

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Department) Tübingen
Abteilung für Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, und klinische Immunologie,
Rheumatologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Induktion der Apoptose in humanen
Tumorzelllinien durch Inhibition der
Phosphatidylinositol-3-Kinase**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Dennis Nicolas Conzelmann aus Albstadt

2008

Dekan: Prof. Dr. Ingo B. Authenrieth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Brossart

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Sebastian Wesselborg

Meinen Eltern

1. Einleitung

1.1 Der programmierte Zelltod	6
1.1.1 Apoptose historisch	6
1.1.2 Die zwei Formen des Zelltodes: Apoptose und Nekrose	6
1.1.3 Apoptose und ihre Bedeutung im menschlichen Organismus	8
1.2 Caspasen: Todbringende Enzyme	9
1.2.1 Einteilung der Caspasen	9
1.2.2 Aktivierung der Caspasen	11
1.2.3 Regulation der Caspasen	13
1.3 Signalwege der Apoptose	14
1.3.1 Extrinsische/ Rezeptorvermittelte Apoptoseinduktion	15
1.3.1.1 Die Familie der Todesrezeptoren	15
1.3.1.2 Rezeptorvermittelte Apoptose am Beispiel des CD95-Systems	16
1.3.2 Intrinsische/ mitochondriale Apoptoseinduktion	19
1.3.2.1 Die Familie der Bcl-2-Proteine Schlüsselenzyme der Apoptose	20
1.3.2.2 Caspase-unabhängige Vermittler der Apoptose	22
1.3.3 Apoptoseinduktion durch das Endoplasmatische Retikulum	23
1.4 Die Bedeutung des PI3K/AKT-Kinaseweges	24
1.5 Apoptose und Chemotherapeutika	27
1.6 Fragestellung der Arbeit	29

2. Material und Methoden

2.1 Materialien	31
2.1.1 Geräte	31
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	32
2.1.3 Reagenzien	34
2.1.4 Antikörper	35

2.1.5 Medien und Lösungen	36
2.1.6 Kits	38
2.1.7 Tumorzelllinien	39
2.1.8 Pro- und antiapoptostische Wirkstoffe	39
2.2 Methoden	41
2.2.1 Zellkultur	41
2.2.1.1 Kultivierung von Zellen	41
2.2.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl	41
2.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen	42
2.2.2 Durchflußzytometrie (FACS)	42
2.2.2.1 Kernfragmentierung nach Nicoletti	44
2.2.2.2 Phosphatidylserin-Exposition	45
2.2.3 Fluorometrische Bestimmung der Caspase-Aktivität	46
2.2.4 MTT Assay	47
2.2.5 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest	48
2.2.6 Immunoblotting	49
2.2.6.1 Herstellung von Proteinlysaten	51
2.2.6.2 Herstellung von Kernextrakten	51
2.2.6.3 Western-Blot	52
2.2.7 Statistische Auswertung	53
3. Ergebnisse	
3.1 Die Inhibition der PI(3)-Kinase in humanen Nierenzellkarzinomen hemmt die Zytokin-Sekretion und induziert den apoptotischen Zelltod	54
3.2 Die Apoptoseinduktion durch PI(3)K-Inhibition ist unabhängig vom extrinsischen, rezeptorvermittelten Signalweg	58
3.3 Die Apoptoseinduktion infolge PI(3)K-Inhibition wird durch den intrinsischen, mitochondrialen Signalweg vermittelt	

und benötigt eine Aktivierung von Caspase-9	61
3.4 TRAIL und Etoposid potenzieren die Wirkung von PI(3)K-Inhibitoren in Jurkat-Zellen	65
4. Diskussion	67
5. Zusammenfassung	73
6. Ausblick	74
7. Literaturverzeichnis	75
8. Anhang	
8.1 Abkürzungsverzeichnis	95
8.2 Abbildungsverzeichnis	99
8.3 Tabellenverzeichnis	100
8.4 Danksagung	101
8.5 Lebenslauf	102

1. Einleitung

1.1 Der programmierte Zelltod

1.1.1 Apoptose historisch

In der Mitte des 19. Jahrhunderts entdeckte C. Vogt¹ bei der Untersuchung der Metamorphose in Amphibien einen Zelltod, der physiologisch gewollt zu sein schien. Hundert Jahre später wurden ähnliche Vorgänge auch bei der embryonalen Entwicklung von Säugetieren beobachtet und als programmierter Zelltod (PCD) bezeichnet. Anfang der siebziger Jahre fand der australische Pathologe Kerr bei der Beobachtung des Zelltodes von Hepatozyten morphologische Veränderungen, die sich deutlich von denen der Nekrose unterschieden². Die Veröffentlichung seiner Ergebnisse, in denen er beschreibt wie der Zelltod im Rahmen der Embryogenese vom klassischen, durch Verletzung herbeigeführten Zelluntergang, der Nekrose, differenziert werden kann, gilt heutzutage als eine Landmarke in der Apoptose-Forschung. Der Begriff „Apoptose“ (apo = ab, los, weg; ptosis = Senkung) beschreibt das Abfallen der Blätter im Herbst und gibt damit einen bildlichen Vergleich für das altruistische Absterben einzelner Zellen zum Wohle des Organismus. Im Jahr 1990 fanden Forscher heraus, dass ein tumorerzeugendes Gen bei Überexpression eine Apoptose der malignen Zellen verhindert³. Damit war die Apoptose zu einem der attraktivsten neuen Forschungsgebiete mit ständig ansteigenden Veröffentlichungszahlen geworden.

1.1.2 Die zwei Formen des Zelltodes: Apoptose und Nekrose

Prinzipiell können zwei Arten von Zelltod unterschieden werden - Apoptose und Nekrose.

Die *Nekrose* ist ein passiver, pathologisch bedingter Prozess. Sie entsteht durch Gewebsschädigung infolge äußerer Einflüsse wie Verbrennung,

Vergiftung, Strahlung oder mechanischer Verletzung. Initial kommt es zum Anschwellen der betroffenen Zellen und ihrer Zellorganellen. Die nachfolgende Desintegration der Plasmamembran führt zur Freisetzung von Proteasen und lysosomalen Enzymen, die im umliegenden Gewebe Entzündungsreaktionen hervorrufen⁹.

Die *Apoptose* dagegen ist ein aktiver Prozess, der kontrolliert abläuft und durch stereotype morphologische und biochemische Veränderungen charakterisiert ist. Auf molekularer Ebene lässt sich die Apoptose in drei Phasen unterteilen¹⁰: Induktion, Regulation und Exekution.

Induktionsphase: Induziert werden kann die Apoptose entweder durch das Einschalten des apoptotischen Mechanismus während bestimmter Entwicklungsphasen wie z.B. der Organogenese von der Zelle selbst oder als Antwort auf schwerwiegende Störungen wichtiger zellulärer Funktionen infolge von Strahlungseinwirkung, Chemotherapeutika¹¹, oxidativem Stress oder Energiemangel¹². Auch durch die Bindung natürlicher Liganden an ihre Rezeptoren, z.B. an Oberflächenrezeptoren der Tumornekrose (TNF)- bzw. Nervenwachstumsfaktor (NGF)-Rezeptorfamilie, CD95 (Fas/APO) und TNFR-1^{13,14}, kann der programmierte Zelltod herbeigeführt werden. Die Kenntnis von Substanzen, die zelltypspezifisch Apoptose auslösen können, ist in der Krebsforschung von extremer Wichtigkeit, da mit solchen Hilfsmitteln Tumore in ihrem Wachstum gehindert oder gar vollständig eliminiert werden können.

