aus CD95-Weg und mitochondrialem Weg. Zwar wurde für die ErPC-Wirkung nach Einzelgabe gezeigt, dass der CD95-Weg nicht zur Apoptose beiträgt (Jendrossek et al., 2003), allerdings könnte durch die Bestrahlung eine Änderung in der Protein-Verteilung der Lipid-Rafts erzeugt worden sein, die somit den CD95-Weg für ErPC vorbahnen könnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings für die Gliomzellen T98G gezeigt werden, dass im Gegensatz zu deutlicher Aktivierung der Caspasen 9 und 3 keine Caspase 8 gespalten wurde. Der beobachtete Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, der durch die kombinierte Behandlung entsprechend verstärkt wurde, war also nicht auf eine Rückkopplung des CD95-Wegs zurückzuführen, sondern rein intrinsisch aktiviert.

Um die essentielle Bedeutung des Mitochondriums weiter zu erhärten und die Untersuchungen außerdem auf weitere Zelltypen auszudehnen, wurde die Kombinationsbehandlung im Jurkat-Modell analysiert. In beiden Zelllinien konnte nach kombinierter Behandlung eine höchst effiziente Apoptose-Induktion einschließlich Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials beobachtet werden. Überexpression von Bcl-2 inhibierte die Apoptose jedoch zunächst komplett auf Werte von unter 20%. Aufgrund der großen Effizienz dieser Behandlung konnte die Apoptose durch Bcl-2 allerdings nicht vollständig geblockt werden und so stiegen nach 12 bzw. 24 h die Apoptoseraten auch in den Bcl-2 überexprimierenden Jurkats wieder an. Entsprechend zeitverzögert und abgeschwächt erfolgte in diesen Zellen daher auch die Aktivierung der Caspasen sowie die PARP-Spaltung. Zusätzlich zeigten die Jurkat Zellen auch eine Caspase 8-Aktivierung, die jedoch durch Bcl-2-Überexpression deutlich abgeschwächt war und insofern eine retrograde Spaltung durch Caspase 3 vermuten lässt. Caspase 3 kann die Caspase 8 in einer Rückkopplungsschleife aktivieren, wodurch diese andererseits über Spaltung von Bid den mitochondrialen Zelltodweg verstärken kann (Belka et al., 2000; Li et al., 1998; Slee et al., 1999a). Durch Ausschalten des mitochondrialen Zelltodwegs in den Bak-negativen JCAM wurde die exzellente Wirkung der Kombination in den Zellen vollständig und dauerhaft geblockt ebenso wie die Aktivierung der Caspasen. Die Tatsache, dass auch die Caspase 8-Spaltung komplett verhindert wurde, bestätigt wiederum, dass es sich hier um eine retrograde Spaltung durch Caspase 3 handeln muss und um keine Aktivierung des Rezeptorwegs. Somit war die essentielle Bedeutung des intrinsischen Zelltodwegs auch für die kombinierte Behandlung nachgewiesen. Die Caspase 8-Aktivierung in den Jurkat Zellen bedeutet, dass der Caspase 3 in diesem Zellsystem (im Gegensatz zu T98G) auch eine Rolle oberhalb des Mitochondriums zugeschrieben werden kann. Die Bedeutung der

Caspasen 3 und 7 für den mitochondrialen $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch wurde kürzlich von Lakhani und Mitarbeitern beschrieben (Lakhani et al., 2006). Es könnte daher sein, dass die noch effizientere Wirkung der Kombination in T-Lymphomzellen im Vergleich zu T98G auf eine Rückkopplungsschleife am Mitochondrium zurückzuführen ist, die von Caspase 3 ausgehend über Aktivierung der Caspase 8 zur Bid-Spaltung führt und somit den mitochondrialen Membranzusammenbruch weiter triggert (Slee et al., 1999). Passend zu dieser Theorie wurde in den JCAM nach kombinierter Behandlung deutliche Bid-Spaltung im Western Blot nachgewiesen, die in den Bak-negativen Zellen fehlte und außerdem in den Bak-positiven JCAM durch Hemmung der Caspasen 3 und 9 mittels zVAD ebenso ausblieb. Für das Alkylphosphocholine Miltefosine konnte kürzlich ebenfalls eine Aktivierung der Caspase 8 über den intrinsischen Weg gezeigt werden einhergehend mit der Spaltung von Bid (Paris et al., 2007).

6.2.3 Die Bedeutung der Bcl-2 Familie für die kombinierte Wirkung aus IR und ErPC bzw. ErPC3

Sowohl in den Gliomzellen als auch den beiden Jurkat-Modellen wird die Apoptose nach kombinierter Behandlung über den intrinsischen Zelltodweg vermittelt, der durch die Bcl-2 Proteine am Mitochondrium reguliert wird. Daher wurden verschiedene Mitglieder der Bcl-2 Familie sowohl in T98G als auch den T-Lymphomzelllinien Jurkat vector und Bcl-2 sowie JCAM Bak-positiv und -negativ untersucht. Dabei ergaben sich viele Gemeinsamkeiten aber auch wenige Unterschiede, die wahrscheinlich darauf zurückzuführen sind, dass die T-Lymphomzellen negativ für das Protein Bax sind.

In T98G konnte im FACS eine Zunahme der Bax-Aktivierung nach kombinierter Behandlung beobachtet werden, die Expressionslevel an Bax und Bak im Western Blot blieben jedoch unbeeinflusst. Die WB-Analysen der anti-apoptotischen Proteine Bcl-x_L, Bcl-2 und Mcl-1 ergaben ebenfalls keine Veränderungen im Proteinstatus. Hingegen konnte eine deutliche Zunahme nach Kombinationsbehandlung bei pro-apoptotischem Bcl-x_S, Puma, Noxa und Bim_{EL} beobachtet werden. Interessanterweise war auch eine Abnahme der Bad-Phosphorylierung an S136 zu erkennen sowie eine leichte Zunahme an unphosphoryliertem Bad.

Für das Zusammenspiel der Bcl-2-Familienmitglieder am Mitochondrium gibt es zwei Hauptmodelle, das „direct activation“ Modell und das „displacement“ Modell (siehe Einleitung unter 2.5.2 und Abbildung 2.7). Beiden gemeinsam ist die Theorie, dass Bax und Bak als

Porenbildner essentiell für die mitochondriale Schädigung sind und durch die anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine kontrolliert werden.

Die Modelle sind beide sehr schlüssig und haben sich auch in verschiedenen Zellsystemen belegen lassen. Allerdings unterscheiden sie sich auch in wesentlichen Zügen (sind Bak und Bax prinzipiell aktiv oder benötigen sie Aktivatoren?) und es ist schwer zu beurteilen, in welches Modell sich unsere Zellen einordnen lassen. Rein spekulativ wäre auch eine Vereinigung beider Entwürfe denkbar, insofern, dass zwar Aktivatoren notwendig sind, um Bak und Bax zu oligomerisieren, gleichzeitig könnten aber dennoch beide Proteine durch anti-apoptotische sequestriert sein. Lässt man also Aspekte aus beiden Entwürfen zu, ergeben sich aus den Versuchen der vorliegenden Arbeit folgende Modelle für T98G Zellen: Nach Stimulation mit ErPC sowie kombinierter Behandlung wurde eine deutliche Aktivierung von Bax durch Konformationsänderung beobachtet. In diesem Zusammenhang wurde beschrieben, dass die Aktivierung von Bax im Zytoplasma durch p53 induziert werden kann. Zytoplasmatisches p53 liegt jedoch inaktiviert an Bcl-x_L gebunden vor und muss erst von diesem gelöst werden, was z.B. durch Puma erfolgen kann (Chipuk et al., 2005). Passend hierzu wurde in T98G Zellen eine Puma-Induktion nach kombinierter Behandlung beobachtet. Allerdings weisen T98G mutiertes p53 auf (Ishii et al., 1999). Es existieren jedoch Backup-Systeme in der Zelle und so kann z.B. p73 in diesem Fall die Funktion von p53 übernehmen. Dabei wurde gezeigt, dass in der p73-vermittelten Apoptose Puma durch p73 transkriptionell hochreguliert wird und dann die Translokation von Bax zum Mitochondrium provoziert (Melino et al., 2004) (Abbildung 6.1).

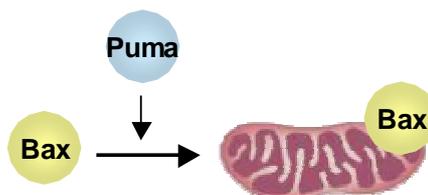


Abbildung 6.1 Modell für die Wirkung von Puma

Puma wird durch p53 oder p73 transkriptionell hochreguliert und kann daraufhin die Translokation von Bax zum Mitochondrium vermitteln (Melino et al., 2004).

In gesunden Zellen wird pro-apoptotisches Bak durch Mcl-1 und Bcl-x_L gebunden und inaktiv gehalten (Willis et al., 2005) und ähnliches wird für aktiviertes in der mitochondrialen Membran befindliches Bax angenommen. Noxa kann Bak aus der Bindung von Mcl-1 befreien (Gelinas and White, 2005) und dann in Abhängigkeit von der Mule E3 Ubiquitin Ligase für dessen Abbau im Proteasom sorgen (Warr et al., 2005; Zhong et al., 2005). Durch Bindung von Bad an Bcl-x_L wird dieses in die Mitochondrienmembran eingebunden und dadurch inaktiviert. Erst wenn beide anti-apoptotischen BH3-Proteine inaktiviert und aus der Bindung von Bax bzw. Bak gelöst sind, kann Apoptose stattfinden (Willis et al., 2005). Passend zu dieser Theorie geht aus den Western Blot Analysen für T98G zum einen eine

verstärkte Bad-Aktivierung durch Dephosphorylierung hervor, außerdem konnte eine erhöhte Expression von Noxa beobachtet werden.

Überraschend ist jedoch die Tatsache, dass Mcl-1 nicht abgebaut wird. Während die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L allein durch Bindungen zu BH3-only Proteinen inaktiviert werden, wird Mcl-1 durch Bindung an Noxa abgebaut (Leber et al., 2007). Eine Bindung von Bim oder Puma an Mcl-1 würde den Abbau zwar herauszögern (Mei et al., 2005), aber letztlich doch nicht völlig verhindern. Daher ist es wahrscheinlicher, dass Mcl-1 in diesem Zellsystem eine eher untergeordnete Rolle spielt und die Gegenseite der Apoptose hauptsächlich über Bcl-2 und Bcl-x_L reguliert wird (Abbildung 6.2).

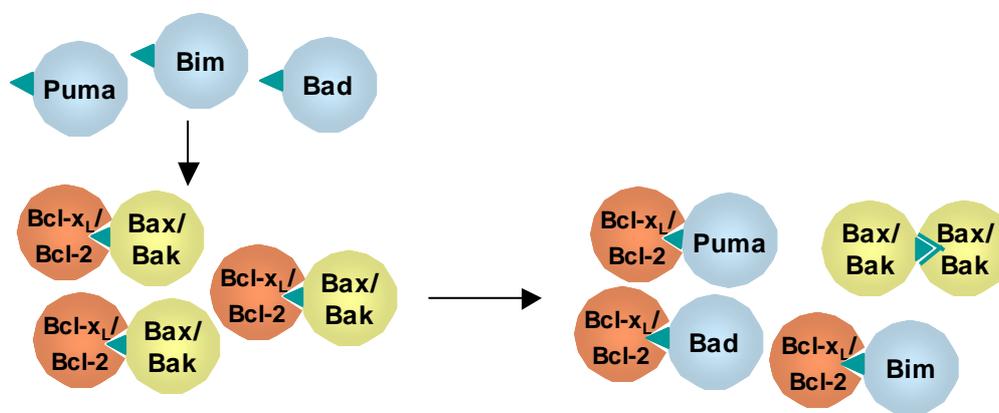


Abbildung 6.2 Modell für die Wirkung der BH3-only Proteine Bad, Bim und Puma in T98G

Nach der Theorie des „displacement“ Modell sind die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak durch die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L gebunden und dadurch inaktiv gehalten. Die BH3-only Proteine Puma, Bim und Bad können über Bindung an diese Bax und Bak freisetzen. Dadurch wird die Oligomerisierung von Bax und Bak möglich und die Apoptose kann stattfinden.

Nach dem „direct activation“ Modell sind die Aktivatoren Bim und Bid für die Oligomerisierung von Bax und Bak notwendig (Certo et al., 2006; Kim et al., 2006). Sie sind jedoch im Normalzustand der Zelle an anti-apoptotische BH3 Proteine gebunden und müssen erst durch die Sensitizer-BH3s freigesetzt werden (Certo et al., 2006; Kim et al., 2006; Letai et al., 2002). Als solches käme neben Noxa und Bad auch Puma in Frage, welches in T98G ebenfalls nach Behandlung hochreguliert wurde. Kürzlich wurde auch ein funktioneller Link zwischen Bim und Noxa festgestellt, bei dem eine erhöhte Noxa-Induktion durch Bim exekutiert wird (Han et al., 2007). Noxa würde also oberhalb von Bim stehen, was zu dem Modell der Sensitizer passt (Abbildung 6.3).

Bei der in T98G ablaufenden Apoptose nach Kombinationsbehandlung gibt es also verschiedene Möglichkeiten der exakten Funktionsweise von Puma, Noxa, Bim und Bad, die jedoch alle zum selben Ereignis führen, nämlich einer Inaktivierung der Funktion der anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine.

Manche der für T98G beobachteten Ergebnisse zeigten auch in Jurkat T-Lymphomzellen Gültigkeit. So blieben die Level an Bcl-x_L unverändert und Noxa wurde nach kombinierter

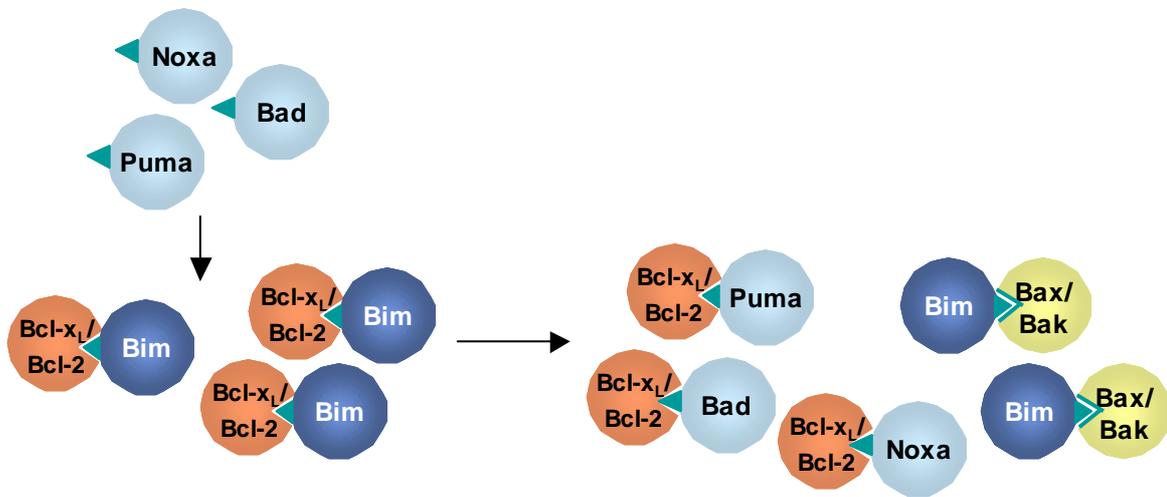


Abbildung 6.3 Modell für die Wirkung der BH3-only Proteine Noxa, Bad und Puma in T98G
 Nach dem „direct activation“ Modell benötigen die Proteine Bax und Bak zur vollständigen Aktivierung die BH3-only Proteine Bid oder Bim. Bim ist jedoch durch Bindung an Bcl-2 oder Bcl-x_L inaktiv und muss erst losgelöst werden. Noxa, Puma oder Bad können durch Bindung an Bcl-2 und Bcl-x_L Bim freisetzen, das dann die Oligomerisierung von Bax bzw. Bak bewirken kann.

Behandlung induziert. In Abweichung zu T98G wurde jedoch Mcl-1 abgebaut und Puma lediglich nach 3h induziert, während es danach parallel zu Mcl-1 im WB verschwand. Außerdem wurde Bim in den Jurkat vector Zellen nach kombinierter Behandlung nicht induziert und in JCAM nur zu frühen Zeitpunkten. In den JCAM Zellen wurde zusätzlich der Status von Bid untersucht und die Aktivierung des Proteins durch Spaltung nachgewiesen.

Der Abbau von Mcl-1 lässt vermuten, dass dieses anti-apoptotische Bcl-2 Protein in den Bax-freien Jurkat-Zellen bei der Hemmung von Bak von wesentlicher Bedeutung ist. Weiterführende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe enthüllten Mcl-1 als zentralen Überlebensfaktor im Jurkat-Modell, da allein die Hemmung des Proteins mit Mcl-1 siRNA ausreichte, um Apoptose auszulösen (Elsässer und Rudner, persönliche Mitteilung).

Nach Ubiquitinierung durch die E3-Ligase Mule wird Mcl-1 über Degradation im Proteasom inaktiviert (Zhong et al., 2005). Daneben kann Mcl-1 in sterbenden Zellen alternativ auch durch Caspasen gespalten werden, wobei ein pro-apoptotisches Spaltprodukt erzeugt wird (Michels et al., 2004). Die Beobachtung, dass der Abbau von Mcl-1 nach kombinierter Behandlung aus IR und ErPC3 durch Bcl-2 Überexpression gehemmt und in Bak-negativen JCAM völlig inhibiert wurde, sprach zunächst eher für eine Caspase-vermittelte Spaltung des Mcl-1. Allerdings konnten im Western Blot keine typischen pro-apoptotischen Spaltfragmente nachgewiesen werden. Außerdem wurde Mcl-1 in Bak-positiven Zellen auch nach Hemmung

der Caspasen durch zVAD unvermindert gespalten. Daher scheidet eine Caspase-vermittelte Spaltung von Mcl-1 zur Erzeugung Apoptose-fördernder Spaltfragmente aus.

Da der Abbau von Mcl-1 also vermutlich auf eine Inaktivierung im Proteasom zurückzuführen ist, kommt dem Protein Noxa wahrscheinlich als Hauptfunktion die Vermittlung des Mcl-1 Abbaus mit Hilfe von Mule zu (Abbildung 6.4). Dies scheint gleichzeitig der Hauptmechanismus zu sein, über den die Zellen im Jurkat-Zellsystem Apoptose einleiten.

Die Hemmung des Mcl-1 Abbaus bei Bcl-2 Überexpression könnte dadurch zustande kommen, dass wegen des Übergewichts an anti-apoptotischem Bcl-2 Noxa verstärkt an dieses gebunden ist und deshalb den Mule-vermittelten Abbau von Noxa nur entsprechend vermindert einleiten kann. Dazu passt auch, dass Noxa deutlich stärker induziert ist als in den Jurkat vector Zellen mit normalem Bcl-2 Gehalt. Es muss entsprechend mehr Noxa vorhanden sein, damit Mcl-1 schließlich doch abgebaut werden kann und somit Bak freigesetzt wird und die Apoptose stattfindet. Auch die Induktion von Bim nach kombinierter Behandlung, die lediglich nach Bcl-2 Überexpression auftritt, ließe sich so erklären: Bim könnte Noxa aus der inhibierenden Bindung von Bcl-2 loslösen, wodurch es für den Mcl-1 Abbau ebenfalls wieder zur Verfügung steht (Abbildung 6.4).

Ähnliches könnte in den JCAM Zellen für das Fehlen von Bak zutreffen. In diesem Fall fehlen die Multidomän-proapoptotischen Proteine und alle anti-apoptotischen Proteine können die BH3-onlys besetzen.

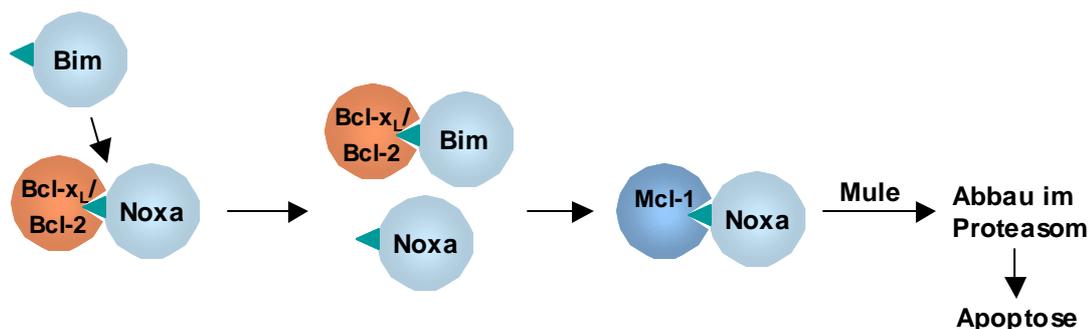


Abbildung 6.4 Modell zur Wirkung der Proteine Bim, Noxa und Mcl-1 im Jurkat-Lymphomzellmodell

Im Jurkat-Zellsystem scheint ein Abbau von Mcl-1 der entscheidende Faktor für die Apoptose-Induktion zu sein. Dazu muss jedoch Noxa an Mcl-1 gebunden sein, das den Abbau von Mcl-1 mit Hilfe des BH3-only Proteins Mule vermittelt. Eine wesentliche Funktion von Bim in diesem Zusammenhang wäre die Freisetzung von Noxa aus der inhibierenden Bindung zu Bcl-2 bzw. Bcl-x_L. Freies Noxa kann dann an Mcl-1 binden und dessen Abbau im Proteasom bewirken.

Allerdings wurde in den Bak-negativen Zellen auch eine Doppelbande für Mcl-1 beobachtet, was auf eine Phosphorylierung des Proteins hinweist. Es wurde beschrieben, dass Mcl-1 u.a. nach oxidativem Stress durch JNK an S121 und Thr163 phosphoryliert wird, was zu einem Verlust seiner Überlebensfunktion führt (Inoshita et al., 2002). Andererseits kann Mcl-1 durch

ERK ebenfalls an Thr163 phosphoryliert werden, was den Proteinumsatz von Mcl-1 deutlich herabsetzt (Domina et al., 2004). Letzteres würde gut zu der Beobachtung passen, dass Mcl-1 während des untersuchten Zeitraums bis 24 h nach Behandlung überhaupt nicht abgebaut wurde.

Die Abnahme von Bid in Bak-positiven JCAM nach kombinierter Behandlung mit IR und ErPC3 ist, wie bereits unter 6.2.2 diskutiert, auf eine Rückkopplungsschleife zurückzuführen, bei der Caspase 8 retrograd über Caspase 3 aktiviert wird und infolge dessen es zur Spaltung von Bid in tBid kommt. Die tBid-vermittelte Apoptose ist nicht notwendigerweise vom klassischen Weg über Bax-Aktivierung abhängig (Kim et al., 2000). So kann tBid zum einen Bak direkt aktivieren, zum anderen Bak aus der inhibierenden Bindung an Mcl-1 durch Verdrängung freisetzen (Clohessy et al., 2006).

Die Bedeutung von Puma lässt sich im Jurkat-Zellsystem nur schwer zuordnen. Klassischerweise wird Puma durch p53 induziert, das in Jurkat Zellen jedoch fehlt. Die beobachtete frühe Induktion von Puma kann aber auch durch das Protein p73 verursacht worden sein, das als Backupsystem redundant für die meisten Funktionen von p53 wirkt. p73 könnte evtl. auch -wie für p53 beschrieben- am Mitochondrium mit Bak interagieren und dessen Oligomerisierung bewirken (Leu et al., 2004). Die mögliche Funktion von Puma in diesem Modell wäre dann eine Freisetzung von p73 ähnlich der von Chipuk beschriebenen Befreiung des p53 von Bcl-x_L (Chipuk et al., 2005).

Auf der anderen Seite verschwindet Puma parallel zu Mcl-1. Bisher wurde zwar nur beschrieben, dass Noxa den Abbau von Mcl-1 mit Hilfe des BH3-only Proteins Mule vermitteln kann (Warr et al., 2005; Zhong et al., 2005), aber letztlich ist nicht völlig auszuschließen, dass Puma evtl. zusammen mit Mcl-1 degradiert wird oder parallel dazu, damit es zu keiner gegenseitigen Stabilisierung der Proteine kommt.

6.2.4 Regulationsmechanismen oberhalb des Mitochondriums: Die Bedeutung von PKB/Akt

Nachdem die Datenlage eindeutig zeigte, dass die kombinierte Behandlung aus Bestrahlung und ErPC/ErPC3 ihre Wirkung übers Mitochondrium entfaltet, wurde untersucht, welcher Trigger oberhalb des Mitochondriums regulierend ins Geschehen eingreifen könnte. In diesem Zusammenhang wurde der Status des Überlebensproteins PKB/Akt durchleuchtet, das in den letzten Jahren als Zielprotein anderer Alkylphospholipide wie Edelfosine, Miltefosine oder Perifosine identifiziert wurde (Hideshima et al., 2006; Kondapaka et al., 2003; Rüter et al., 2003).

Nach Stimulation von T98G mit ErPC bzw. ErPC3 sowie nach kombinierter Behandlung konnte eine deutliche Inhibierung der Akt-Phosphorylierung an Serin 473 und Threonin 308 aufgezeigt werden. In Jurkat vector und Bak-positiven JCAM Zellen wurde neben der Dephosphorylierung von Akt überraschenderweise auch ein Rückgang der Akt-Level an sich beobachtet. Die Aktivität des Proteins wird jedoch - soweit bisher bekannt - über Phosphorylierung reguliert. Dabei führt eine Phosphorylierung an T308 nur zu partieller Aktivität des Proteins und eine Phosphorylierung an beiden Stellen ist erforderlich, damit PKB/Akt seine volle Aktivität erreichen kann (Song et al., 2005). Entsprechend führt eine Dephosphorylierung des Proteins zum Funktionsverlust und somit zur Inhibierung der von PKB/Akt geförderten Überlebenssignalübertragung.

Es ist daher unklar, warum Akt zusätzlich zur Dephosphorylierung weiter abgebaut wird. Die Annahme, es könnte sich dabei um allgemeinen Poteinabbau handeln, wie er zur Spätphase der Apoptose vorkommt, scheitert an der Tatsache, dass GAPDH von einem solchen ebenfalls betroffen sein müsste, was aber nicht der Fall war. Allerdings wurde kürzlich für das Alkylphosphocholine Perifosine ebenfalls ein Rückgang der totalen Akt-Level nach Behandlung erfasst (Elrod et al., 2007).

Interessanterweise wird durch Bcl-2 Überexpression in den Jurkat Bcl-2 Zellen der Abbau von Akt vollständig geblockt und die Dephosphorylierung von P-Akt verläuft im Vergleich zu Jurkat vector Zellen deutlich abgeschwächt. Das Fehlen von Bak in den Bak-negativen JCAM hingegen verhinderte lediglich den Akt-Abbau, beeinflusste aber nicht die Dephosphorylierung von P-Akt. Diese Ergebnisse deuten auf verschiedene Mechanismen bezüglich des Akt-Abbaus und der Dephosphorylierung hin. So scheint die Dephosphorylierung von P-Akt lediglich durch Bcl-2 Überexpression beeinflusst zu werden, während der Abbau von PKB/Akt in Verbindung mit einem intakten mitochondrialen Zelltodweg steht. Es könnte daher sein, dass aktive Caspasen ursächlich für die sinkenden Akt-Level sind, denn deren Aktivität wird sowohl durch Bcl-2 Überexpression als auch durch fehlendes Bak negativ reguliert. Alternativ kann PKB/Akt jedoch auch durch eine/mehrere der zahlreichen Proteasen abgebaut werden, die im Laufe der Apoptose aktiv werden und den Proteindurchsatz unspezifisch hochfahren. Interessanterweise konnte jedoch in zVAD-vorbehandelten Zellen weder nach IR, ErPC3 oder Kombinationsbehandlung ein Akt-Abbau beobachtet werden (Abbildung Z.1 der zusätzlichen Abbildungen, Kapitel 9). Daher ist die Degradation von PKB/Akt eindeutig auf aktive Caspasen und nicht auf unspezifischen Abbau durch andere Proteasen zurückzuführen.

Aufgrund der Tatsache, dass die Dephosphorylierung von P-Akt bei Überexpression von Bcl-2 gehemmt wurde, aber durch Fehlen von Bak und Bax nicht beeinträchtigt war, scheint es

eine vom Mitochondrium unabhängige Rückkopplung zu geben, bei der Bcl-2 in die Dephosphorylierung des PKB/Akt hemmend eingreift.

Passend zur zunehmenden Deaktivierung von Akt konnte in allen verwendeten Zelllinien im Western Blot auch eine Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors FKHL1 beobachtet werden. Dieser wird durch PKB/Akt negativ über Phosphorylierung reguliert (Brunet et al., 1999). Phosphoryliertes FKHL im Kern wird von 14-3-3 gebunden, wodurch die Bindung zur DNA inhibiert wird (Brunet et al., 2002; Cahill et al., 2001). Der Komplex aus 14-3-3 und P-FKHL wird dann durch die intrinsische NES-Sequenz des Transkriptionsfaktors ins Zytoplasma transportiert, wo er inaktiv verweilt (Birkenkamp and Coffey, 2003). Eine verminderte Phosphorylierung von FKHL1 infolge der Akt-Inhibierung bedeutet damit, dass der Transkriptionsfaktor nicht aus dem Kern exportiert wird, sondern die Expression seiner Target-Proteine bewirken kann, wozu u.a. pro-apoptisches Bim (Dijkers et al., 2002; Dijkers et al., 2000a; Urbich et al., 2005), Puma (You et al., 2006) und Noxa (Obexer et al., 2007) zählen. Passend hierzu wurde in T98G parallel zur FKHL1-Dephosphorylierung auch die Induktion von Bim, Puma und Noxa im Western Blot festgestellt.

Durch Bcl-2 Überexpression in den Jurkat Bcl-2 Zellen wurde die Dephosphorylierung von P-FKHL1 abgeschwächt, das Fehlen von Bak und Bax in den Bak-negativen JCAM hingegen beeinflusste die Dephosphorylierung von P-FKHL1 nicht. Da FKHL1 ein Downstreamtarget von PKB/Akt ist, entsprach dies aufgrund der Beobachtungen für P-Akt auch den Erwartungen.

Neben einer Hemmung von FKHL kann PKB/Akt die Apoptose noch über weitere Wege negativ beeinflussen. So kann z.B. Caspase 9 an Ser196 durch PKB/Akt phosphoryliert werden, was zu einer Abschwächung ihrer pro-apoptischen Aktivität führt (Cardone et al., 1998). Außerdem kommt es durch Akt zur Phosphorylierung von Bad an Ser136, was mit einer Inaktivierung der pro-apoptischen Aktivität von Bad einhergeht (Datta et al., 1997; del Peso et al., 1997). Die Phosphorylierung von Bad führt zu einer Freisetzung des Proteins aus den Komplexen mit anti-apoptischen Bcl-2 Proteinen am Mitochondrium und mündet in der Sequestrierung des Proteins durch 14-3-3 im Zytoplasma, was die Funktionslosigkeit von Bad zur Folge hat (Datta et al., 1999; Zha et al., 1996). Eine zunehmende Dephosphorylierung von P-Bad an Ser136 - wie sie in T98G im Western Blot beobachtet werden konnte - parallel zur Akt-Inhibierung durch Dephosphorylierung könnte somit eine gesteigerte pro-apoptische Aktivität des Proteins bedeuten.

Die Hemmung von Akt resultiert also über fehlende Inhibierung von Caspase 9, gesteigerter Bad- sowie FKHL-Aktivierung und infolgedessen einer erhöhten Bim-, Puma- und Noxa-Expression in einer Verstärkung pro-apoptischer Signale. Somit wird als Folge der Akt-Inhibierung die Induktion der Apoptose deutlich begünstigt (Abbildung 6.5).

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass neben der Akt-Inhibierung durch Dephosphorylierung noch weitere Mechanismen für die Einleitung der Apoptose nach ErPC/ErPC3 bzw. kombinierter Behandlung von Bedeutung sind.

Um die funktionelle Bedeutung der Akt-Inhibierung für die pro-apoptotische Wirkung letztlich nachzuweisen, müssten weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden, in denen z.B. getestet wird, ob konstitutiv aktives PKB/Akt bei Überexpression die Effizienz der Wirkung blocken oder zumindest dramatisch reduzieren kann. Nur wenn dies der Fall ist, kann man von davon ausgehen, dass die Hemmung der PKB/Akt-Aktivität auch hauptsächlich ursächlich für die Wirkung von ErPC/ErPC3 bzw. der Kombination ist. Für Perifosine zumindest konnte kürzlich gezeigt werden, dass Überexpression einer konstitutiv aktiven Form von PKB/Akt den Zelltod drastisch inhibiert (Elrod et al., 2007).