Regulationsphase: Die Regulation der Apoptose erfolgt durch eine Verkettung intrazellulärer molekularer Ereignisse, die anfangs (*upstream*) sehr unterschiedlich verlaufen können, aber fortschreitend (*downstream*) gemeinsame regulatorische Komponenten aufweisen. Eine zentrale Rolle bei der Regulation des programmierten Zelltodes (PCD) spielen die Mitochondrien¹⁵. Für die Weiterleitung der apoptotischen Signale wird eine Familie von Cystein-Proteasen, die Caspasen, verantwortlich gemacht.

Exekutionsphase: Die Exekution, also die Ausführung des programmierten Zelltodes, ist in der frühen Phase der Apoptose durch die Externalisierung des Membran-Phospholipids Phosphatidylcholin¹⁶ charakterisiert. Desweiteren kommt es zur Schrumpfung von Zellkern, Cytoplasma und Mitochondrien. Da

die Zellmembran jedoch unbeschädigt bleibt, findet beim PCD keine Entzündungsreaktion statt. Infolge des sinkenden Zellvolumens verliert die Zelle ihren Kontakt zu den Nachbarzellen und tritt in eine als Zeiose¹⁸⁶ (Ausstülpung der Membran, *blebbing*) bezeichnete Phase ein. Während der Zeiose verdichtet sich das Chromatin (DNA und assoziierte Strukturproteine) und wird fragmentiert⁴. Schließlich zerfällt die Zelle in membranumschlossene apoptotische Körperchen, die von Nachbar- oder Fresszellen eliminiert werden^{17,18}.

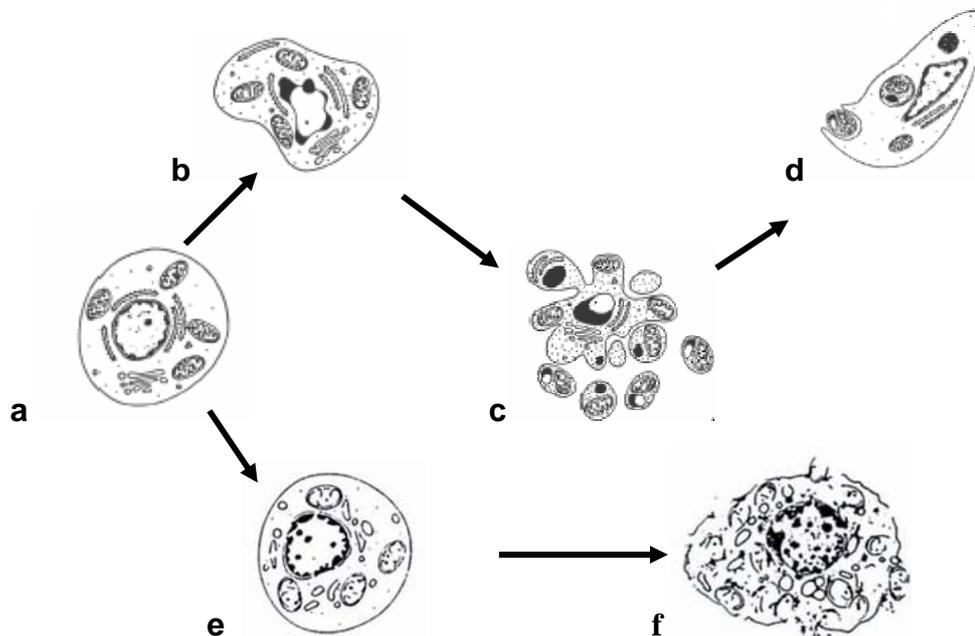


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen in apoptotischen Zellen und nekrotischen Zellen¹⁸⁴. *Apoptose* (a: normale Zelle, b: Kondensation von Cytoplasma und Zellkern nach Zellschrumpfung, c: anschließend Fragmentierung von Zellkern (Karyorrhexis) und Cytoplasma in apoptotische Körperchen, d: Abbau der Vesikel durch Nachbarzellen oder Makrophagen mittels Phagozytose und lysosomale Verdauung). *Nekrose* (e: Anschwellen von Zelle und Zellogranellen, f: Ruptur der Zellmembran)

1.1.3 Apoptose und ihre Bedeutung im menschlichen Organismus

Jede Sekunde sterben im menschlichen Körper Millionen von Zellen durch programmierten Zelltod. Die Apoptose bildet einen essentiellen Teil der Gewebshomöostase in multizellulären Organismen, da sie auf physiologische Art und Weise, ohne den Körper mit Entzündungsreaktionen zu belasten,

überflüssige oder potentiell schädliche Zellen entfernt⁴. Bereits während der Embryonalentwicklung, wie z.B. bei der Formgebung von Körper und Organen spielt der gezielte apoptotische Tod eine wichtige Rolle. Auch Nervenzellen werden in der Embryogenese des Menschen zunächst im Überschuss produziert und gehen anschließend bei fehlendem Zellkontakt durch Apoptose wieder zugrunde. Das komplexe Zusammenspiel von Mitose, Zelldifferenzierung und Zelltod ist auch für den weiteren Erhalt des Organismus unerlässlich. Dieses Gleichgewicht zwischen Zellteilung und Zellsterben ist besonders gut in sich ständig erneuernden Geweben, wie z.B. dem Darmepithel und den oberen Hautschichten beobachtbar. Die Apoptose spielt dabei die komplementäre Rolle zur Mitose in der Regulation der Zellzahl. Störungen innerhalb dieses Gleichgewichts führen zu Missbildungen und Erkrankungen. Zahlreiche Neoplasien⁵, virale Infektionen, Autoimmundefekte, neurodegenerative Erkrankungen^{6,7} und auch AIDS⁸ sind mit Fehlregulationen der Apoptose assoziiert.

1.2 Caspasen: Todbringende Enzyme

1.2.1 Einteilung der Caspasen

Die morphologischen Veränderungen der Zelle, die in ihrer Desintegration und Phagozytose münden, stellen nur den finalen Teil der Apoptose dar. Ein zentraler Bestandteil des programmierten Zelltodes ist ein proteolytisches System¹⁹, welches durch posttranslationale Modifikation von Proteinen kaskadenartig aktiviert wird und irreversibel die apoptotischen Veränderungen herbeiführt. Die Schlüsselenzyme dieses Systems für die Exekution des PCD bilden eine Gruppe von Cystein-Proteasen, die als Caspasen¹⁹ bezeichnet werden. Erstmals mit der Apoptose in Zusammenhang gebracht wurden diese Proteine nach der Entdeckung, dass das ICE (*Interleukin-1 β -converting enzyme*) der Säugetiere Ähnlichkeit mit CED-3 (*cell death defective-3*), einem bei *Caenorhabditis elegans* in der Regulation des Zelltodes bedeutsamen Proteins, besitzt^{20,21}.

Bisher konnten bei den Säugern 14 verschiedene Caspasen identifiziert werden, von denen 11 auch beim Menschen nachgewiesen wurden. Phylogenetisch lassen sich die Caspasen in zwei Subfamilien einteilen, wobei zusätzlich anhand der Substratspezifität dieser Enzyme 3 Gruppen unterschieden werden^{27,28} (Abbildung 1.3). Diese Spezifität scheint sowohl auf Spaltungsmotiven (bestimmte Aminosäuresequenz) als auch auf der Sekundär- und Tertiärstruktur des Substrates zu beruhen³¹. Auffallend bei den für die Apoptose relevanten Caspasen (Gruppe II und III) ist, dass die Substratspezifität der Caspasen der Gruppe III mit den zur Aktivierung erforderlichen Schnittstellen in den Caspasen II und III übereinstimmt. Daraus lässt sich eine Reihenfolge in der Aktivierung von Initiator- oder Upstream-Caspasen (Gruppe III) zu Effektor- oder Downstream-Caspasen³² (Gruppe II) ableiten, die in Caspase-8- oder Caspase-9-knock-out –Mäusen bestätigt wurde³³⁻³⁵.

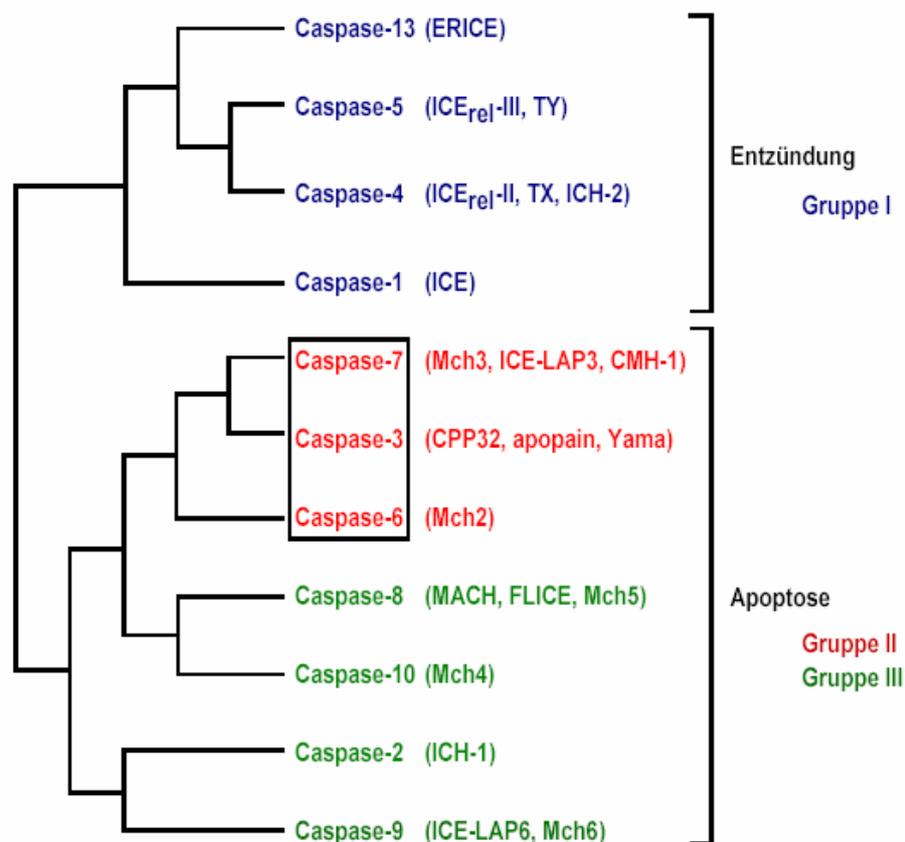


Abbildung 1.2: Die Familie der humanen Caspasen: phylogenetische und Substratspezifische Einteilung^{28,99}. Gruppe I (blau) vermittelt die Prozessierung von Cytokinen, Gruppe II (rot) und Gruppe III (grün) haben große Bedeutung für die Apoptose.

1.2.2 Aktivierung der Caspasen

Alle Caspasen werden zunächst als inaktive Vorstufen (Zymogene) synthetisiert und sind erst nach proteolytischer Spaltung aktiv. Die einkettigen Zymogene bestehen aus jeweils drei Domänen: einer großen Untereinheit (~20 kD), einer kleinen Untereinheit (~10 kD) und einer N-terminalen Prodomäne. Darüber hinaus können die Caspasen noch sog. CARDS (*Caspase – recruitment domain*) oder DEDs (*Death effector domain*) enthalten, welche die Interaktion mit anderen Proteinen, z.B. eines *death-receptors* wie im Falle der Caspase-8, ermöglichen. Die drei Domänen werden durch Spaltung an spezifischen Aspartat-Resten getrennt, wodurch ein Heterodimer aus einer großen und einer kleinen Untereinheit entsteht. Zwei dieser Heterodimere lagern sich zu einem Tetramer zusammen und bilden so eine aktive Caspase (Abbildung 1.2).

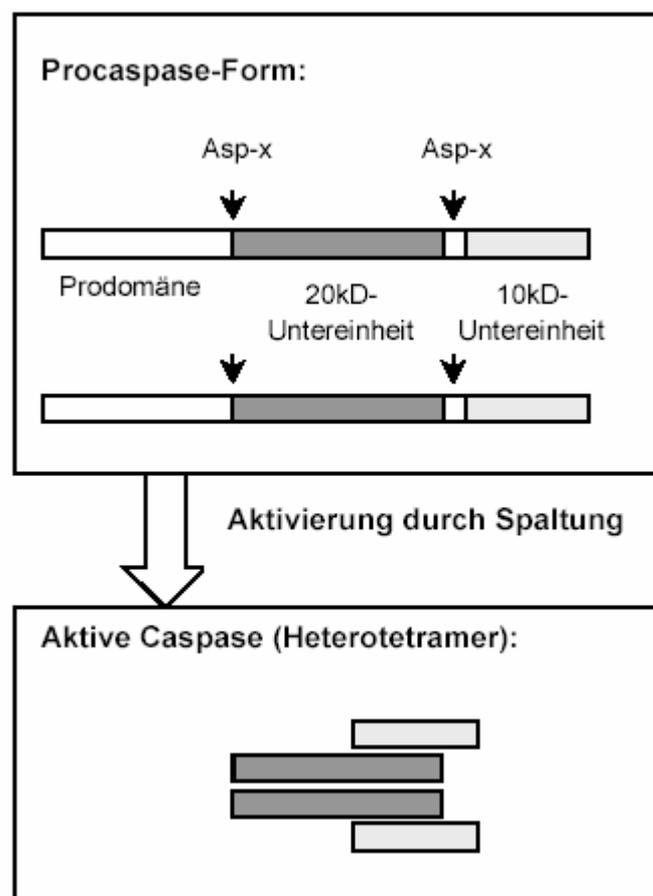


Abbildung 1.3: Aktivierung der Caspasen. Durchproteolytische Spaltung der Caspasen entstehen aktive Heterotetramere mit jeweils zwei katalytische Zentren.