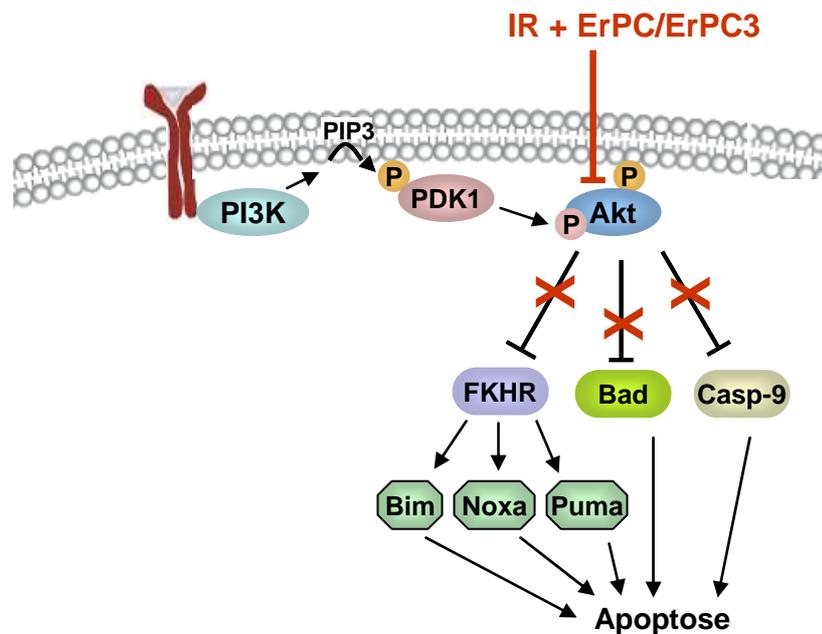


Abbildung 6.5 Verstärkung des pro-apoptotischen Signals durch Hemmung von Akt nach kombinierter Behandlung

P-Akt hemmt die meisten seiner nachgeschalteten Effektorproteine über Phosphorylierung. Dazu zählen zum einen die pro-apoptotischen Proteine Bad und Caspase 9. Außerdem hemmt es den Transkriptionsfaktor FKHL1, der die Apoptose über transkriptionelle Hochregulation von Bim, Puma und Noxa fördert. Nach kombinierter Behandlung aus Bestrahlung und ErPC/ErPC3 wird P-Akt dephosphoryliert, wodurch der hemmende Einfluss auf die nachgeschalteten Effektorproteine entsprechend vermindert und die Induktion der Apoptose deutlich begünstigt wird.

Darüber hinaus könnten weitere bisher nicht untersuchte Wege für die Apoptose-Induktion nach ErPC/ErPC3 und Bestrahlung von Bedeutung sein. Dafür käme z.B. der SAPK/JNK-Weg in Frage, der über den mitochondrialen Zelltodweg in die Apoptose mündet (Aoki et al., 2002; Kharbanda et al., 2000) (Abbildung 6.6). Hideshima und Mitarbeiter konnten kürzlich zeigen, dass bei Inhibierung von JNK mit einem spezifischen Inhibitor die Perifosine-

induzierte Zytotoxizität aufgehoben wird (Hideshima et al., 2006). Da der stressinduzierte SAPK/JNK-Weg außerdem auch eine Rolle bei der strahleninduzierten Apoptose übernimmt (Kharbanda et al., 2000; Verheij et al., 1998), wäre dieser Pathway als weiterer Weg nach Kombinationstherapie zusätzlich zur PKB/Akt-Inhibierung durchaus denkbar. Eine Rolle dieses Weges bei der Verstärkung der strahleninduzierten Apoptose durch die Alkylphosphocholine HePC und Perifosine konnte bereits nachgewiesen werden, da dominant-negatives c-Jun zu einem deutlichen Abfall der Apoptose-Induktion nach kombinierter Behandlung führte (Ruiter et al., 1999).

Eine weitere Alternative wurde vor kurzem mit der Biosynthese des Phosphatidylcholin in Zusammenhang gebracht (van der Luit et al., 2007). Dabei wurde u.a. für die Alkylphosphocholine Edelfosine und ErPC gezeigt, dass sie zumindest in S49 Lymphomzellen die Phosphatidylcholinsynthese hemmen und darüber Apoptose auslösen können.

In der Annahme, dass die Hemmung des PKB/Akt-Wegs von Bedeutung für die kombinierte Behandlung nach ErPC/ErPC3 und Bestrahlung ist, bleibt die Frage nach dem fehlenden Bindeglied zwischen ErPC/ErPC3 und Akt bzw. Bestrahlung und Akt. Zum einen könnte eine Verbindung über die kürzlich festgestellte Hemmung der Phosphatidylcholinsynthese nach Edelfosine und ErPC bestehen (van der Luit et al., 2007). In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass Inhibierung der Phosphatidylcholinsynthese die Inhibierung von PKB/Akt vorantreibt (Kawada et al., 2002). Dies könnte dann ursächlich für die beobachtete Akt-Hemmung in den verschiedensten Zelltypen sein (Hideshima et al., 2006; Kondapaka et al., 2003; Ruiter et al., 2003).

Eine weitere - und im Fall des ErPC/ErPC3 auch wahrscheinlichere Möglichkeit - liegt in der Bildung von Ceramid, die sowohl durch ionisierende Strahlung als auch durch Alkylphosphocholine gefördert werden kann. Nach Bestrahlung wird durch das Enzym Saure Sphingomyelinase Ceramid aus Sphingomyelin der Zellmembranen gebildet, welches dann über den mitochondrialen Zelltodweg Apoptose einleitet (Haimovitz-Friedman et al., 1994; Kolesnick and Fuks, 2003).

Hara und Mitarbeiter fanden außerdem heraus, dass Ceramid vor allem in Zellen ohne funktionellem p53 bei der Caspasen-Aktivierung nach Bestrahlung eine besondere Rolle spielt (Hara et al., 2004). Da die von uns untersuchten T98G und T-Lymphomzellen ebenfalls kein funktionelles bzw. kein p53 besitzen, könnte der Ceramid-Weg auch in diesen Zellen von Bedeutung sein.

Bei Behandlung humaner Zellen mit dem Alkylphosphocholin HePC wurde ebenfalls eine Beteiligung des Ceramid-Wegs an der Apoptose in humanen Zellen nachgewiesen (Wieder et al., 1998) und Untersuchungen an C6 Gliomen von Ratten deuten auf eine Bedeutung der Ceramid-induzierten Apoptose nach ErPC-Stimulation hin (Jendrossek and Handrick, 2003).

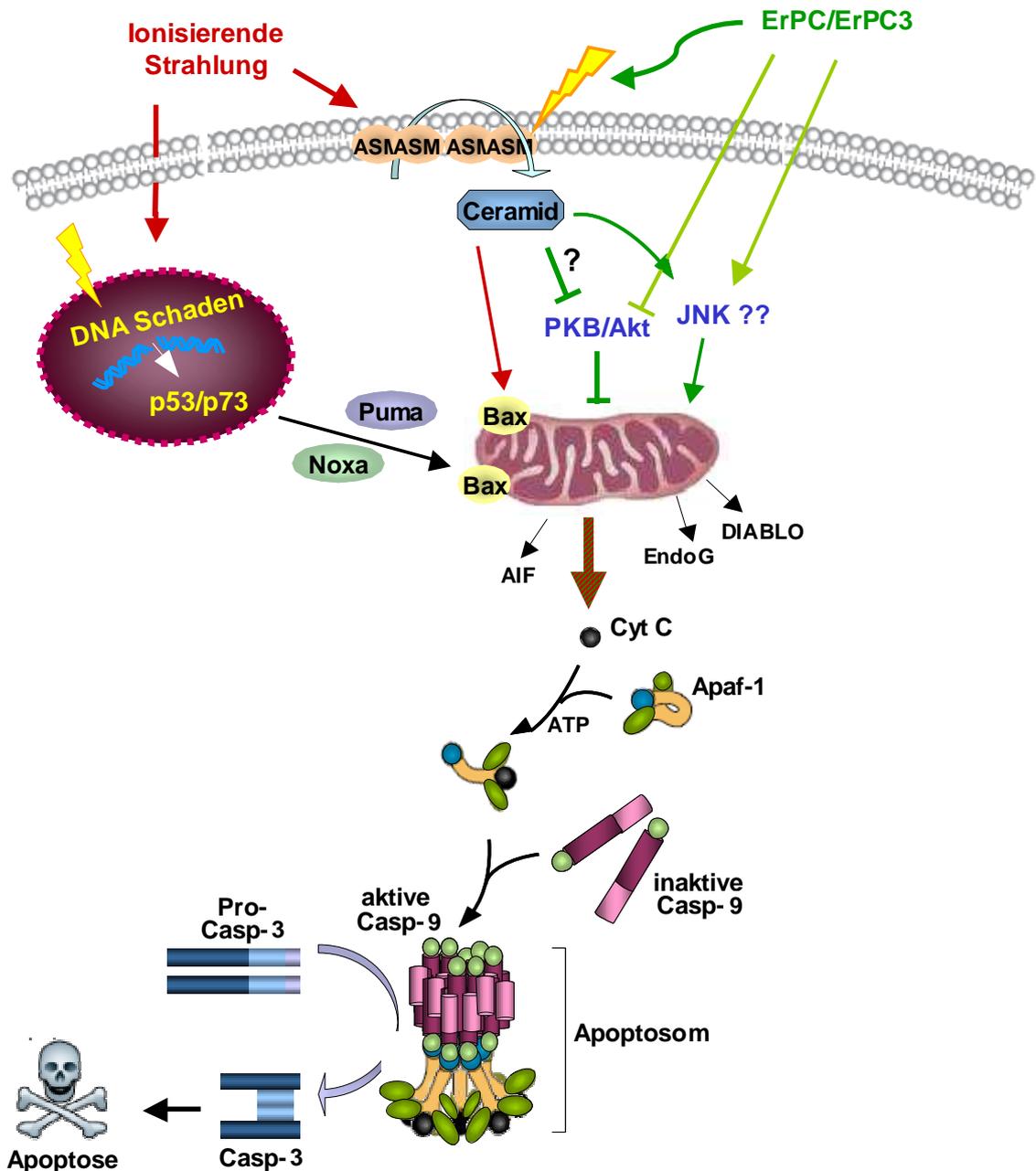


Abbildung 6.6 Die Wirkung von IR plus ErPC/ErPC3: Regulationsmechanismen oberhalb des Mitochondriums

Neben dem „klassischen“ Zelltodweg über p53/73 vermittelt IR auch Ceramid-induzierte Apoptose über Aktivierung des Enzyms saure Spingomyelinase (ASM), das Ceramid aus Sphingolipiden der Zellmembran generiert. Diese Ceramidfreisetzung aus Membranlipiden könnte auch durch ErPC/ErPC3 begünstigt werden, was zu einem Kombinationseffekt beider Stimuli beitragen könnte. Ceramid fördert zum einen die Translokation von Bax zum Mitochondrium und wird andererseits mit einer Dephosphorylierung von P-Akt in Zusammenhang gebracht. Des Weiteren scheint eine Verbindung von Ceramid zum pro-apoptischen JNK-Pathway zu bestehen. Die Hemmung von PKB/Akt sowie eine potentielle Aktivierung von JNK könnte allerdings auch direkt durch ErPC/ErPC3 ohne den Vermittler Ceramid erfolgen. Die Wege aus IR und ErPC/ErPC3 münden gemeinsam im mitochondrialen Zelltodweg, über den die kombinierte Wirkung ausgeführt wird.

Da Ceramid also sowohl bei der Apoptose nach Bestrahlung als auch nach ErPC/ErPC3 von Bedeutung sein könnte, wäre es ein ideales Bindeglied zwischen „Ursache“ und PKB/Akt-Inhibierung (Abbildung 6.6).

Passend zu dieser Theorie wurde in T98G eine Bax-Aktivierung gefunden, wie sie auch bei Ceramid-induzierter Apoptose beschrieben wurde (von Haefen et al., 2002). Des Weiteren wurde die durch Ceramid vermittelte Apoptose mit einer Dephosphorylierung von P-Akt ser473, P-FKHR sowie P-Bad ser136 assoziiert (Basu et al., 1998; Schubert et al., 2000; Stoica et al., 2003; Zhou et al., 1998), Erscheinungen, die ebenfalls nach kombinierter Behandlung mit ErPC/ErPC3 und IR in T98G und T-Lymphomzellen beobachtet wurden. Interessanterweise wird die pro-apoptotische Spleißvariante Bcl-x_S mit einer Induktion durch Ceramid in Zusammenhang gebracht (Chalfant et al., 2002), was die starke Zunahme an Bcl-x_S in T98G nach ErPC bzw. Kombinationsbehandlung erklären könnte. Schließlich konnten Raisova und Mitarbeiter an Melanomzellen und Keratinozyten zeigen, dass Bcl-2 Überexpression die durch Ceramidase-Inhibitoren ausgelöste Ceramid-vermittelte Apoptose verhindern kann (Raisova et al., 2002).

6.2.5 Einflüsse auf den Zellzyklus nach kombinierter Behandlung

I. Rb – an der Schnittstelle zwischen Zellzyklus und Apoptose

In T98G Gliomazellen sowie den T-Lymphomzellen Jurkat vector und JCAM Bak-positiv wurde nach Stimulation mit ErPC3 sowie nach Kombinationsbehandlung aus IR + ErPC3 ein deutlicher Rückgang des Rb-Proteins sowie seiner Phosphorylierung an Ser795 und Ser807/811 detektiert. Aus der Abnahme der Rb-Phosphorylierung könnte man prinzipiell einen verstärkten Arrest der Zellen in G2/M ableiten, wie er nach strahleninduzierter Schädigung der DNA beschrieben wurde (Genovese et al., 2006). Im Zuge der Schäden wird ein G2/M-Arrest eingeleitet, der über Dephosphorylierung von Rb aufrechterhalten wird (Naderi et al., 2002).

Allerdings zeigten FACS-Analysen in Jurkat vector und Bak-positiven JCAM Zellen, dass weder nach Stimulation mit ErPC3 noch nach kombinierter Behandlung aus Bestrahlung und ErPC3 ein solcher Arrest vorhanden war. Daher sind die verminderten Phospho-Rb-Level vermutlich auf das beobachtete Verschwinden des Rb-Proteins zurückzuführen. Denn wird dieses abgebaut oder runterreguliert, muss entsprechend auch der Anteil an phosphoryliertem Rb sinken.

Durch verschiedene Arbeitsgruppen wurde gezeigt, dass Rb von Caspasen gespalten werden kann (Boutillier et al., 2000; Tan and Wang, 1998). Dabei entsteht ein instabiles Rb-

Produkt, das zügig und vollständig durch andere Proteasen abgebaut wird (Janicke et al., 1996; Tan et al., 1997). Nach Stimulation mit ErPC3 oder Kombinationsbehandlung wurde zwar kein Spaltprodukt von Rb detektiert, aber aufgrund der beschriebenen raschen vollständigen Rb-Degradation durch Proteasen, muss ein solches Intermediärprodukt auch nicht unbedingt nachweisbar sein. Passend zu der Hypothese, dass Rb im Zuge der Apoptose durch Caspasen abgebaut wird, blieben in behandelten Zellen bei Bcl-2 Überexpression oder Fehlen von Bak und Bax die Level an unphosphoryliertem sowie phosphoryliertem Rb unverändert. Durch die Bcl-2 Überexpression in den Jurkat Bcl-2 Zellen wird die Apoptose nämlich deutlich inhibiert, was eine Erklärung für die unveränderten Rb-Level liefern könnte. Gleiches passierte in den Bak-negativen JCAM Zellen. Auch hier wurde die Apoptose geblockt und somit die Caspasen-Aktivierung inhibiert. Die Ergebnisse aus beiden Jurkat Zelllinien sprechen somit für eine Beteiligung der Caspasen an der Regulation des Rb-Proteins. In der Tat konnte in den mit zVAD vorbehandelten Bak-positiven JCAM Zellen weder nach IR, ErPC3 oder Kombinationsbehandlung ein Rückgang von Rb beobachtet werden (Abbildung Z.2 der zusätzlichen Abbildungen, Kapitel 9). Daher ist die Verminderung der Rb-Level auf einen Abbau des Proteins durch Caspasen zurückzuführen. Während in Jurkat Bcl-2 Zellen die Apoptose durch Überexpression von Bcl-2 gehemmt war, wurde ein vorübergehender Arrest der Zellen in G2/M beobachtet. Die Überwindung der Apoptoseresistenz 24 h nach Kombinationsbehandlung spiegelt sich im Auflösen des Arrestes wieder, aus dem die Zellen langsam beginnen in Apoptose überzugehen. Zu diesem Zeitpunkt war allerdings noch kein Abbau von Rb sichtbar. Offen bleibt jedoch die Frage, warum der G2/M-Arrest bei Bcl-2 Überexpression nicht mit einer Dephosphorylierung von Rb einhergeht, wie dies sonst z.B. nach strahleninduziertem G2/M-Arrest der Fall ist (Genovese et al., 2006; Naderi et al., 2002). Da Rb nun dem vorzeitigen Abbau durch Caspasen entgeht, könnte es im Zuge des Arrests dephosphoryliert werden. Um der möglichen Erklärung näher zu kommen, muss man etwas tiefer in die Abläufe nach DNA-Schädigungen eindringen. Unmittelbar nach DNA-Schäden kann der Transkriptionsfaktor E2F1 posttranslational modifiziert werden (Stevens and La Thangue, 2004). Vor allem Phosphorylierung an Ser31 durch ATM und ATR-Kinasen sowie Phosphorylierung an Ser354 durch Chk2 erhöhen die Stabilität und modulieren die Aktivität von E2F1 (Lin et al., 2001; Stevens et al., 2003). Auf der anderen Seite führt die E2F1-Stabilität und -Überexpression wiederum zu einer ATM-abhängigen Phosphorylierung und Aktivierung von p53, was zur Apoptose-Induktion führen kann (Powers et al., 2004; Rogoff et al., 2004) (Abbildung 6.7). Neben dem Verlust von Rb (entweder durch Spaltung und Abbau oder irreversibler Phosphorylierung an Ser567) scheint die Deregulation der E2F-Transkriptionsfaktoren der entscheidende Schritt für die Apoptose-Induktion zu sein (Tsai et

al., 1998; Ziebold et al., 2001). Interessanterweise wird nach DNA-Schäden die Interaktion von Rb ausschließlich zu E2F1 verstärkt, aber nicht die zu anderen E2Fs (Dick and Dyson, 2003). Andererseits wird jedoch die Reprimierung der Gene, die für ein Vorankommen in der G2/M-Phase wichtig sind, vor allem durch die Pocket-Proteine p130 und p107 reguliert (Jackson et al., 2005). Somit könnte es sein, dass Rb während des G2/M-Arrests hauptsächlich für die Unterdrückung der Apoptose zuständig ist, um der Zelle die nötige Zeit zur Reparatur der DNA-Schäden zu geben. Die übrigen Pocketproteine der Rb-Familie hingegen könnten vor allem für die Unterdrückung der Gene zuständig sein, die für ein Vorschreiten der Mitose benötigt werden. Sind die Schäden irreparabel, wird über p53 der Weg in die Apoptose geebnet und im Zuge der Caspasen-Aktivierung kann Rb gespalten und inaktiviert werden. Aus dieser Sichtweise ist eine Dephosphorylierung von Rb nur sinnvoll, wenn die Apoptose unterdrückt werden soll. Es könnte nun aber sein, dass in den Zellen die Schäden bereits so massiv sind, dass die Wege für Apoptose längst gebahnt sind und deshalb keine Indikation besteht, Rb aktiv zu halten. Also bleibt es phosphoryliert und aufgrund der unzureichenden Caspasen-Aktivierung kann es auch nicht abgebaut werden. Der Arrest bleibt jedoch wegen der Aktivität der übrigen Pocketproteine aufrechterhalten bis es der Zelle möglich ist, die Resistenz der Apoptose zu überwinden und diese einzuleiten. Die gleichen Überlegungen könnten für den Fall der Bak-Negativität geltend gemacht werden, mit dem einen Unterschied, dass durch die vollständige Blockade des Mitochondriums auch nach Kombinationsbehandlung keine Apoptose ausgelöst wird und die Zellen weiter im Arrest verharren. Die Vorgänge zwischen Rb und E2Fs im Zuge der Zellzyklusregulationen sind jedoch höchst komplex und man kennt bisher nur wenige Details. Daher bleibt zu sagen, dass es sich bei obigen Überlegungen um Hypothesen nach heutigem Wissen handelt, die sich gut mit unseren Beobachtungen vereinbaren lassen. Passend dazu sind auch Untersuchungen von Hao und Mitarbeitern, die kürzlich nachweisen konnten, dass E2F1-induzierte Apoptose in Melanomzellen über Hochregulation von Puma und Bax-Translokation zum Mitochondrium vermittelt wird (Hao et al., 2007). Neben diesen Beobachtungen wurde bisher zusätzlich gezeigt, dass E2F1 die Expression von Mcl-1 hemmen kann (Croxtton et al., 2002; Elliott et al., 2001) und die Expression von Puma, Noxa und Bim sowie einigen Caspasen erhöht (Cao et al., 2004; Chau and Wang, 2003; Fortin et al., 2004; Hershko and Ginsberg, 2004; Muller et al., 2001; Nahle et al., 2002; Young and Longmore, 2004). Da wir in unseren Zellen nach kombinierter Behandlung ebenfalls eine Induktion von Puma, Noxa und Bim feststellen konnten sowie in T98G auch eine verstärkte Translokation von Bax zum Mitochondrium (festgestellt durch Konformationsänderung des Proteins), könnte dies bedeuten, dass durch Spaltung von Rb eine optimale Verstärkung der Apoptose durch E2F1 stattfindet (Abbildung 6.7). Diese würde den „klassischen“

intrinsischen Zelltodweg sicherlich deutlich unterstützen. Außerdem könnte die starke Abnahme von Mcl-1 nach Kombinationsbehandlung ebenfalls auf einem doppelten Effekt beruhen, zum einen auf durch Noxa eingeleiteter Degradation im Proteasom, zum anderen aber auf Herabregulation durch E2F1.

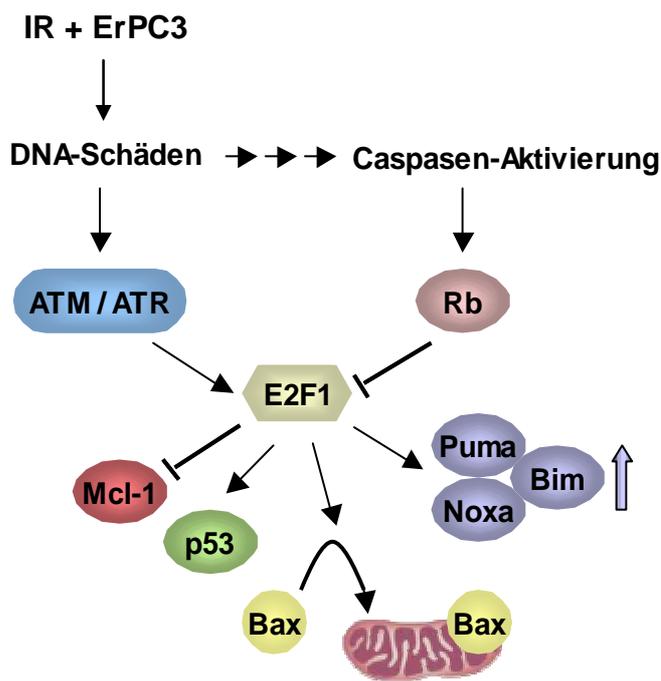


Abbildung 6.7 Abbau von Rb als möglicher Verstärker der Apoptose nach kombinierter Behandlung

Die nach DNA-Schäden aktivierten Kinasen ATM und ATR können den Transkriptionsfaktor E2F1 stabilisieren und seine Aktivität fördern. E2F1 wiederum führt zu einer ATM-abhängigen Phosphorylierung und Aktivierung des Proteins p53, das Apoptose induzieren kann. Zusätzlich dazu kann E2F1 die Expression des anti-apoptotischen Mcl-1 hemmen und die Expression von Puma, Noxa und Bim induzieren. Des Weiteren kann E2F1 die Translokation von Bax zum Mitochondrium vermitteln. Diese Apoptose-fördernden Eigenschaften von E2F1 werden durch Rb gehemmt. Eine zu Beginn der Apoptose auftretende Caspasen-Aktivierung kann jedoch zur Spaltung von Rb führen, das direkt über weitere Proteasen vollständig degradiert wird. Dadurch entfällt sein inhibierender Einfluss auf E2F1 und die Apoptose kann durch einen zusätzlichen Mechanismus weiter verstärkt werden.

II. p27^{Kip1}

p27 ist ein Mitglied der Cip/Kip Familie von Cdk-Inhibitoren (Cyclin dependent kinsase Inhibitoren) (Sherr and Roberts, 1999). Durch Binden an cdk2 und cdk4/6 Komplexe wird die Kinaseaktivität der cdks inhibiert und auf diese Weise ein Voranschreiten des Zellzyklus in G1 gehemmt (Morgan, 1997). Damit der Zellzyklus weiterlaufen kann, muss also zunächst p27 abgebaut werden. Tatsächlich ist p27 ein Protein von kurzer Lebensdauer und sein Abbau erfolgt über das Ubiquitin-Proteasom-System (Pagano et al., 1995). Dabei wird p27 durch cdk1 oder cdk2 an Thr187 phosphoryliert, wodurch es von der SCF^{Skp2} Ubiquitin-Ligase erkannt und im Proteasom abgebaut wird (Bloom and Pagano, 2003).

In Fällen eines G1-Arrestes wird p27 daher stabilisiert, was hauptsächlich über zwei Proteine geschieht. Zum einen führt Überexpression von FKHR zu einer transkriptionellen Hochregulation und unmittelbar ansteigenden Proteinleveln an p27 (Dijkers et al., 2000b; Medema et al., 2000), zum anderen ist Rb in der Lage, die Expression von p27 zu fördern um so die cdk-Aktivität zu hemmen (Alexander and Hinds, 2001; Ji et al., 2004). Zusätzlich dazu kann Rb die SCF^{Skp2} Ubiquitin-Ligase binden und somit durch Inhibierung der p27-Ubiquitinierung die Stabilität von p27 erhöhen (Ji et al., 2004).

Als Gegenspieler zu FKHR und Rb kann PKB/Akt das Fortschreiten des Zellzyklus über Inhibierung von p27 vorantreiben. Dazu phosphoryliert es p27 an Thr157, einer Stelle die direkt in der Kernlokalisierungssequenz liegt (Shin et al., 2002; Viglietto et al., 2002). Die Phosphorylierung von p27 an Thr157 hat zur Folge, dass p27 von 14-3-3 Proteinen gebunden und aktiv aus dem Kern exportiert wird (Fujita et al., 2002). Im Zytoplasma wird p27 unmittelbar sequestriert und abgebaut (Shin et al., 2002), während sich im Kern Cyclin-cdk-Komplexe ausbilden, die den Zellzyklus vorantreiben (Morgan, 1997).

In T98G war ein leichter Rückgang an p27 in behandelten Zellen zu erkennen, wobei jedoch kein Kombinationseffekt zu beobachten war. Dieser leichte Rückgang an p27 passt zu der Tatsache, dass die Zellen nicht in G1 arretieren und entspricht wohl dem p27-Turnover, der stattfindet, wenn die Zellen nicht in G1 arretiert werden. Allerdings war nach kombinierter Behandlung aus 5 Gy und 25 μ M ErPC in T98G ein deutlicher Rückgang der Phosphorylierung von p27 an Thr157 zu beobachten. Das wiederum bedeutet, dass PKB/Akt p27 an dieser Stelle weniger phosphorylieren kann, was auf den Rückgang seiner Aktivität durch kombinierte Behandlung zurückzuführen ist. Es handelt sich bei den Veränderungen an p27 mit größter Wahrscheinlichkeit also nur um einen Nebeneffekt, der mit verminderter PKB/Akt-Aktivierung einhergeht und keine Auswirkungen auf den Zellzyklus hat.

6.2.6 γ H2AX - Kombinationseffekte der Focibildung nach IR und ErPC3

Durch Einwirkung ionisierender Strahlung auf Zellen werden u.a. Sauerstoff-Radikale gebildet, die neben weiteren Reaktionen auch Doppelstrangbrüche (DSB) in der DNA hervorrufen. Als Folge dessen kommt es innerhalb von Minuten zur Bildung von γ -H2AX, der phosphorylierten Form der Histonvariante H2A (Rogakou et al., 1998), die sich als sogenannte Focis innerhalb eines Bereichs von jeweils einer Megabase zu jeder Seite des DSB anlagern (Rogakou et al., 1999). Die Phosphorylierung von H2AX zu γ -H2AX erfolgt durch die Kinasen der PI-3-Kinasenfamilie ATM (Burma et al., 2001; Stiff et al., 2004; Wang et al., 2005), ATR (Anderson et al., 2001; Ward and Chen, 2001) und DNA-PK (Park et al.,

2003; Stiff et al., 2004; Wang et al., 2005). Diese Kinasen initiieren auch Signalkaskaden, die die DNA-Reparatur aktivieren, den Zellzyklus bis zur Behebung der Schäden inhibieren oder alternativ Apoptose einleiten, falls die Schäden irreparabel sein sollten. Die γ -H2AX-Foci hingegen dienen als Plattform für zahlreiche weitere Proteine, die mit der DNA-Reparatur assoziiert sind (Paull et al., 2000). So wurde berichtet, dass γ -H2AX zahlreiche DSB-Erkennungs- und Reparaturproteine einschließlich Chromatin-modifizierender Faktoren in die unmittelbare Umgebung der Bruchstelle rekrutiert (Downs et al., 2004; Morrison et al., 2004; van Attikum et al., 2004) sowie DNA-Checkpoint-Proteine (Fernandez-Capetillo et al., 2004; Nakamura et al., 2004) und Cohesin (Bassing and Alt, 2004; Shroff et al., 2004; Unal et al., 2004). Cohesin ist vor allem für die Homologe Rekombination (HR) zur Reparatur der DSB von Bedeutung, bei der es auf die räumliche Nähe der Schwester-Chromatiden ankommt. Die Rekrutierung des Kohesionskomplexes durch γ -H2AX ist daher für die DSB-Reparatur von elementarer Bedeutung (Strom et al., 2004; Xie et al., 2004). Kann die Reparatur erfolgreich eingeleitet werden, erfolgt ein Ablösen der γ -H2AX-Foci vom Chromatin mit anschließender Dephosphorylierung des Histons (Keogh et al., 2006). Sind die Einbußen an der DNA jedoch so massiv, dass sie nicht mehr repariert werden können, verbleiben die Foci an der Bruchstelle und dienen so als Maß für die Schwere der Schäden. Untersucht man also Zellen nach Behandlung zu späteren Zeitpunkten und findet immer noch verbleibende γ -H2AX-Foci, kann man vermutlich von einer Anhäufung unreparierter und evtl. irreparabler Schäden ausgehen, was mit einem erhöhten Ansprechen auf die Behandlung einhergeht (Kao et al., 2006). Ein Bestehen der Foci am Chromatin über längere Zeiträume (bis 24h) konnte auch in Zellen beobachtet werden im Zusammenhang mit einem erhöhten Ansprechen auf ionisierende Strahlung im Vergleich zu Zellen mit geringerer γ -H2AX-Foci-Bildung (Taneja et al., 2004).

Da als weiterer möglicher Verstärkermechanismus für die strahleninduzierte Apoptose nach kombinierter Behandlung mit ErPC/ErPC3 auch eine erhöhte Induktion von DNA-Schäden in Frage kommt, wurde als Maß hierfür die γ -H2AX-Foci-Bildung nach 40 min immunfluoreszenzmikroskopisch analysiert. Bestrahlung führte in allen Zellen zu einem deutlichen Anstieg der H2AX-Phosphorylierung mit gleichmäßiger Verteilung der Foci im gesamten Zellkern. Obwohl ALPs die DNA primär nicht beeinflussen, induzierte auch Stimulation mit ErPC3 die Focibildung, wobei diese vereinzelter und von größerer Ausprägung auftraten. Nach kombinierter Behandlung konnte jedoch im Vergleich zu den Einzelbehandlungen eine eindeutige Zunahme der Focibildung beobachtet werden, was auf einen Kombinationseffekt beider Behandlungen schließen lässt. Nun bleibt die Frage, woher die DNA-Schäden nach ErPC3 herrühren. Als mögliche Erklärung hierfür käme die Bildung von ROS in Frage, nach der es zu verschiedensten Fehlern in der DNA kommen kann angefangen von

Alkylierungsprodukten und Einzelstrang-Läsionen (Einzelstrangbrüche, Basenaustausche, Oxidationsprodukte wie 8-Oxoguanin) bis hin zu DSB (Moller and Loft, 2004; Tanaka et al., 2006; Vilenchik and Knudson, 2003). Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde die Bildung von ROS nach ErPC/ErPC3 zwar nicht untersucht, für die Alkylphosphocholine Edelfosine und Perifosine konnte jedoch bereits nachgewiesen werden, dass die Induktion von ROS am Wirkmechanismus der Substanzen beteiligt ist (Gajate et al., 2000; Rahmani et al., 2005; Renis et al., 2000; Vrablic et al., 2001; Zhang et al., 2007). Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch nach ErPC3 ROS entsteht und so die Läsionen in der DNA erzeugt. Unter 6.2.4 wurde bereits spekuliert, dass Ceramid das fehlende Bindeglied zwischen ErPC/ErPC3 und Akt-Inaktivierung sein könnte. Von Ceramid ist aber ebenfalls bekannt, dass es am Mitochondrium die ROS-Bildung fördern kann und nach Behandlung von Jurkat Leukämie-Zellen mit Perifosine konnte eine Steigerung der Ceramidproduktion mit ROS-Bildung beobachtet werden (Rahmani et al., 2005).