Diese Heterotetramere verfügen über zwei katalytische Zentren, die unabhängig voneinander agieren^{22,23}. Insgesamt bestehen diese beiden Regionen der aktivierten Caspase aus vier flexiblen Schleifen, wobei sich drei dieser Schleifen auf derselben Seite des Enzyms befinden. Während die P1-Position des Moleküls, welche hochspezifisch mit dem Aspartatrest des entsprechenden Substrates interagiert^{24,25}, in allen Caspasen gleich ist, unterscheiden sich die anderen drei Positionen in den verschiedenen Cystein-Proteasen und bedingen dadurch vor allem die Substratspezifität dieser Enzyme.

Durch die Aktivierung des apoptotischen Prozesses werden an die 200 Polypeptide proteolytisch degradiert³⁶. Die zellulären Funktionen, welche durch die Caspasen beeinflusst werden, beinhalten neben dem Apoptose-Signalweg, Zell-Zyklus, -wachstum und Erhalt der Zellstruktur (siehe Tabelle 1.3).

Auf diese Weise greifen die Caspasen in sämtliche Signalwege, die für das Überleben der Zelle essentiell sind, zentrale Proteine an, um den Zelltod herbeizuführen. So führt z.B. die Spaltung von Strukturproteinen wie Fodrin²⁸, Gesolin³⁷ oder Plakoglobin zur Reorganisation der zellulären Struktur und zur Auflösung der interzellulären Kontakte während der Apoptose.

Unabhängig von apoptotischem Stimulus und Zelltyp werden zudem während des Zelltodprogramms ungefähr 70 Kernmatrix-Proteine von Caspasen gespalten und ins Cytosol freigesetzt³⁸. Dabei kommt es zum Abbau der Kernlamina und zur Störung des nukleären Transports durch die Kernpore. In Folge der Aktivierung der Endonuklease CAD (*Caspase-activated DNase*), welche durch die Abspaltung der Untereinheit ICAD (*Inhibitor of CAD*) mittels Caspase 3 initiiert wird, kommt es nach Translokation der DNase in den Zellkern zu der typischen internukleosomalen DNA-Fragmentierung³⁹⁻⁴¹.

Eine weitere bemerkenswerte Funktion der Caspasen ist die Ausschaltung zellprotektiver Mechanismen. So wird neben den Apoptose-Inhibitoren der Bcl-2 Familie z.B. auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B⁴², ein wichtiger Regulator vieler antiapoptotischer Proteine wie c-IAP, Bcl-2 oder Bcl-X, durch eine Caspase-3 vermittelte Bindung von I κ B an NF- κ B in seiner Funktion gehemmt.

Zytoskelett-, Strukturproteine		Proteinkinasen in der Signaltransduktion	
Fodrin	Zytoskelett	Proteinkinase C δ	Signaltransduktion
Plakoglobin	Zelladhäsion	MEKK1	MAP-Kinase-Weg
Aktin	Zytoskelett	p21-aktivierte Kinase	MAP-Kinase-Weg
Keratin-18, -19	Intermediär-Filament	Calmodulin-Kinase IV	Signaltransduktion
Zellzyklus- u. Replikation		Andere Signalvermittler	
Topoisomerase-I	DNA-Replikation	Proteinphosphatase 2A	Signaltransduktion
MDM2/ HDM2	p53-Inhibitor	p21b38	Bcl-2-Adaptor des endoplasmatischen Retikulums
Cdc27	Zellzyklus		
Cyclin A	Mitose		
Transkription & Translation		Weitere Substrate	
STAT1	Signaltransduktion	Calpastatin	Calpaininhibitor
NF- κ B (p50, p65)	Zytokine und Anti-apoptosegen	Nedd4	Ubiquitin-Proteinligase
I κ B- α I	Inhibitor von NF- κ B	Bcl-2	Apoptose-Inhibitor
Sp1	Transkriptionsfaktor	Bcl-xL	Apoptose-Inhibitor
U1-70 kD sRNP	prä-mRNA -Splicing	Bid	Apoptose-Aktivator
		hsp90	Hitzeschockprotein
Spaltung und Reparatur der DNA		Zytokinorstufen	
Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP)	DNA-Reparatur	Pro-Interleukin-1 β	Immunregulation
DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK)	DNA-Reparatur	Pro-Interleukin-16	Immunregulation
		Pro-Interleukin-18	Immunregulation

Tabelle 1.1: Caspase-Substrate: Beispiele einiger Substrate von Caspasen, die an der Apoptose beteiligt sind.

1.2.3 Regulation der Caspasen

Aufgrund der großen Bedeutung der Caspasen im Rahmen der Apoptose unterliegen diese Proteine einem strengen Regulationsmechanismus. Um einen unkontrollierten Zelltod zu vermeiden, werden Caspasen durch die Proteine der Familie der IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*) inhibiert^{122,123}. Diese Familie besteht aus den Proteinen c-IAP1, cIAP2, X-IAP, NIAP und Survivin, wobei alle, insbesondere die Effektorproteine, antiapoptotisch beeinflussen. X-IAP besitzt die höchste inhibitorische Potenz und hemmt die Caspasen-3 und -7 einhundertmal stärker als c-IAP1 oder c-IAP2¹²⁴. Es ist zudem bisher das einzige IAP, welches in der Lage ist, Caspase-9 zu inhibieren¹²⁵. Die funktionelle Einheit aller IAPs wird durch ein Cystein/Histidin-reiches Motiv

gebildet, welches in 1-3 Kopien vorliegt. Diese Region wird auch als BIR (*baculoviral IAP repeat*) bezeichnet. Die meisten IAPs der Säugetiere enthalten mehrere BIRs, welchen jeweils unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden können. Mit Ausnahme von NIAP, besitzen alle IAP-Mitglieder zudem eine Zinkfinger-ähnliche Domäne am C-Terminus.

Der Hemmung der Caspasen durch den anti-apoptotischen Effekt der IAPs wirken Proteine entgegen, die im Zuge der Desintegration der mitochondrialen Membran freigesetzt werden¹²⁶. Ein wichtiges Mitglied dieser Proteinfamilie ist das mitochondriale Protein Smac¹²⁷, auch DIABLO¹²⁸ genannt. Smac/ DIABLO wird nach apoptotischem Stimulus zusammen mit Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Cytosol freigesetzt und hemmt nach Interaktion mit der BIR3-Domäne der IAPs die IAP-vermittelte Inhibition der Effektorcaspasen¹²⁹ (s. Abb. 1.8).

1.3 Signalwege der Apoptose

Grundsätzlich können bei der Initiation der Apoptose drei verschiedene Wege differenziert werden:

- 1.) extrinsisch, über die Bindung spezifischer Liganden an so genannte *death receptors*, also Oberflächenrezeptoren, die das apoptotische Signal in das Zellinnere weiterleiten.
- 2.) intrinsisch, über den mitochondrialen Weg infolge der Einwirkung verschiedener extra- und intrazellulärer Stressfaktoren auf die Zelle wie z.B. Hypoxie, Entzug von Wachstumsfaktoren und DNA-Schäden.
- 3.) über das endoplasmatische Retikulum.

1.3.1 Extrinsische/ rezeptorvermittelte Apoptoseinduktion

1.3.1.1 Die Familie der Todesrezeptoren

Der bereits im Jahre 1975 isolierte Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) war das erste Mitglied und damit Namensgeber für die hier besprochene Familie von Zytokinen und deren Rezeptoren⁴³. Die zytotoxische Wirkung von TNF α ⁴⁴ auf Tumorzellen in vitro sowie die Induktion hämorrhagischer Nekrosen in transplantierten Tumoren im Tierversuch, weckte zunächst die Hoffnung, einen neuen Weg in der Tumorthherapie gefunden zu haben. Die hohe Toxizität auch für gesundes Gewebe, die ubiquitäre Expression der zugehörigen Rezeptoren sowie die vielfältigen anderen biologischen Effekte, ließen aber bald erkennen, dass TNF α die zunächst geweckten Erwartungen nicht erfüllen würde.

Die rezeptorvermittelte Apoptose wird durch sogenannte *death receptors* ermöglicht. Diese Rezeptoren bilden eine Untergruppe der TNF-/ NGF-Rezeptor-Superfamilie⁴⁵ und zeichnen sich durch zwei bis sechs Cystein-reiche extrazelluläre Domänen aus^{46,47}. Alle Mitglieder dieser Familie sind Typ-I Transmembranproteine. Sie tragen also ein intrazelluläres, C-terminales Ende und ein extrazellulär, N-terminales Ende. Zudem besitzen sie eine intrazelluläre „*death domain*“ (DD), welche aus ca. 80 Aminosäuren besteht und entscheidend für die Transduktion des apoptotischen Signals ist^{48,49}. TNF-Rezeptoren werden in den verschiedensten Zellarten exprimiert und haben pleiotrope Funktionen. Abhängig von Zelltyp und Ligand, können sie Proliferation, Differenzierung, Überlebenssignale oder Zelltod vermitteln⁵⁰⁻⁵².

Bislang sind acht Mitglieder der Todesrezeptorfamilie identifiziert worden. Dazu gehören: DR-1 (TNF-R1), DR-2 (CD95, Apo-1 oder Fas), DR-3 (Apo-3, LARD, TRAMP, WSL1), DR-4 (TRAIL-R1), DR-5 (TRAIL-R2), DR6, EDAR (*ectodermal dysplasin receptor*) und NGFR (*nerve growth factor receptor*, p75NTR)^{53,54}. Wie die Zelltodrezeptoren besitzen auch ihre Liganden (s. Tab. 1.4), mit Ausnahme von NGFR, untereinander strukturelle Homologie. Sie werden membranständig als Trimere synthetisiert und führen über eine Rezeptoroligomerisierung zur Signalweiterleitung⁵⁵⁻⁵⁷. Die meisten Liganden [Ausnahme: VEGF (*vascular*

endothelial cell-growth inhibitor)] werden als Typ-II Transmembranproteine synthetisiert. Hierbei liegt das N-terminale Ende intrazellulär, das C-terminale Ende extrazellulär und es existiert nur eine transmembrane Domäne.

1.3.1.2 Rezeptorvermittelte Apoptose am Beispiel des CD95-Systems

Die Signaltransduktion der durch Todesrezeptoren vermittelten Apoptose ist am CD95-Rezeptor/Ligand-System bisher am besten untersucht worden und spielt bei drei Formen der physiologischen Apoptose eine wesentliche Rolle⁵⁰:

- (1) Beseitigung aktivierter reifer T – Zellen am Ende einer Immunantwort,
- (2) Zerstörung von virus-infizierten Zellen oder Krebszellen durch zytotoxische T-Zellen oder natürliche Killerzellen,
- (3) Zerstörung von Entzündungszellen an immunprivilegierten Stellen des Körpers wie dem Auge.

CD95 (APO-1, Fas) ist ein glykosyliertes Oberflächenprotein mit einer Größe von 45-52 kDa (335 Aminosäuren)⁵⁸. Die Bindung von membrangebundenen (mCD95L) oder durch Metalloproteasen⁵⁹ erzeugten löslichen (sCD95L) CD95-Liganden bewirkt eine Trimerisierung und Aktivierung des als PLAD-Domäne (Pre-Ligand Assembly Domain) vorliegenden Rezeptors. Dabei kommt es zur Bildung des DISC-Komplexes (*death-inducing-signaling-komplex*)⁶⁰, indem der intrazelluläre Teil des CD95-Rezeptors über seine *death domain* das Adapterprotein FADD (*Fas-associated death domain*, auch MORT1, *mediator of receptor-induced toxicity 1*) bindet, das wiederum eine Effektor-„*death domain*“ enthält⁶¹. Diese Todeseffektordomäne (DED, *death effector domain*) bindet ihrerseits an die analoge DED der Procaspase-8⁶²⁻⁶⁵. Diese Assoziation von Procaspase-8 (FLICE, MACH, Mch5) an FADD führt vermutlich zu einer Konformationsänderung des Zymogens und zur Bildung von Heterotetrameren. Konsekutiv erfolgt so am DISC autokatalytisch eine Aktivierung der Caspase 8, die in der Folge weitere Caspasen (Caspase 3,6,7) aktivieren kann und auf diese Weise das apoptotische Signal in das Innere der Zelle weiterleitet⁶⁶ (s. Abb. 1.4).

Die über Todesrezeptoren vermittelte Apoptose kann durch sogenannte FLIPs (*FLICE inhibitory protein*) unterbrochen werden. cFLIP wird in verschiedenen Geweben exprimiert, wobei zwei Splicevarianten existieren. Während sich die kurze Form cFLIP_s ähnlich Caspase-8 durch zwei n-terminale DED-Motive auszeichnet, besitzt die lange Variante cFLIP_L zusätzlich eine C-terminale Domäne, vergleichbar mit der proteolytischen Domäne von Caspase-8 und -10. Da im aktiven Zentrum das katalytische Cystein durch Tyrosin ersetzt ist, ist diese Struktur folglich inaktiv. cFLIP assoziiert mit Procaspase-8 oder FADD und verhindert dadurch die Entstehung des DISC-Komplexes⁶⁷⁻⁶⁹.

Des Weiteren können bei der CD95-vermittelten Apoptose zwei Signalwege unterschieden werden, die abhängig vom Zelltyp sind⁷⁰. In sogenannten Typ I Zellen kann Procaspase-8 in ausreichend großer Menge an den DISC rekrutiert werden, so dass Caspase-3 direkt über Caspase-8 aktiviert wird⁷¹. Typ II Zellen (z.B. CEM, Jurkat) besitzen zwar gleiche Mengen an CD95 und allen anderen Signalmolekülen, jedoch ist die Bildung des DISC so uneffizient, dass nur geringe Mengen aktiver Caspase-8 entstehen, die für eine direkte Prozessierung von Caspase-3 nicht genügen. Allerdings reicht die Caspase-8-Aktivierung aus, um das Protein Bid in seine aktive Form (tBid oder p15Bid) zu überführen⁷²⁻⁷³, wodurch die apoptogene Aktivität der Mitochondrien induziert und so Caspase-3 und -8 über den mitochondrialen Signalweg aktiviert werden können (siehe Punkt 1.2.3.2).

Die Weiterleitung des apoptotischen Signals am CD 95-Rezeptor über ein System hierarchischer Module, das aus einem zum Rezeptor rekrutierten Adapterprotein, einer apikalen Initiatorcaspase und einem Netzwerk aus Effektorcaspasen besteht, ist exemplarisch für alle bisher bekannten „*death receptors*“.