Die Ergebnisse der Kombinationsversuche in T98G zeigen also einen eindeutigen Kombinationseffekt an DNA-Schäden, der vermutlich auf einem Zusammenwirken endogener ROS-Bildung durch ErPC und exogen verursachter Strahlenschäden beruht. Dies bedeutet initial allerdings lediglich, dass starke Schäden an der DNA entstehen, diese könnten aber theoretisch immer noch größtenteils repariert werden. Um daher besser bestimmen zu können, ob die DNA-Läsionen tatsächlich wesentlich zur kombinierten Wirkung beitragen, ist es sinnvoll, den Zustand der γ -H2AX-Foci zu einem späteren Zeitpunkt nach z.B. 24 h zu bestimmen (siehe oben). In der Tat waren die Foci noch 24 h nach Behandlung vorhanden (Abbildung Z.3, Kapitel 9) und erschienen sogar deutlicher und größer als initial nach 40 min. Dies spricht deutlich für eine Akkumulation unreparierter DNA und für eine Beteiligung des Apoptosesignalings nach irreparablen DNA-Schäden am Gesamtbetrag des Zelltods durch kombinierte Behandlung aus IR und ErPC/ErPC3. Zusätzlich zu den Immunfluoreszenz-Analysen wurde der Status von H2AX auch im Western Blot zu sehr späten Zeiten, nämlich 48 h nach Behandlung untersucht. Auch nach diesem Zeitpunkt war die Phosphorylierung von H2AX massiv und vor allem die Kombinationswirkung im Vergleich zu den Einzelbehandlungen besonders offensichtlich. Nun gibt es allerdings die These, dass im Zuge der Apoptose selbst γ -H2AX-Foci entstehen (durch Phosphorylierung über JNK-Kinase), die für die durch Caspasen aktivierten CAD-Enzyme von Bedeutung sind (Lu et al., 2006; Sluss and Davis, 2006) und es könnte der Verdacht entstehen, dass es sich nach 48 h nicht mehr um die durch Strahlung oder ROS verursachten Schäden handelt sondern vielmehr um Effekte der Apoptose selbst. Zum gleichen Zeitpunkt waren in T98G unter Kombinationsbehandlung mit 5 Gy und 25 μ M ErPC 24% apoptotische Zellen nachweisbar, weswegen es schwer ist, den genauen Ursprung

dieser H2AX-Phosphorylierung festzulegen. Dennoch kann man einen eindeutigen Kombinationseffekt erkennen, egal ob man ihn aus einem potentiellen irreparablen DNA-Schaden abliest (wie er sich bereits durch die Immunfluoreszenz-Analysen nach 24 h andeutet) oder ob man von einer bereits eingeleiteten Apoptose ausgeht.

6.3 TRAIL und Bestrahlung

Mit diesem Versuchsteil sollte geklärt werden, ob ein Kombinationseffekt aus Bestrahlung und TRAIL bzw. ETR-2 von der mitochondrialen Rückkopplung über Caspase 3 und tBid abhängig ist. Dazu wurde das p53- und Bax-negative JCAM-Zellpaar verwendet, das sich durch Bak-Positivität bzw. Bak-Negativität auszeichnet.

Bei dem an sich sehr klaren Versuchsansatz, von dem man eine einfache „Ja-Nein-Antwort“ hätte erwarten können, kamen jedoch einige interessante Ergebnisse zum Vorschein, die im folgenden dargelegt und diskutiert werden sollen.

Einleitende Untersuchungen zur Einzelwirkung der Substanzen zeigten, dass es sich bei den Bak-negativen JCAM um Jurkat Zellen vom Typ I handeln muss, da die initiale Aktivierung der Caspase 8 ausreichend war, um Apoptose auszulösen. Bei Typ II Zellen wäre hingegen ein Verstärkerloop übers Mitochondrium notwendig, um ausreichende Caspase 3-Aktivierung zu ermöglichen (Scaffidi et al., 1998). Da dies in den Bak-negativen Zellen aber nicht möglich ist, kann man diese aufgrund ihres guten Ansprechens auf TRAIL und ETR-2 als Typ I Zellen einordnen. Prinzipiell sollte man davon ausgehen können, dass dann auch die Bak-positiven JCAM Zellen vom Typ I sind. Die siRNA-Versuche zeigten jedoch, dass Hemmung von Bak die apoptotische Antwort auf TRAIL deutlich hemmen kann, wodurch man wenn zwar nicht unbedingt von einer Abhängigkeit, dann aber doch zumindest von einem verstärkenden Effekt des Mitochondriums ausgehen muss.

Ebenso erstaunlich ist die Tatsache, dass TRAIL leicht besser und ETR-2 deutlich besser in den Bak-negativen Zellen wirkt im Vergleich zu den Bak-positiven Zellen.

Erwartungsgemäß konnte Strahlung allein nach 24 h keinen apoptotischen Zelltod in Bak-negativen Zellen erzeugen, da ihre Wirkung auf einen intakten intrinsischen mitochondrialen Zelltodweg angewiesen ist. Stattdessen arretierten die Zellen in G2/M. Umso überraschender war, dass - nach relativ späten Zeiten zwar - immerhin bis zu 40 % Zelltod nach Bestrahlung eingeleitet wurde. Dementsprechend konnte man auch eine leichte Wirkungsverschiebung der kombinierten Behandlung erkennen: Während nach 24 h die kombinierte Wirkung in Bak-positiven Zellen noch leicht überwiegt, so war die Effizienz der Kombination nach 48 und 72 h in den Bak-negativen Zellen erhöht. Die zunehmende

Apoptose-Induktion nach Bestrahlung allein sowie nach kombinierter Behandlung war begleitet von einer Abnahme an Zellen in G2/M des Zellzyklus.

Diese Beobachtungen bedürfen nun einer genaueren Durchleuchtung.

Prinzipiell könnte man behaupten, die festgestellten unterschiedlichen Ergebnisse aus den Versuchen mit Bak-negativen Zellen im Vergleich zu den Versuchen mit siRNA in Bak-positiven Zellen rühre daher, dass die Zellpaare nicht aus demselben Klon entstanden sind. Die Bak-negativen Zellen könnten im Vergleich zu den Bak-positiven Zellen also noch eine weitere bisher unbekannte Mutation besitzen, die für die beobachteten Unterschiede verantwortlich ist. Da sich aber während der Versuchsreihen mit ErPC3 nie ein Unterschied gezeigt hat, ist diese Theorie nicht unbedingt die wahrscheinlichste und man könnte ebenso einen anderen Mechanismus in Betracht ziehen, der die beobachteten Phänomene erklärt. Was hierfür jedoch in Frage käme liegt nur im Rahmen der Spekulation, da zu wenig bekannt ist über alternative Todeswege nach Rezeptorstimulation und ihre Trigger. Mit dem, was bisher bekannt ist, wird im Folgenden eine Hypothese aufgestellt, die alternativ zu der oben genannten Möglichkeit der unterschiedlichen Zellklone die detektierten Ergebnisse erklären könnte: In dem vorhandenen JCAM-Zellsystem wird der Verstärkerloop übers Mitochondrium zur Verbesserung der Apoptose-Induktion genutzt. Erst bei 100%igem Ausfall durch Fehlen von Bax und Bak greift ein alternatives Backup-System in der Zelle, das den Todesrezeptorweg unterstützt und sich grundlegend von den klassischen Apoptosesystemen unterscheidet. In diesem Zusammenhang käme ein Lysosomen-vermittelter Zelltodweg in Frage. Dieser wird z.B. auch an Zelltodrezeptoren über den Adapter RIP (receptor-interacting protein) vermittelt (Kroemer and Martin, 2005). Nach Stimulierung der Zelltodrezeptoren kann es auch zur RIP-Aktivierung kommen, wodurch - evtl. über JNK vermittelt - Cathepsine aus Lysosomen freigesetzt werden. Meistens wird lysosomal eingeleiteter Zelltod mit Nekrose oder CICD (Caspase-independent cell death) in Zusammenhang gebracht (Bröker et al., 2005; Kroemer and Martin, 2005). Andererseits wurde berichtet, dass lysosomale Proteasen Caspasen direkt spalten und aktivieren können und damit zu einem frühen Ereignis der Apoptose beitragen (Bröker et al., 2005) (Abbildung 6.8).

Ausgehend von dieser Modellvorstellung würden sich die beobachteten Ergebnisse aus den JCAM-Versuchen folgendermaßen erklären lassen:

Die Einzelwirkung von TRAIL war in den Bak-negativen Zellen leicht und die des ETR-2 stark erhöht im Vergleich zu den Bak-positiven Zellen. Letzterer Unterschied kam dadurch zustande, dass die Bak-positiven Zellen nur sehr schwach auf Einzelbehandlung mit ETR-2 reagierten im Vergleich zur Einzelbehandlung mit TRAIL. Der Rezeptorstatus des TRAIL-Rezeptor 1 und 2 war allerdings in beiden Zelllinien identisch. Von Wendt und Mitarbeitern wurde gezeigt, dass die Wirkung von TRAIL in den soliden Tumorzellen HCT-116 und Du

145 streng abhängig ist vom Protein Bax und dieses nicht durch Bak ersetzbar ist (Wendt et al., 2005). In unserem Zellsystem der JCAM scheint sich dies nur teilweise zu bestätigen und zwar insofern, dass die Rückkopplung übers Mitochondrium durch das Fehlen von Bax abgeschwächt ausfällt, aber die Funktion von Bax durch Bak teilweise ersetzt werden kann. Dabei scheint Bax für TRAIL kaum essentiell zu sein, für ETR-2 jedoch bedeutend wichtiger. Das wäre eine Erklärung warum die Wirkung nach ETR-2 in den Bak-positiven Zellen deutlich geringer ausfällt als diejenige nach TRAIL. Warum reagieren aber nun Bak-negative Zellen besser auf beide Stimuli? In einer Zelle laufen nach Stress - wie er durch Behandlung induziert wird - immer die Zelltodwege „erster Wahl“ ab, sofern sie möglich sind. Im Fall der Bak-positiven Zellen bleibt die mitochondriale Rückkopplung möglich, auch wenn durch das Fehlen von Bax vielleicht beeinträchtigt. Also wird kein alternativer Weg zugeschaltet. Ähnliches passiert bei Inhibierung von Bak mit siRNA. Durch die siRNA wird der Weg übers Mitochondrium gehemmt, aber nicht vollständig geblockt, da man mit der siRNA kein 100%iges Stilllegen von Bak erreicht. Also bleibt die Zelle bei dem gängigen Zelltodschema und als Folge dessen wurde die Inhibierung der Apoptose nach siRNA beobachtet, obwohl die Ergebnisse aus den Bak-negativen Zellen ursprünglich das Gegenteil hätten vermuten lassen.

In den Bak-negativen Zellen schaltet sich evtl. von vorne herein ein Zusatzmechanismus ein, da der Stimulus sehr stark ist und die Zelle massiven Stress erfährt (Abbildung 6.8). Über oben beschriebene These könnte der klassische Typ I-Rezeptorweg also z.B. über lysosomalen Zelltod verstärkt werden. Diese Art Trigger wäre auch eine mögliche Erklärung für die späte Zelltod-Induktion nach Bestrahlung. 10 Gy bedeuten auch für Jurkats massiven zellulären Stress und so arretieren sie zunächst, da keine mitochondriale Apoptose möglich ist. Es konnte aber bereits gezeigt werden, dass nach Bestrahlung ein Clustern der CD95-Rezeptoren induziert werden kann (Friesen et al., 1996; Fulda et al., 1998; Herr et al., 1997). Was bei intaktem Mitochondrium mittlerweile lediglich als Nebeneffekt der Bestrahlung angesehen wird, könnte im Fall der Bak-negativen JCAM aber schließlich zu späten Zeitpunkten den beobachteten Zelltod auslösen. Für die kombinierte Behandlung würde das bedeuten, dass aufgrund der Bestrahlung zunächst noch ein Teil der Zellen arretiert und der Zelltod daher geringer ausfällt als in den Bak-positiven JCAM. Nach 48 h hat sich dieser Arrest wieder relativiert und deshalb sterben die Zellen nun wieder besser im Vergleich zu den Bak-positiven JCAM.

Es bleibt allerdings zu betonen, dass es sich lediglich um eine Theorie handelt, die nicht durch weitere Untersuchungen abgesichert ist. Anhand der Western Blots konnte jedoch sicher gezeigt werden, dass die Bak-positiven Zellen offenkundig auf den mitochondrialen Verstärker zurückgreifen, während die Bak-negativen ohne mitochondriale Beteiligung

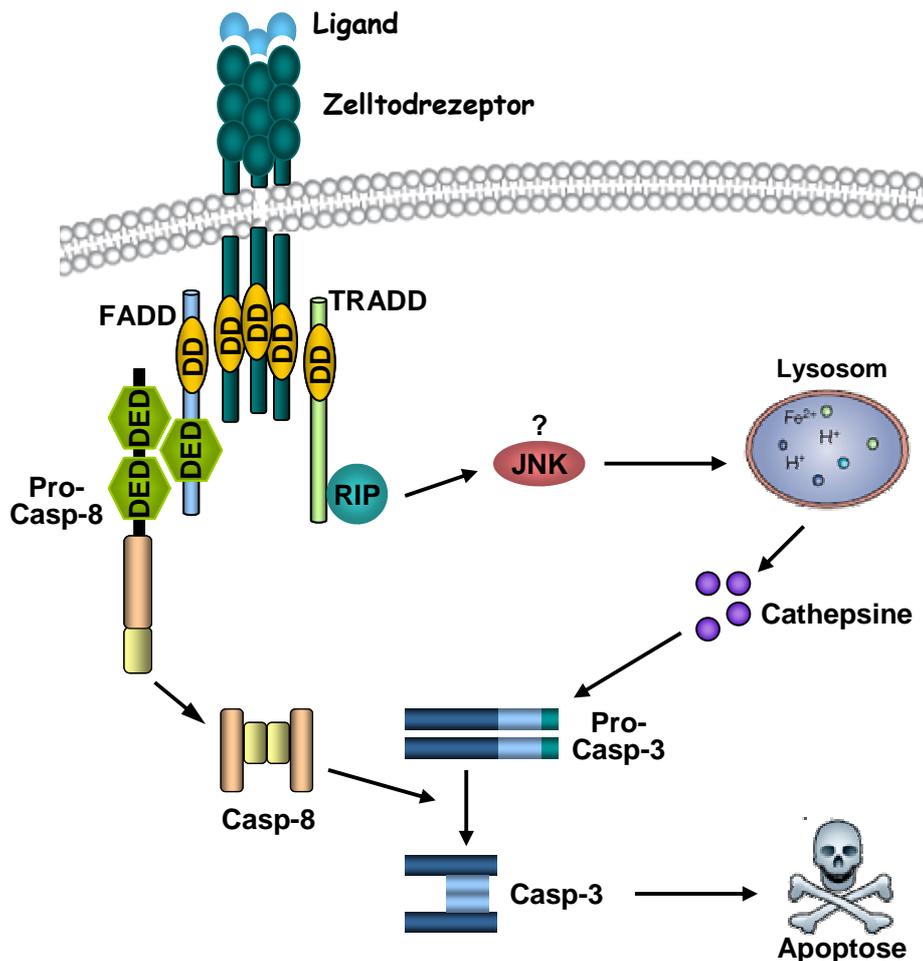


Abbildung 6.8 Modell zur Verstärkung des extrinsischen Apoptosewegs über einen lysosomalen Zelltodweg in Bak-negativen JCAM

Bei den Bak-negativen JCAM ist wegen des Fehlens von Bak und Bax kein Verstärkermechanismus der extrinsischen Apoptose übers Mitochondrium möglich. Es kann jedoch sein, dass in diesem Zellsystem ein zusätzlicher Zelltodmechanismus der „2. Wahl“ zum Tragen kommt. Dieser könnte über das Protein RIP eingeleitet werden, das über den Adapter TRADD an Zelltodrezeptoren rekrutiert und dann aktiviert wird. Aktives RIP kann daraufhin - evtl. über JNK vermittelt - die Freisetzung von Cathepsinen aus Lysosomen bewirken. Diese können Caspasen direkt spalten und so zur Apoptose beitragen.

auskommen. Denn in den Bak-positiven Zellen wurde nach Kombinationsbehandlung neben PARP-Spaltung sowohl aktive Caspase 9 als auch aktive Caspase 3 nachgewiesen, angezeigt durch die Anwesenheit beider Spaltfragmente der jeweiligen Caspasen (p37 und p35 für Caspase 9 sowie p19 und p17 für Caspase 3). Im Vergleich dazu wurde in den Bak-negativen Zellen PARP nach Kombinationsbehandlung ebenfalls gespalten, aber die Caspasen 9 und 3 waren nur partiell aktiviert. Bei Caspase 9 entsteht das p35-Fragment im Apoptosom durch autokatalytische Spaltung, während p37 bei retrograder Aktivierung durch Caspase 3 gebildet wird (Cain et al., 2002; Zou et al., 2003). Das nach kombinierter

Behandlung detektierte Spaltfragment der Caspase 9 stammt also aus der Spaltung über Caspase 3 und zeigt, dass keine Ruptur des Mitochondriums in Autonomie von Bak und Bax einsetzt. Die initiale Spaltung der Caspase 3 durch Caspase 8 führt zur Generierung von Fragmenten der Größe p20 und p12. Das größere der Fragmente kann anschließend weiter prozessiert werden. Dies geschieht zum einen durch die bereits aktive Caspase 3 selbst, wobei das p19-Fragment entsteht (Atkinson et al., 1998) oder durch Caspase-9, was zur Bildung von p17 führt (Slee et al., 1999). Auch hier bestätigt das Fehlen von p17 die fehlende Aktivität von Caspase 9. Allerdings reicht die Prozessierung von Caspase 3 durch Caspase 8 mit anschließender Selbstspaltung zu p19 vollständig aus, um die apoptotischen Funktionen zu erfüllen.