Sowohl FADD, als auch Caspase-8 erscheinen als essentielle Komponenten des DISC aller Todesrezeptoren⁷⁴⁻⁷⁶. DR 1 (TNFR 1), TRAMP und DR 6 benötigen als zusätzliches Bindeglied zwischen Rezeptor und FADD das zwei Todesdomänen enthaltende TRADD⁷⁷⁻⁷⁹. Auch Caspase-10 scheint neben Caspase-8 eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung durch TRAIL-Rezeptoren zu spielen.

Die Bedeutung einer medikamenten-induzierten Apoptose über eine erhöhte Expression von CD95 und CD95-Liganden ist ein Forschungsschwerpunkt vieler Arbeitsgruppen. Analog zum T-Zell-Rezeptor-vermittelten Zelltod wird hierbei eine Apoptose über para- oder autokrine Schleife infolge von CD95/CD95-L-Interaktion suggeriert¹³⁰⁻¹³². Jedoch gibt es auch Studien, die eine Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika unabhängig von Todesrezeptoren vermuten lassen¹³³⁻¹³⁵. Interessanterweise wurde selbst eine Caspase-8-Aktivierung in Abwesenheit eines Todesrezeptorsignals beobachtet, was die Möglichkeit einer postmitochondrialen Caspase-8-Rekrutierung nahe legt¹³⁶. Welche Funktion Caspase-8 in diesem Zusammenhang trägt, ist noch ungeklärt.

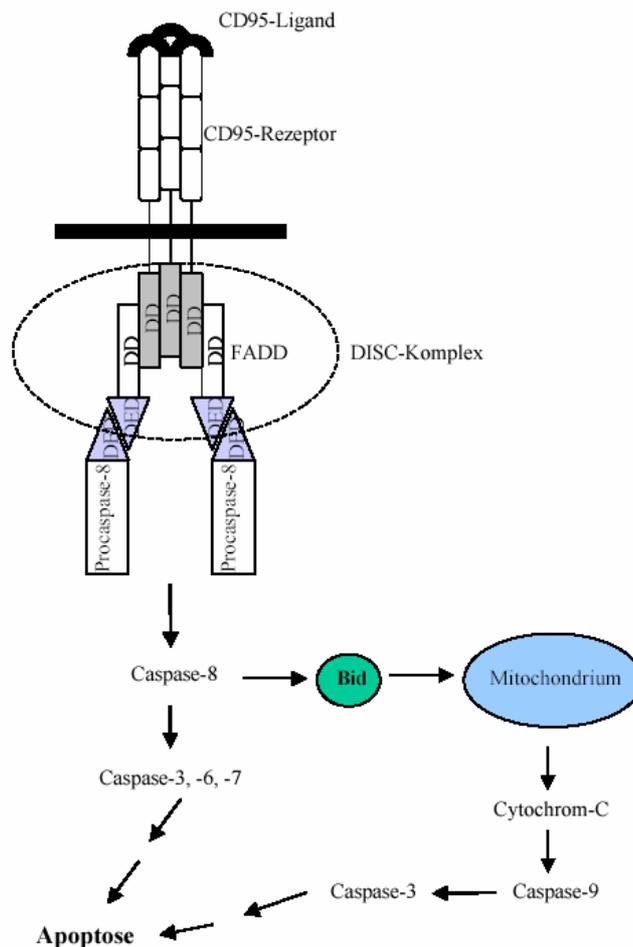


Abbildung 1.4: CD 95-Signalweg. Nach der Rezeptortrimerisierung werden Adaptermoleküle wie FADD rekrutiert. Die Bindung der Procaspasen in den DISC ermöglicht deren Autokatalyse und löst die Apoptose aus (DD: death domain, DED: death effector domain, DISC: death inducing signalling complex)¹⁸⁵.

1.3.2 Intrinsische/ mitochondriale Apoptoseinduktion

In den letzten Jahren hat sich immer deutlicher die zentrale Rolle der Mitochondrien im Rahmen der Apoptose herauskristallisiert⁸⁰. Der intrinsische Apoptoseweg, der über eine Vielzahl apoptotischer Stimuli, wie z.B. Chemotherapeutika oder Strahlung, ausgelöst werden kann, wird durch das Mitochondrium über eine Freisetzung von Cytochrom C (s. Abb. 1.5), einem Enzym der Atmungskette, initiiert⁸¹⁻⁸⁵. Auch über den oben beschriebenen rezeptorvermittelten Weg kann durch eine Caspase-8-bedingte Spaltung von Bid, einem proapoptotischen Mitglied der Bcl-2-Familie, und eine nachfolgende Translokation des Bid-Fragmentes an das Mitochondrium die Cytochrom-C-Freisetzung ausgelöst werden⁸⁶⁻⁸⁸. Diese Freisetzung entsteht in Folge eines Abfalls des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$), ausgelöst durch eine Änderung in der Permeabilität der Mitochondrienmembran. Pharmakologische und funktionelle Studien zeigten, dass dieser Verlust der Integrität der mitochondrialen Membran aufgrund einer Öffnung von sogenannten Permeabilitätstransitions-Poren (PT) erfolgt⁸⁹. Dieser Vorgang wird *Permeability shift transition* genannt. Die PT ist ein Multiproteinkomplex an dessen Bildung als äußeres Membranprotein ein spannungsabhängiger Anionenkanal (VDAC, *voltage-dependent anion channel*), als inneres Membranprotein einen Adeninnukleotid-Translokator (ANT), das wasserlösliche Matrixprotein Cyclophilin D, Hexokinase und mehrere weitere Proteine beteiligt sind⁹⁰. Das entwichene Cytochrom C bildet im Cytosol zusammen mit dATP das CED-4-Homolog Apaf-1. Dieses Ereignis legt die *caspase recruitment domain* (CARD) von Apaf-1 frei und ermöglicht dadurch die Bindung und Aktivierung der Procaspase-9 über eine CARD/CARD-Interaktion⁹¹. Der entstandene Proteinkomplex wird als Apoptosom bezeichnet. Caspase-9 ihrerseits ist für die Aktivierung der nachfolgenden Effektorcaspasen verantwortlich und kann daher, wie Caspase-8 im extrinsischen Aktivierungssystem, als zentraler Initiator des mitochondrialen Apoptoseweges gesehen werden.

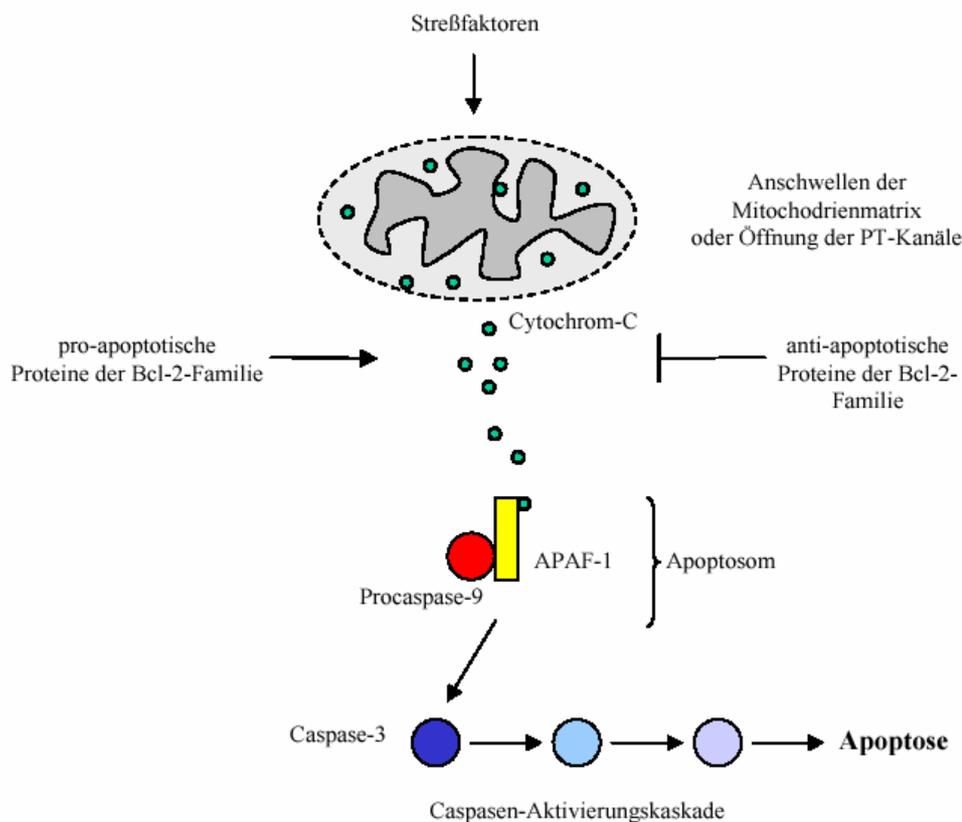


Abb. 1.5: Mitochondrialer-Apoptoseweg^{4,185} (nähere Erläuterungen siehe Text).

1.3.2.1 Die Familie der Bcl-2-Proteine: Schlüsselenzyme der Apoptose

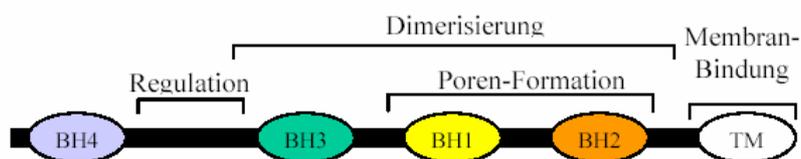
Anders als die Induktion des PCD über Todesrezeptoren, wird der mitochondriale Weg zusätzlich durch die pro- und antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie (*B-Cell-Leukemia-2*) reguliert. Das erste in humanen Zellen entdeckte Regulatorgen dieser Familie war Bcl-2. Eine erhöhte Aktivität des Gens, bedingt durch eine Chromosomen Translokation, war in humanen follikulären Lymphomzellen beobachtet worden^{92,93}, und führte unerwarteterweise zu einem Überleben der Cytokin-abhängigen Zellen in Abwesenheit von Cytokinen⁹⁴. Die bisher entdeckten, Apoptose-regulierenden Genprodukte der Bcl-2-Familie lassen sich in Apoptoseantagonisten wie Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1 und A1, und in Apoptoseagonisten wie Bax, Bak, Bcl-xS, Bad, Bid, Bik und Hrk unterteilen⁹⁵⁻⁹⁸. Antiapoptotische Bcl-2

Proteine sind interessanterweise in vielen Tumoren vermehrt überexprimiert. So fördert z.B. Bcl-2 das Überleben von Zellen, indem es die Bildung von Cytochrom-C-freisetzenden Membrankanälen reduziert¹³⁷ und die Aktivierung von Caspasen verhindert¹³⁸. Alle Mitglieder der Bcl-2-Familie sind durch den Besitz von bis zu 4 verschiedenen Bcl-2-Homologie(BH)-Domänen gekennzeichnet (s. Abb. 1.7) und können über ein komplexes Netzwerk von Homo- und Heterodomänen miteinander interagieren. Die Gruppe der proapoptotischen Moleküle wird weiter unterteilt in die Bax- und die BH3-Unterfamilie, wobei letztere nur BH3 (*BH3-only Proteins*) besitzt⁹⁹. Dies deutet darauf hin, dass BH3 die essentielle Domäne für die proapoptotische Funktion darstellt¹⁰⁰. Die antiapoptotischen Mitglieder enthalten die Domänen BH1 bis BH4, wobei die Domäne BH4 mit Ausnahme von Bcl-xS ausschließlich in den antiapoptotischen Proteinen zu finden ist. Proteine der BH3-Untergruppe wirken alle proapoptotisch, jedoch erfolgt dies nur indirekt über eine Beeinflussung der anderen Proteine der Bcl-2-Familie. So inhibieren beispielsweise Bik und Bad die Apoptoseantagonisten Bcl-xL und Mcl-1, während Bid und Bim die proapoptotischen Proteine Bad und Bax aktivieren.

1) Anti-apoptotisch

Bcl-2-Untergruppe

Bcl-2, Bcl-X_L,
Bcl-w, Mcl1



2) Pro-apoptotisch

Bax-Untergruppe

Bax, Bak, Bok



BH3-Untergruppe

Bik, Bad, Bmf, Hrk, Bim,
Noxa, Puma



Bid



Abb. 1.6: Mitglieder der Bcl-2-Familie. 1) antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Untergruppe; 2) die proapoptotische Gruppe wird weiter unterteilt in die Bax-Untergruppe (Domänen BH1, BH2 und BH3) und die BH3-Untergruppe, deren Mitglieder nur die Domäne BH3 aufweisen¹⁸⁵.

Viele Bcl-2-Mitglieder, insbesondere die antiapoptotischen wie Bcl-2, sind Membranproteine, wobei das NH₂ – Ende im Zytosol liegt und eine hydrophobe Domäne (TM) am COOH–Ende die Insertion auf der zytosolischen Seite intrazellulärer Membranen ermöglicht¹⁰¹. Die Verankerung von Bcl-2 in der mitochondrialen Membran gibt einen Hinweis auf seinen Wirkmechanismus. Das Protein verhindert wahrscheinlich über eine Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials die Freisetzung pro-apoptotischer Substanzen aus dem Mitochondrium. Andere Homologe wie Bax, Bak und Bid translozieren erst nach Aktivierung vom Zytosol an die Mitochondrienmembran^{102,103}.

Cytosolisches Bax wird durch trunkiertes Bid (tBid) nach Spaltung durch Caspase–8 aktiviert und stellt dadurch auch eine Verbindung zwischen Todesrezeptor und mitochondrialem Apoptoseweg dar^{104,105}. Infolgedessen wird Bax aus den inhibitorischen Komplexen mit Bcl–2 freigesetzt und nach Homodimerisierung schließlich in die äußere Mitochondrienmembran eingebaut, um dort die Apoptose zu induzieren. Der genaue Mechanismus dieses letzten Schrittes ist noch ungeklärt. Man nimmt an, dass bestimmte Mitglieder der Bcl-2-Familie selbst Kanäle ausbilden können, die die Freisetzung von proapoptotischen mitochondrialen Proteinen wie Cytochrom-C oder AIF ermöglichen. Hierbei scheinen die Domänen BH1 und BH2 für die Ausbildung der Membranporen eine wesentliche Rolle zu spielen. Diese Vermutung wird durch die auffallende Ähnlichkeit der dreidimensionalen Struktur von Bcl–X_L (s. Abb. 1.6 mit dem Poren–bildenden Diphtherietoxin unterstützt¹⁰⁶. Möglicherweise vermitteln die Bcl-2-Proteine auch nur die Öffnung der mitochondrialen PT–Poren. Untersuchungen, wonach Bax mit den Porenbestandteilen VDAC oder ANT interagieren kann, stützen diese Theorie^{106,107}. Zudem inhibiert Bcl–X_L direkt die Spaltung von Procaspase-9 durch Apaf-1 und verhindert dadurch die Bildung des Apoptosoms¹⁰⁸.