Zusammenfassend liegt also die Vermutung nahe, dass Zellen nach Stress durch starke Stimuli auf die mitochondriale Rückkopplung zurückgreifen, wenn sie zur Verfügung steht, anscheinend aber Möglichkeiten entwickeln können, andere effektive Wege in den Zelltod zu finden.

6.4 Die Dreifachbehandlung aus Bestrahlung, TRAIL und ErPC3

Mit Bestrahlung und ErPC/ErPC3 steht eine Kombination zur Verfügung, die auch in p53-negativen Systemen effizient Apoptose in Tumorzellen mit intaktem mitochondrialen Zelltodweg auslösen kann. Auf eine Kombinationstherapie aus Bestrahlung und TRAIL sprechen sowohl Tumorzellen mit funktionsfähigem Mitochondrium an als auch solche, bei denen keine intrinsische Apoptose mehr möglich ist. Ein Tumor wiederum zeichnet sich dadurch aus, dass er aus einem inhomogenen Gemisch heterogener Tumorzellen besteht, die Defekte in den verschiedensten Genen sowie epigenetische Veränderungen tragen und somit aufgrund unterschiedlichster Ursachen resistent gegen die regulären Selbstmordprogramme einer Zelle geworden sind. Um möglichst viele dieser Zellen therapeutisch zu erreichen und eliminieren zu können, würde daher eine kombinierte Therapie aus Bestrahlung, ErPC3 und TRAIL durchaus Sinn machen. Zum einen könnte durch den Zusatz von TRAIL Zellen mit Defekten in der Ausführung der intrinsischen Apoptose entgegengetreten werden, zum anderen führt in Zellen mit Anhäufung zahlreicher Defekte erst das Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes zum Eintritt in die Apoptose. Dieser würde auch in Zellen mit möglichem mitochondrialen Zelltodweg teilweise durchaus erst nach Dreifachkombination erreicht.

Die Wirkung des Alkylphosphocholines Perifosine in Kombination mit TRAIL wurde kürzlich an A549, H460 und H157 Zellen untersucht, wobei in allen Zelllinien ein deutlicher

Kombinationseffekt in der DNA-Fragmentierung beobachtet werden konnte (Elrod et al., 2007). Weiterführende Untersuchungen dazu wurden jedoch noch nicht durchgeführt. Eine synergistische Kombinationswirkung aus TRAIL und Bestrahlung konnte ebenfalls bereits in verschiedenen Tumorzelllinien (aus Mamma, Lunge, Colon, Kopf-Hals und Lymphomen) nachgewiesen werden (Belka et al., 2001; Marini et al., 2005).

Die Apoptose-Induktion nach Dreifachkombination aus Bestrahlung, TRAIL und ErPC3 wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit anhand der Bak-positiven JCAM Zellen zum ersten Mal untersucht. Dabei konnten ausgezeichnete Kombinationswirkungen beobachtet werden, denn für kombinierte Behandlung aus Bestrahlung mit 10 Gy, Stimulation mit 0.6 ng/ml TRAIL sowie 18 µg/ml ErPC3 wurde bereits nach 12 h eine Apoptose-Induktion von über 90% nachgewiesen werden.

6.5 Ausblick

Trotz der vielversprechenden *in vitro* Ergebnisse von synthetischen Phospholipiden bezüglich ihrer Anti-Tumor-Wirkung gelangten nur ein sehr geringer Teil der entwickelten Substanzen tatsächlich in die klinische Anwendung. So war z.B. trotz der Erfolg verheißenden Versuche zu Edelfosine dessen antineoplastische *in vivo* Aktivität leider äußerst moderat. Dies war darauf zurückzuführen, dass Edelfosine nach systemischer Gabe zügig verstoffwechselt wird und eine Anreicherung im Gewebe ausblieb (Magistrelli et al., 1995). HePC, war das erste APC-Derivat, das in die Klinik eingeführt wurde. Allerdings verhindern hämolytische und gastro-intestinale Nebenwirkungen eine breite klinische Anwendung. Auch das peroral applizierbare Perifosine wird mittlerweile in der klinischen Anwendung getestet. In verschiedenen Phase I und pharmakokinetischen Studien wurden neben Müdigkeit hauptsächlich gastro-intestinale Nebenwirkungen beobachtet, die dosislimitierend sind (Crul et al., 2002; Van Ummersen et al., 2004). Allerdings konnte in Phase II Studien bei Patienten mit metastasierendem oder rezidivierendem Melanom (Ernst et al., 2005) sowie in Patienten mit androgen-unabhängigem Prostatakarzinom (Posadas et al., 2005) nach alleiniger Gabe von Perifosine kein signifikantes Ansprechen festgestellt werden. Eine erste Phase I Studie zur Evaluierung der Toxizität einer kombinierten Therapie aus Bestrahlung und Perifosine zeigt, dass die Kombination beider Stimuli bei Patienten möglich ist (Vink et al., 2006b) und lässt auf ein Ansprechen in der Kombinationstherapie hoffen.

Im Gegensatz zu den oben genannten APC-Derivaten weisen ErPC und ErPC3 keine hämolytischen Nebenwirkungen auf und eignen sich deshalb zur intravenösen Applikation.

Nach wiederholter intravenöser Gabe nichttoxischer Konzentrationen an ErPC bei Ratten konnte eine Akkumulation der Substanz in verschiedenen Geweben einschließlich des Gehirns festgestellt werden (Erdlenbruch et al., 1999). Somit kann die Substanz bei intravenöser Gabe auch die Blut-Hirn-Schranke überwinden und sich im Hirntumor anreichern, was eine Voraussetzung für die klinische Therapie maligner Gliome darstellt.

ErPC3 war insgesamt die effizientere der beiden Substanzen, sowohl in der Einzelgabe als auch nach kombinierter Behandlung der Zellen mit Bestrahlung. Dies gilt sowohl für die Steigerung der strahleninduzierten Apoptose als auch für die erfolgreiche Auslöschung klonogener Tumorzellen im Koloniebildungstest.

Als Konsequenz wurde 2006 eine klinische Phase I Studie unter Dr. L. H. Lindner in der Inneren Medizin III der Universitätsklinik Großhadern in München initiiert (Lindner, persönliche Mitteilung). Dabei wurde ErPC3 an austherapierte Patienten intravenös über Infusion gegeben. Die ursprünglich als maximale Dosisstufe eingeplante ErPC3-Konzentration wurde so gut toleriert, dass die Studie um weitere Dosisstufen erweitert wurde. Die maximal tolerierte Dosis ist noch nicht erreicht (Lindner, persönliche Mitteilung). Da bisher keine systemischen Nebenwirkungen auftraten, könnte mit ErPC3 das dosislimitierende Problem früherer ALPs überwunden werden. Zusätzlich steht eine Substanz zur Verfügung, die aufgrund der *in vitro* Ergebnisse ideal für kombinierte Therapieansätze mit Bestrahlung bzw. TRAIL geeignet ist.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl ErPC als auch ErPC3 die Sensitivität maligner Gliomzellen (T98G, A172 und U87MG) gegenüber strahleninduzierter Apoptose steigern konnten. Dabei ergaben sich je nach eingesetzter Strahlendosis bzw. ErPC/ErPC3-Konzentration sub-additive bis synergistische Kombinationseffekte. Die sehr gute Kombinationswirkung konnte in T98G auch im klinisch relevanten Koloniebildungstest durch effiziente Reduktion der Koloniebildung bestätigt werden, was indikativ für ein Abtöten klonogener Tumorzellen ist.

Untersuchungen zur Differenzierung des Zelltods nach kombinierter Behandlung enthüllten die Apoptose als wichtigen zytotoxischen Mechanismus, einhergehend mit Caspasen-Aktivierung und PARP-Spaltung. Dabei war der mitochondriale Zelltodweg, der in Jurkat Zellen mit einem zusätzlichen Verstärkerloop retrograd über Caspase 8 und Bid einherging, entscheidend für die Apoptose-Induktion.

Als pro-apoptische Effekte am Mitochondrium konnten eine zunehmende Aktivierung von Bax sowie eine Hochregulation von pro-apoptischen BH3-only Proteinen beobachtet werden. Parallel zu diesen Ereignissen wurde oberhalb des Mitochondriums PKB/Akt zunehmend durch Dephosphorylierung inaktiviert und so über verminderte Phosphorylierung die Aktivität des Transkriptionsfaktors FKHRL1 entsprechend erhöht, der u.a. die Transkription von Bim, Puma und Noxa induziert. Im T-Lymphomzellmodell verlangsamte die Überexpression von Bcl-2 die Effizienz der Behandlung, während das Fehlen von Bax und Bak zur vollständigen Blockade des Effekts führte. Außerdem scheint die Abnahme an anti-apoptischem Mcl-1 für die pro-apoptische Wirkung im Jurkat-Zellmodell essentiell zu sein. In T98G konnte nach Kombinationsbehandlung aus Bestrahlung und ErPC3 eine verstärkte Induktion von Strahlenschäden über vermehrte γ -H2AX-Foci-Bildung aufgezeigt werden. Nach 24 h waren diese Foci immer noch deutlich vorhanden, was für irreparable Schäden an der DNA spricht und für einen Beitrag von DNA-Schaden vermittelter Apoptose am Gesamtzelltod bei Kombinationsbehandlung.

Des Weiteren wurde das Zellzyklusprotein Rb durch aktivierte Caspasen abgebaut, wodurch seine hemmende Wirkung auf den Transkriptionsfaktor E2F1 aufgehoben wird. Dadurch könnten weitere Apoptose-fördernde Mechanismen in Gang gesetzt werden, die den mitochondrialen Zelltodweg unterstützen.

Die Kombination aus Bestrahlung und TRAIL war sowohl in Bak-positiven als auch in Bak-negativen JCAM ein effizienter Auslöser von Apoptose. Nach Bestrahlung allein zeigten jedoch Bak-negative Zellen gegenüber Bak-positiven Zellen zunächst einen massiv verstärkten Arrest in G2/M mit verzögerter Apoptose. In den Bak-positiven Zellen war der Verstärkerloop übers Mitochondrium am Gesamtzelltod beteiligt, während in den Bak-

negativen Zellen nur der extrinsische Zelltodweg aktiv war. Trotz der Abhängigkeit der strahleninduzierten Apoptose vom Vorhandensein des mitochondrialen Zelltodwegs, war die Kombination aus Bestrahlung und Stimulation mit TRAIL in Bak-negativen Zellen nicht weniger effizient. Damit sind mit dieser Kombinationsbehandlung optimale Voraussetzungen geschaffen, um Tumore mit schweren Defekten im mitochondrialen Zelltodweg effektiv in die Apoptose zu treiben.

Die Dreifachbehandlung aus Bestrahlung, TRAIL und ErPC3 zeigte im getesteten Jurkat-Modell ausgezeichnete Kombinationswirkungen: Trotz starker Dosisreduktion von TRAIL und ErPC3 im Vergleich zur Zweifachkombination wurde bereits 12 h nach Dreifachbehandlung eine Apoptose-Induktion von über 90% nachgewiesen.

Die *in vitro* erhobenen Daten zeugen von vielversprechenden Kombinationen aus Bestrahlung mit ErPC/ErPC3, Bestrahlung mit TRAIL oder der Dreifachkombination aller getesteten Stimuli und machen sie zu aussichtsreichen und hoffnungsvollen Ansätzen bei der Therapie maligner Gliome und anderer solider Tumore mit ausgeprägter Resistenz gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie.

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Rubel A*, Handrick R*, Lindner LH, Steiger M, Eibl H, Budach W, Belka C, Jendrossek V.
The membrane targeted apoptosis modulators erucylphosphocholine and erucylphosphohomocholine increase the radiation response of human glioblastoma cell lines *in vitro*.

Radiat Oncol. 2006 Mar 29;1:6

Handrick R*, **Rubel A***, Faltin H, Eibl H, Belka C, Jendrossek V.
Increased cytotoxicity of ionizing radiation in combination with membrane-targeted apoptosis modulators involves downregulation of protein kinase B/Akt-mediated survival-signaling.

Radiother Oncol. 2006 Aug;80(2):199-206. Epub 2006 Aug 17

* both authors contributed equally to this work

8. Literaturverzeichnis

- Adrain, C., Slee, E. A., Harte, M. T., and Martin, S. J. (1999). Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *J Biol Chem* 274, 20855-20860.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., and Martinou, J. C. (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 345 Pt 2, 271-278.
- Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D. A., Marsters, S. A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A. E., Hebert, A., *et al.* (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104, 155-162.
- Atkinson, E. A., Barry, M., Darmon, A. J., Shostak, I., Turner, P. C., Moyer, R. W., and Bleackley, R. C. (1998). Cytotoxic T Lymphocyte-assisted Suicide. CASPASE 3 ACTIVATION IS PRIMARILY THE RESULT OF THE DIRECT ACTION OF GRANZYME B. *J Biol Chem* 273, 21261-21266.
- Belka, C., Schmid, B., Marini, P., Durand, E., Rudner, J., Faltin, H., Bamberg, M., Schulze-Osthoff, K., and Budach, W. (2001). Sensitization of resistant lymphoma cells to irradiation-induced apoptosis by the death ligand TRAIL. *Oncogene* 20, 2190-2196.
- Berenbaum, M. C. (1978). A method for testing for synergy with any number of agents. *J Infect Dis* 137, 122-130.
- Berger, M. R., Sobottka, S., and Konstantinov, S. M. (1998). Erucylphosphocholine is the prototype of i.v. injectable alkylphosphocholines. *Drugs Today* 34, 73-81.
- Berkovic, D., Grundel, O., Berkovic, K., Wildfang, I., Hess, C. F., and Schmoll, H. J. (1997). Synergistic cytotoxic effects of ether phospholipid analogues and ionizing radiation in human carcinoma cells. *Radiother Oncol* 43, 293-301.
- Beutler, B. (2001). Autoimmunity and apoptosis: the Crohn's connection. *Immunity* 15, 5-14.
- Birkenkamp, K. U., and Coffey, P. J. (2003). Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochem Soc Trans* 31, 292-297.
- Bloom, J., and Pagano, M. (2003). Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin Cancer Biol* 13, 41-47.
- Boatright, K. M., Renatus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., Ricci, J. E., Edris, W. A., Sutherlin, D. P., Green, D. R., and Salvesen, G. S. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 11, 529-541.
- Borges, H. L., Bird, J., Wasson, K., Cardiff, R. D., Varki, N., Eckmann, L., and Wang, J. Y. J. (2005). Tumor promotion by caspase-resistant retinoblastoma protein. *PNAS* 102, 15587-15592.
- Bouralexis, S., Findlay, D. M., and Evdokiou, A. (2005). Death to the bad guys: targeting cancer via Apo2L/TRAIL. *Apoptosis* 10, 35-51.
- Brockhaus, M., Schoenfeld, H. J., Schlaeger, E. J., Hunziker, W., Lesslauer, W., and Loetscher, H. (1990). Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3127-3131.
- Bröker, L. E., Kruyt, F. A. E., and Giaccone, G. (2005). Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clin Cancer Res* 11, 3155-3162.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., and Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Bruyneel, E. A., Storme, G. A., Schallier, D. C., Van den Berge, D. L., Hilgard, P., and Mareel, M. M. (1993). Evidence for abrogation of oncogene-induced radioresistance of mammary cancer cells by hexadecylphosphocholine in vitro. *Eur J Cancer* 29A, 1958-1963.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J. C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.
- Cartron, P.-F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F. M., and Juin, P. (2004). The First [alpha] Helix of Bax Plays a Necessary Role in Its Ligand-Induced Activation by the BH3-Only Proteins Bid and PUMA. *Molecular Cell* 16, 807-818.

- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S. A., and Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 9, 351-365.
- Chalfant, C. E., Rathman, K., Pinkerman, R. L., Wood, R. E., Obeid, L. M., Ogretmen, B., and Hannun, Y. A. (2002). De Novo Ceramide Regulates the Alternative Splicing of Caspase 9 and Bcl-x in A549 Lung Adenocarcinoma Cells. DEPENDENCE ON PROTEIN PHOSPHATASE-1. *J Biol Chem* 277, 12587-12595.
- Chipuk, J. E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D. D., and Green, D. R. (2005). PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* 309, 1732-1735.
- Cobrinik, D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 24, 2796-2809.
- Cory, S., Huang, D. C., and Adams, J. M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-8607.
- Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J. J., and Smyth, M. J. (2002). Increased Susceptibility to Tumor Initiation and Metastasis in TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Deficient Mice. *J Immunol* 168, 1356-1361.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S. A., Zamzami, N., and Kroemer, G. (2000). Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett* 476, 118-123.
- De Giorgi, F., Lartigue, L., Bauer, M. K., Schubert, A., Grimm, S., Hanson, G. T., Remington, S. J., Youle, R. J., and Ichas, F. (2002). The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *Faseb J* 16, 607-609.
- de la Pena, L., Burgan, W. E., Carter, D. J., Hollingshead, M. G., Satyamitra, M., Camphausen, K., and Tofilon, P. J. (2006). Inhibition of Akt by the alkylphospholipid perifosine does not enhance the radiosensitivity of human glioma cells. In, pp. 1504-1510.
- Degterev, A., Boyce, M., and Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543-8567.
- Delston, R. B., and William Harbour, J. (2006). Rb at the Interface Between Cell Cycle and Apoptotic Decisions. *Current Molecular Medicine* 6, 713-718.
- Dick, F. A., and Dyson, N. (2003). pRB contains an E2F1-specific binding domain that allows E2F1-induced apoptosis to be regulated separately from other E2F activities. *Mol Cell* 12, 639-649.
- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12, 3499-3511.
- Dillon, R. L., White, D. E., and Muller, W. J. (2007). The phosphatidylinositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene* 26, 1338-1345.
- Duvall, E., and Wyllie, A. H. (1986). Death and the cell. *Immunology Today* 7, 115-119.
- Eibl, H., and Unger, C. (1990). Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug. *Cancer Treat Rev* 17, 233-242.
- Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817-829.
- Elrod, H. A., Lin, Y.-D., Yue, P., Wang, X., Lonial, S., Khuri, F. R., and Sun, S.-Y. (2007). The alkylphospholipid perifosine induces apoptosis of human lung cancer cells requiring inhibition of Akt and activation of the extrinsic apoptotic pathway. *Mol Cancer Ther* 6, 2029-2038.
- Erdlenbruch, B., Jendrossek, V., Gerriets, A., Vetterlein, F., Eibl, H., and Lakomek, M. (1999). Erucylphosphocholine: pharmacokinetics, biodistribution and CNS-accumulation in the rat after intravenous administration. *Cancer Chemother Pharmacol* 44, 484-490.
- Erdlenbruch, B., Jendrossek, V., Kugler, W., Eibl, H., and Lakomek, M. (2002). Increased delivery of erucylphosphocholine to C6 gliomas by chemical opening of the blood-brain barrier using intracarotid pentylglycerol in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 50, 299-304 Epub 2002 Aug 2003.
- Ernst, D. S., Eisenhauer, E., Wainman, N., Davis, M., Lohmann, R., Baetz, T., Belanger, K., and Smylie, M. (2005). Phase II Study of Perifosine in Previously Untreated Patients with Metastatic Melanoma. *Invest New Drugs* 23, 1-7.
- Fadok, V. A., and Henson, P. M. (2003). Apoptosis: giving phosphatidylserine recognition an assist-with a twist. *Curr Biol* 13, R655-657.
- Ferri, K. F., and Kroemer, G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3, E255-263.
- Fischer, U., Janicke, R. U., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10, 76-100.

- Fischer, U., and Schulze-Osthoff, K. (2005). New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev* 57, 187-215.
- Flemington, E. K., Speck, S. H., and Kaelin, W. G., Jr. (1993). E2F-1-Mediated Transactivation is Inhibited by Complex Formation with the Retinoblastoma Susceptibility Gene Product. *PNAS* 90, 6914-6918.
- Frolov, M. V., and Dyson, N. J. (2004). Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci* 117, 2173-2181.
- Fuentes-Prior, P., and Salvesen, G. S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 384, 201-232.
- Fujita, N., Sato, S., Katayama, K., and Tsuruo, T. (2002). Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J Biol Chem* 277, 28706-28713.
- Gelinas, C., and White, E. (2005). BH3-only proteins in control: specificity regulates MCL-1 and BAK-mediated apoptosis. *Genes Dev* 19, 1263-1268.
- Genovese, C., Trani, D., Caputi, M., and Claudio, P. P. (2006). Cell cycle control and beyond: emerging roles for the retinoblastoma gene family. *Oncogene* 25, 5201-5209.
- Green, D. R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-629.
- Gudkov, A. V., and Komarova, E. A. (2003). The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer* 3, 117-129.
- Halaban, R., Miglarese, M. R., Smicun, Y., and Puig, S. (1998). Melanomas, from the cell cycle point of view (Review). *Int J Mol Med* 1, 419-425.
- Han, J., Goldstein, L. A., Hou, W., and Rabinowich, H. (2007). Functional linkage between NOXA and Bim in mitochondrial apoptotic events. *J Biol Chem* 282, 16223-16231.
- Handrick, R., Rudner, J., Muller, I., Eibl, H., Belka, C., and Jendrossek, V. (2005). Bcl-2 mediated inhibition of erucylphosphocholine-induced apoptosis depends on its subcellular localisation. *Biochem Pharmacol* 70, 837-850.
- Hao, H., Dong, Y., Bowling, M. T., Gomez-Gutierrez, J. G., Zhou, H. S., and McMasters, K. M. (2007). E2F-1 induces melanoma cell apoptosis via PUMA up-regulation and Bax translocation. *BMC Cancer* 7, 24.
- Hara, S., Nakashima, S., Kiyono, T., Sawada, M., Yoshimura, S., Iwama, T., and Sakai, N. (2004). Ceramide triggers caspase activation during gamma-radiation-induced apoptosis of human glioma cells lacking functional p53. *Oncol Rep* 12, 119-123.
- Harbour, J. W., and Dean, D. C. (2000). Chromatin remodeling and Rb activity. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 685-689.
- Helin, K., Harlow, E., and Fattaey, A. (1993). Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 13, 6501-6508.
- Hershko, T., and Ginsberg, D. (2004). Up-regulation of Bcl-2 Homology 3 (BH3)-only Proteins by E2F1 Mediates Apoptosis. *J Biol Chem* 279, 8627-8634.
- Hideshima, T., Catley, L., Yasui, H., Ishitsuka, K., Raje, N., Mitsiades, C., Podar, K., Munshi, N. C., Chauhan, D., Richardson, P. G., and Anderson, K. C. (2006). Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood* 107, 4053-4062.
- Hilgard, P., Klenner, T., Stekar, J., and Unger, C. (1993). Alkylphosphocholines: a new class of membrane-active anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 32, 90-95.
- Hsu, S. Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., and Hsueh, A. J. (1997). Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12401-12406.
- Hsu, Y. T., and Youle, R. J. (1998). Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* 273, 10777-10783.
- Hui, H., Dotta, F., Di Mario, U., and Perfetti, R. (2004). Role of caspases in the regulation of apoptotic pancreatic islet beta-cells death. *J Cell Physiol* 200, 177-200.
- Hymowitz, S. G., O'Connell, M. P., Ultsch, M. H., Hurst, A., Totpal, K., Ashkenazi, A., de Vos, A. M., and Kelley, R. F. (2000). A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry* 39, 633-640.
- Igney, F. H., and Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2, 277-288.
- Ishii, N., Maier, D., Merlo, A., Tada, M., Sawamura, Y., Diserens, A. C., and Van Meir, E. G. (1999). Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* 9, 469-479.

- Ismail, I. H., Nystrom, S., Nygren, J., and Hammarsten, O. (2005). Activation of ataxia telangiectasia mutated by DNA strand break-inducing agents correlates closely with the number of DNA double strand breaks. *J Biol Chem* 280, 4649-4655.
- Jackson, M. W., Agarwal, M. K., Yang, J., Bruss, P., Uchiumi, T., Agarwal, M. L., Stark, G. R., and Taylor, W. R. (2005). p130/p107/p105Rb-dependent transcriptional repression during DNA-damage-induced cell-cycle exit at G2. *J Cell Sci* 118, 1821-1832.
- Jacobson, M. D., Weil, M., and Raff, M. C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* 88, 347-354.
- Jendrossek, V., and Handrick, R. (2003). Membrane targeted anticancer drugs: potent inducers of apoptosis and putative radiosensitisers. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 3, 343-353.
- Jendrossek, V., Kugler, W., Erdlenbruch, B., Eibl, H., Lang, F., and Lakomek, M. (2001). Erucylphosphocholine-induced apoptosis in chemoresistant glioblastoma cell lines: involvement of caspase activation and mitochondrial alterations. *Anticancer Res* 21, 3389-3396.
- Jendrossek, V., Muller, I., Eibl, H., and Belka, C. (2003). Intracellular mediators of erucylphosphocholine-induced apoptosis. *Oncogene* 22, 2621-2631.
- Jeong, S. Y., Gaume, B., Lee, Y. J., Hsu, Y. T., Ryu, S. W., Yoon, S. H., and Youle, R. J. (2004). Bcl-x(L) sequesters its C-terminal membrane anchor in soluble, cytosolic homodimers. *Embo J* 23, 2146-2155.
- Ji, P., Jiang, H., Rekhman, K., Bloom, J., Ichetovkin, M., Pagano, M., and Zhu, L. (2004). An Rb-Skp2-p27 pathway mediates acute cell cycle inhibition by Rb and is retained in a partial-penetrance Rb mutant. *Mol Cell* 16, 47-58.
- Jo, M., Kim, T. H., Seol, D. W., Esplen, J. E., Dorko, K., Billiar, T. R., and Strom, S. C. (2000). Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 6, 564-567.
- Kao, J., Milano, M. T., Javaheri, A., Garofalo, M. C., Chmura, S. J., Weichselbaum, R. R., and Kron, S. J. (2006). gamma-H2AX as a therapeutic target for improving the efficacy of radiation therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 6, 197-205.
- Kastan, M. B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-323.
- Keogh, M. C., Kim, J. A., Downey, M., Fillingham, J., Chowdhury, D., Harrison, J. C., Onishi, M., Datta, N., Galicia, S., Emili, A., *et al.* (2006). A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature* 439, 497-501.
- Kimberley, F. C., and Screaton, G. R. (2004). Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res* 14, 359-372.
- Kinnally, K. W., and Antonsson, B. (2007). A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis* 12, 857-868.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Kramer, P. H., and Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579-5588.
- Koenig, U., Eckhart, L., and Tschachler, E. (2001). Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun* 285, 1150-1154.
- Kroemer, G., and Martin, S. J. (2005). Caspase-independent cell death. *Nat Med* 11, 725-730.
- Kugler, W., Erdlenbruch, B., Otten, K., Jendrossek, V., Eibl, H., and Lakomek, M. (2004). MAP kinase pathways involved in glioblastoma response to erucylphosphocholine. *Int J Oncol* 25, 1721-1727.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lakhani, S. A., Masud, A., Kuida, K., Porter, G. A., Jr., Booth, C. J., Mehal, W. Z., Inayat, I., and Flavell, R. A. (2006). Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 311, 847-851.
- Lalier, L., Cartron, P. F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B., and Vallette, F. M. (2007). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* 12, 887-896.
- Lavin, M. F., Birrell, G., Chen, P., Kozlov, S., Scott, S., and Gueven, N. (2005). ATM signaling and genomic stability in response to DNA damage. *Mutat Res* 569, 123-132.
- Lawrence, D., Shahrokh, Z., Marsters, S., Achilles, K., Shih, D., Mounho, B., Hillan, K., Totpal, K., DeForge, L., Schow, P., *et al.* (2001). Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* 7, 383-385.
- Leber, B., Lin, J., and Andrews, D. (2007). Embedded together: The life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis* 12, 897-911.
- Lees, J. A., Saito, M., Vidal, M., Valentine, M., Look, T., Harlow, E., Dyson, N., and Helin, K. (1993). The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Mol Cell Biol* 13, 7813-7825.

- Leu, J. I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M. E., and George, D. L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* 6, 443-450.
- Li, Y., Corradetti, M. N., Inoki, K., and Guan, K. L. (2004). TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends Biochem Sci* 29, 32-38.
- Liao, W. C., Haimovitz-Friedman, A., Persaud, R. S., McLoughlin, M., Ehleiter, D., Zhang, N., Gatei, M., Lavin, M., Kolesnick, R., and Fuks, Z. (1999). Ataxia telangiectasia-mutated gene product inhibits DNA damage-induced apoptosis via ceramide synthase. *J Biol Chem* 274, 17908-17917.
- Lundberg, A. S., and Weinberg, R. A. (1998). Functional Inactivation of the Retinoblastoma Protein Requires Sequential Modification by at Least Two Distinct Cyclin-cdk Complexes. *Mol Cell Biol* 18, 753-761.
- Magistrelli, A., Villa, P., Benfenati, E., Modest, E. J., Salmona, M., and Tacconi, M. T. (1995). Fate of 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine (ET18-OME) in malignant cells, normal cells, and isolated and perfused rat liver. *Drug Metab Dispos* 23, 113-118.
- Marini, P., Schmid, A., Jendrossek, V., Faltin, H., Daniel, P. T., Budach, W., and Belka, C. (2005). Irradiation specifically sensitises solid tumour cell lines to TRAIL mediated apoptosis. *BMC Cancer* 5, 5.
- Martinou, J. C., Desagher, S., and Antonsson, B. (2000). Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat Cell Biol* 2, E41-43.
- Mayo, L. D., and Donner, D. B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11598-11603.
- Mei, Y., Du, W., Yang, Y., and Wu, M. (2005). Puma[Mcl-1] interaction is not sufficient to prevent rapid degradation of Mcl-1. *Oncogene* 24, 7224-7237.
- Milligan, C. E., Prevette, D., Yaginuma, H., Homma, S., Cardwell, C., Fritz, L. C., Tomaselli, K. J., Oppenheim, R. W., and Schwartz, L. M. (1995). Peptide inhibitors of the ICE protease family arrest programmed cell death of motoneurons in vivo and in vitro. *Neuron* 15, 385-393.
- Mollinedo, F., Fernandez-Luna, J. L., Gajate, C., Martin-Martin, B., Benito, A., Martinez-Dalmau, R., and Modolell, M. (1997). Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH3 (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L). *Cancer Res* 57, 1320-1328.
- Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 261-291.
- Munder, P. G., Modolell, M., and Andreesen, R. (1979). Lysophosphatidylcholine (lysolecithin) and its synthetic analogues. Immunomodulating and other biologic effects. *Immunopathology* 2, 187-203.
- Murphy, M. P., and Brand, M. D. (1988). Membrane-potential-dependent changes in the stoichiometry of charge translocation by the mitochondrial electron transport chain. *Eur J Biochem* 173, 637-644.
- Naderi, S., Hunton, I. C., and Wang, J. Y. (2002). Radiation dose-dependent maintenance of G(2) arrest requires retinoblastoma protein. *Cell Cycle* 1, 193-200.
- Nagata, S., and Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* 267, 1449-1456.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., and 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.
- Nosedá, A., White, J. G., Godwin, P. L., Jerome, W. G., and Modest, E. J. (1989). Membrane damage in leukemic cells induced by ether and ester lipids: an electron microscopic study. *Exp Mol Pathol* 50, 69-83.
- Pan, G., Bauer, J. H., Haridas, V., Wang, S., Liu, D., Yu, G., Vincenz, C., Aggarwal, B. B., Ni, J., and Dixit, V. M. (1998). Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett* 431, 351-356.
- Paris, C., Bertoglio, J., and Breard, J. (2007). Lysosomal and mitochondrial pathways in miltefosine-induced apoptosis in U937 cells. *Apoptosis* 12, 1257-1267.
- Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., and Bonner, W. M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 10, 886-895.
- Pavlov, E. V., Priault, M., Pietkiewicz, D., Cheng, E. H., Antonsson, B., Manon, S., Korsmeyer, S. J., Mannella, C. A., and Kinnally, K. W. (2001). A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J Cell Biol* 155, 725-731.
- Perez, C. A. (2004). Principles and practice of radiation oncology; 4th ed., 4th ed edn: Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins).

- Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A., and Ashkenazi, A. (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 271, 12687-12690.
- Posadas, E. M., Gulley, J., Arlen, P. M., Trout, A., Parnes, H. L., Wright, J., Lee, M. J., Chung, E. J., Trepel, J. B., Sparreboom, A., *et al.* (2005). A Phase II Study of Perifosine in Androgen Independent Prostate Cancer. *Cancer Biol Ther* 4, 1133-1137.
- Rahmani, M., Reese, E., Dai, Y., Bauer, C., Payne, S. G., Dent, P., Spiegel, S., and Grant, S. (2005). Coadministration of Histone Deacetylase Inhibitors and Perifosine Synergistically Induces Apoptosis in Human Leukemia Cells through Akt and ERK1/2 Inactivation and the Generation of Ceramide and Reactive Oxygen Species. *Cancer Res* 65, 2422-2432.
- Raisova, M., Goltz, G., Bektas, M., Bielawska, A., Riebeling, C., Hossini, A. M., Eberle, J., Hannun, Y. A., Orfanos, C. E., and Geilen, C. C. (2002). Bcl-2 overexpression prevents apoptosis induced by ceramidase inhibitors in malignant melanoma and HaCaT keratinocytes. *FEBS Lett* 516, 47-52.
- Riedl, S. J., and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 897-907.
- Rodriguez, J., and Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 13, 3179-3184.
- Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W. M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146, 905-916.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., and Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273, 5858-5868.
- Roos, W. P., and Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 12, 440-450.
- Rudner, J., Belka, C., Marini, P., Wagner, R. J., Faltin, H., Leppl-Wienhues, A., Bamberg, M., and Budach, W. (2001). Radiation sensitivity and apoptosis in human lymphoma cells. *Int J Radiat Biol* 77, 1-11.
- Rudner, J., Jendrossek, V., Lauber, K., Daniel, P. T., Wesselborg, S., and Belka, C. (2005). Type I and type II reactions in TRAIL-induced apoptosis -- results from dose-response studies. *Oncogene* 24, 130-140.
- Ruiter, G. A., Zerp, S. F., Bartelink, H., van Blitterswijk, W. J., and Verheij, M. (1999). Alkyllysophospholipids activate the SAPK/JNK pathway and enhance radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 59, 2457-2463.
- Runge, M. H., Andreesen, R., Pfliederer, A., and Munder, P. G. (1980). Destruction of human solid tumors by alkyl lysophospholipids. *J Natl Cancer Inst* 64, 1301-1306.
- Sage, J., Mulligan, G. J., Attardi, L. D., Miller, A., Chen, S., Williams, B., Theodorou, E., and Jacks, T. (2000). Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G1 control and immortalization. *Genes Dev* 14, 3037-3050.
- Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-99.
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.
- Scaduto, R. C., Jr., and Grotyohann, L. W. (1999). Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J* 76, 469-477.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Kramer, P. H., and Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17, 1675-1687.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.
- Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H.-G., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S., *et al.* (1999). Ordering the Cytochrome c-initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a Caspase-9-dependent Manner. *J Biol Chem* 274, 281-292.
- Smith, C. A., Farrah, T., and Goodwin, R. G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-962.
- Song, G., Ouyang, G., and Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 9, 59-71.
- Steel, G. G. (1993). Introduction: The significance of radiobiology for radiotherapy. In *Basic clinical Radiobiology*, (Edward Arnold, Boston), pp. 1-7.
- Stevens, C., and La Thangue, N. B. (2004). The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA Repair (Amst)* 3, 1071-1079.

- Stroh, C., and Schulze-Osthoff, K. (1998). Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ* 5, 997-1000.
- Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Engel, J., Sindermann, H., Fischer, C., Junge, K., Bryceson, A., and Berman, J. (2002). Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 347, 1739-1746.
- Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2002). Critical Role for Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand in Immune Surveillance Against Tumor Development. *J Exp Med* 195, 161-169.
- Taneja, N., Davis, M., Choy, J. S., Beckett, M. A., Singh, R., Kron, S. J., and Weichselbaum, R. R. (2004). Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy. *J Biol Chem* 279, 2273-2280.
- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.
- Thornberry, N. A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Tsai, K. Y., Hu, Y., Macleod, K. F., Crowley, D., Yamasaki, L., and Jacks, T. (1998). Mutation of E2f-1 Suppresses Apoptosis and Inappropriate S Phase Entry and Extends Survival of Rb-Deficient Mouse Embryos. *Molecular Cell* 2, 293-304.
- van Delft, M. F., and Huang, D. C. (2006). How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res* 16, 203-213.
- van der Luit, A. H., Vink, S. R., Klarenbeek, J. B., Perrissoud, D., Solary, E., Verheij, M., and van Blitterswijk, W. J. (2007). A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells. *Mol Cancer Ther* 6, 2337-2345.
- Vaux, D. L., and Silke, J. (2005). IAPs, RINGS and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 287-297.
- Vink, S. R., Lagerwerf, S., Mesman, E., Schellens, J. H., Begg, A. C., van Blitterswijk, W. J., and Verheij, M. (2006a). Radiosensitization of squamous cell carcinoma by the alkylphospholipid perifosine in cell culture and xenografts. *Clin Cancer Res* 12, 1615-1622.
- Vink, S. R., Schellens, J. H., Beijnen, J. H., Sindermann, H., Engel, J., Dubbelman, R., Moppi, G., Hillebrand, M. J., Bartelink, H., and Verheij, M. (2006b). Phase I and pharmacokinetic study of combined treatment with perifosine and radiation in patients with advanced solid tumours. *Radiother Oncol* 80, 207-213.
- von Haefen, C., Wieder, T., Gillissen, B., Starck, L., Graupner, V., Dorken, B., and Daniel, P. T. (2002). Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. *Oncogene* 21, 4009-4019.
- Walensky, L. D. (2006). BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Differ* 13, 1339-1350.
- Wang, J. Y., Naderi, S., and Chen, T. T. (2001). Role of retinoblastoma tumor suppressor protein in DNA damage response. *Acta Oncol* 40, 689-695.
- Wendt, J., von Haefen, C., Hemmati, P., Belka, C., Dorken, B., and Daniel, P. T. (2005). TRAIL sensitizes for ionizing irradiation-induced apoptosis through an entirely Bax-dependent mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 24, 4052-4064.
- Wieder, T., Orfanos, C. E., and Geilen, C. C. (1998). Induction of ceramide-mediated apoptosis by the anticancer phospholipid analog, hexadecylphosphocholine. *J Biol Chem* 273, 11025-11031.
- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A., and et al. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-682.
- Willis, S. N., and Adams, J. M. (2005). Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 17, 617-625.
- Willis, S. N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J. I., Adams, J. M., and Huang, D. C. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 19, 1294-1305.
- You, H., Pellegrini, M., Tsuchihara, K., Yamamoto, K., Hacker, G., Erlacher, M., Villunger, A., and Mak, T. W. (2006). FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *J Exp Med* 203, 1657-1663.
- Yuan, J., and Yankner, B. A. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407, 802-809.
- Zhivotovsky, B. (2003). Caspases: the enzymes of death. *Essays Biochem* 39, 25-40.
- Zhong, Q., Gao, W., Du, F., and Wang, X. (2005). Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* 121, 1085-1095.

- Zhou, H., Summers, S. A., Birnbaum, M. J., and Pittman, R. N. (1998). Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 273, 16568-16575.
- Ziebold, U., Reza, T., Caron, A., and Lees, J. A. (2001). E2F3 contributes both to the inappropriate proliferation and to the apoptosis arising in Rb mutant embryos. *Genes Dev* 15, 386-391.

9. Zusätzliche Abbildungen

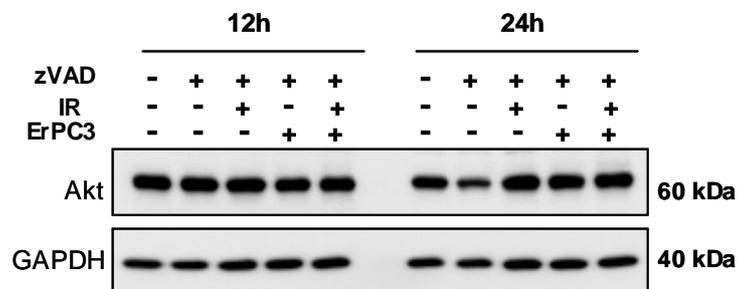


Abbildung Z.1 Status von PKB/Akt nach kombinierter Behandlung in Abhängigkeit aktiver Caspasen

Bak-positive JCAM wurden für 45 min mit 20 μ M zVAD-fmk Pan-Caspasen-Inhibitor vorinkubiert und anschließend mit 10 Gy bestrahlt, 25 μ M ErPC3 stimuliert oder kombinierter Behandlung unterzogen. 12 oder 24 h nach Behandlung wurden die Zellen lysiert und der Status von PKB/Akt im WB untersucht.

Als Ladekontrolle wurde der Level an GAPDH überprüft.

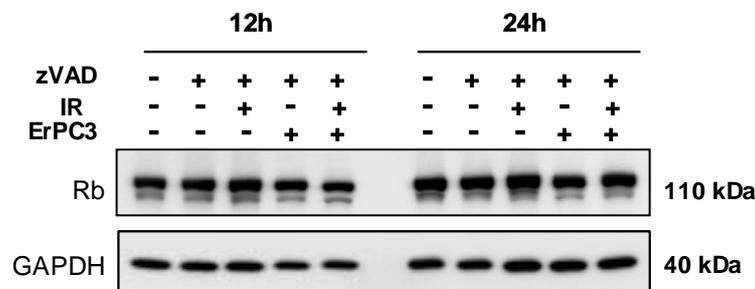
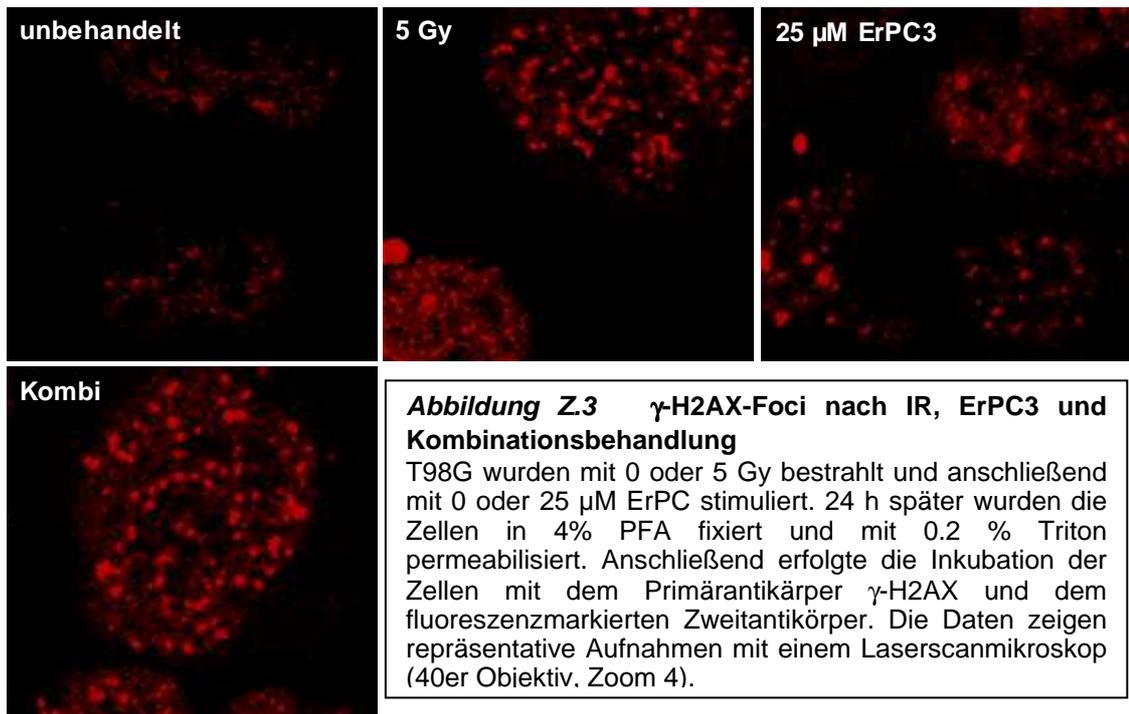


Abbildung Z.2 Status von Rb nach kombinierter Behandlung in Abhängigkeit aktiver Caspasen

Bak-positive JCAM wurden für 45 min mit 20 μ M zVAD-fmk Pan-Caspasen-Inhibitor vorinkubiert und anschließend mit 10 Gy bestrahlt, 25 μ M ErPC3 stimuliert oder kombinierter Behandlung unterzogen. 12 oder 24 h nach Behandlung wurden die Zellen lysiert und der Status von Rb im WB untersucht.

Als Ladekontrolle wurde der Level an GAPDH überprüft.



Danksagung

Zum Schluss sei allen gedankt, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Prof. Bamberg danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die Möglichkeit, nationale und internationale Kongresse zu besuchen.

Ebenfalls danken möchte ich Prof. Belka und Prof. Jendrossek für die Überlassung des interessanten Themas sowie die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung.

Besonders herzlicher Dank geht hierbei an Verena Jendrossek, deren ständige Gesprächsbereitschaft, hohe Motivation und engagierte Betreuung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Duszenko möchte ich für seine Bereitschaft danken, die vorliegende Arbeit in der Biochemie zu vertreten und zu betreuen.

Prof. Eibl danke ich für die großzügige Bereitstellung der Substanzen ErPC sowie ErPC3 und Prof. Budach für seine Unterstützung bei den Isobolgramm-Analysen.

René Handrick danke ich für eine durchweg tolle Zusammenarbeit, sein immer offenes Ohr, seine stete Hilfsbereitschaft sowie für viele fruchtbare Diskussionen um ErPC.

Mein Dank gilt außerdem André Mondry, der mich bei diversen Auseinandersetzungen mit meinem PC immer unterstützt hat und auch bei anderen „fächerübergreifenden Problemen“ mit Rat und Tat zur Seite stand.

Danke an das gesamte Laborteam für eine tolle Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und einen regen wissenschaftlichen und ebenso wichtigen weniger wissenschaftlichen Austausch.

Ferner gilt mein Dank Nikolas Pietrzik für seine liebevolle Unterstützung während der letzten zwei Jahre.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, die mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet und auf meinem Weg immer gefördert und unterstützt haben – ohne sie wäre ich heute nicht dort, wo ich jetzt bin.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren/Innen und Dozenten/Innen:

Aumüller, Beato, Belka, Boche, Eilers, Elsässer, Garten, Gaubatz, Grzeschik, Jendrossek, Jungclas, Koolmann, Lang, Lill, Löffler, Lührmann, McGregor, Melsheimer, Müller, Rieder, Rogausch, Röhm, Schäfer, Seifart, Seitz, Slater, Suske, Voigt, Waßmuth, Wesemann, Westermann, Westphal

Curriculum Vitae

Angaben zur Person

Name	Rübel, Amelie
Adresse	Quenstedtstr.24 72076 Tübingen
Telefon	07071-749553
E-mail	amelie_ruebel@yahoo.de
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum, -ort	18.07.1978, St. Ingbert
Familienstand	ledig

Ausbildung

seit 2004	Promotion: „Optimierung der Strahlentherapie durch zielgerichtete Modulation von Apoptose-Signalwegen“ Klinik für Radioonkologie / AG Experimentelle Radioonkologie, Universität Tübingen Arbeitsgruppe Prof. Belka/Jendrossek Abteilung Prof. Bamberg
1998 – 2003	Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg Diplomarbeit am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung: „Identifizierung von lin9-interagierenden Proteinen mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems“ Arbeitsgruppe Dr. Gaubatz Abteilung Prof. Eilers Abschluss: Diplom Humanbiologie
1989 – 1998	Saarpfalz- Gymnasium in Homburg Abschluss: Abitur