1.3.2.2 Caspase-unabhängige Vermittler der Apoptose

Infolge der Öffnung der Permeabilitätstransitions-Poren in der Mitochondrienmembran, werden neben Cytochrom C die Intermembranproteine

Apoptosis inducing factor (AIF), Endonuklease G, Smac/DIABLO und Htra2, alle caspase-unabhängige Apoptose-Mediatoren, in das Cytosol entlassen. Das Flavoprotein AIF transloziert nach Freisetzung aus dem intermembranösen Raum der Mitochondrien in den Zellkern und bewirkt dort Chromatinkondensation, Fragmentierung der DNA in hochmolekulare Fragmente (~50 kb) und die PCD-typische Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran^{109,110}. Außerdem führt das entwichene AIF zu einer weiteren Freisetzung von AIF aus dem Mitochondrium im Sinne eines positiven Feedbacks und amplifiziert so das apoptotische Signal. Dies wird als „Cytosolischer Effekt“ bezeichnet¹¹¹.

Smac/DIABLO entfaltet im Cytosol seine proapoptotische Wirkung, indem es die Inhibition der Caspasen-9, -3 und -7 durch die Proteine der IAP-Familie neutralisiert¹¹²⁻¹¹⁶. Die Endonuklease-G induziert nach Freisetzung und Zellkern-Translokation die apoptose-spezifische nukleosomale DNA-Fragmentierung¹¹⁷.

1.3.3 Apoptoseinduktion durch das Endoplasmatische Retikulum

Ein erst kürzlich entdeckter Signalweg ist die Caspase-12-vermittelte Apoptose über das Endoplasmatische Retikulum (ER)¹¹⁸. Eine wesentliche Aufgabe des ER besteht in der Faltung verschiedener Proteine in ihre Tertiär- und Quartärstruktur. Verschiedene Faktoren wie Hypoxie, Störungen der Ca^{2+} -Homöostase, virale Infekte oder Proteinüberladung stören diese Funktion und führen somit zur Anhäufung ungefalteter Proteine. Dadurch wird die sog. *ER stress response* oder *unfolded protein response* (UPR) aktiviert¹¹⁹, der die Translationsrate weiterer Proteine drosselt. Kann dieses „Notfallprogramm“ nicht ungehindert ablaufen, kommt es zur Apoptose. Der genaue Signalweg der ER-induzierten Apoptose konnte bislang nicht vollständig aufgeklärt werden. Allerdings scheinen zwei Hauptwege, der eine abhängig von Transkriptionsfaktoren, der andere Caspasen-abhängig, beteiligt zu sein¹²⁰.

Der Transkriptionsfaktor GADD153/CHOP ist in der Lage, über eine Veränderung des Verhältnisses von Bcl-2 zu Bax ein pro-apoptotisches Signal zu amplifizieren, und dabei womöglich die Cytochrom-Freisetzung aus dem Mitochondrium zu begünstigen.

Der zweite Signalweg läuft unabhängig von Mitochondrien oder Todesrezeptoren ab und wird über die im ER verankerte Caspase-12 vermittelt. Diese transloziert nach Aktivierung über apoptotische Stimuli vom ER ins Zytosol, wo sie Procaspase-9 spaltet, welche in der aktivierten Form wiederum die Effektorcaspase-3 aktiviert¹²¹.

1.4 Die Bedeutung des PI3K/AKT-Kinaseweges

Der PI3K/Akt-Kinaseweg ist ein wichtiger Regulator des Zellüberlebens und damit ein direkter Gegenspieler der Apoptose. Die Aktivierung dieses Signalwegs spielt eine essentielle Rolle in einer Vielzahl zellulärer Funktionen wie Proliferation, Migration und Differenzierung. Die durch Phosphorylierung aktivierte Akt-Kinase (auch Proteinkinase B, PKB) phosphoryliert ihrerseits die hierfür entscheidenden Enzyme (s. Abbildung 1.8). Aberrierende Aktivitäten des Akt-Signalweges tragen zur Tumorgenese, und die in diesem Zusammenhang wichtige Angiogenese, Tumormetastasierung und Chemoresistenz bei. Eine konstitutive Aktivierung des Signalweges oder eine genetische Alteration stellen ein frühes Ereignis in der Karzinogenese dar und können bei fast allen Neoplasien gefunden werden.

PI(3)Kinasen bestehen aus einer regulatorischen (85-kDa) und einer katalytischen (110-kDa) Untereinheit. Basierend auf ihrer Primärstruktur und Substratspezifität lassen sie sich in drei Klassen aufteilen¹³⁹, wobei alle Phosphoinositol am 3-Hydroxyl-Ende des Inositol-Ringes phosphorylieren. Diese phosphorylierten Phospholipide (PIP3) dienen als Aktivatoren verschiedener Effektorproteine deren wichtigster Vertreter Akt ist. Dabei bindet PIP3 an die PH-Domäne von Akt, rekrutiert dadurch Akt an die Plasmamembran und ermöglicht auf diese Weise dessen Phosphorylierung

unter Mitwirkung der Proteinkinase PDK1. Nachfolgend werden einige von u.a. anti-apoptischen Signalmolekülen¹⁴⁰ phosphorylitisch aktiviert. Da aktivierte Signalwege zur Erhaltung der Homöostase auch abgeschaltet werden müssen, existieren Mechanismen, den aktivierten PI3K/Akt-Weg durch Dephosphorylierung von Schlüsselenzymen zu inaktivieren. So kann PIP3 von Phosphatasen wie SHIP1 und -2 sowie PTEN^{141,142} (Phosphatase und Tensin Homolog), einem wichtigen Tumorsuppressor dephosphoryliert werden.

Die exakten Mechanismen, wie Akt eine Resistenz gegen Apoptose vermittelt, sind sehr vielfältig und nur teilweise geklärt. Eine wichtige Rolle bei Übertragung anti-apoptischer Signale spielt der Transkriptionsfaktor NF- κ B, der gehäuft in strahlenresistenten Tumoren überaktiviert ist. Es konnte gezeigt werden, dass aktiviertes Akt eine andere Kinase, IKK, phosphoryliert, die dadurch den Inhibitor von NF- κ B, I- κ B, inaktiviert und so eine vermehrte Aktivierung von NF- κ B ermöglicht¹⁴³. Akt moduliert zudem auch die pro-apoptische Wirkung des Tumorsuppressorproteins p53. Dies erfolgt über eine Phosphorylierung von HDM2 (humanes Homolog des murinen mdm2-Gens), welches als p53-Ubiquitinligase den Abbau von p53 einleitet. Desweiteren inhibiert Akt direkt die pro-apoptischen Proteinase Caspase-9 und Transkriptionsfaktoren der Familie „Forkhead“, die in nicht-phosphorylierter Form apoptosefördernde Gene aktivieren¹⁴⁴. Ein anderer den Zelltod fördernder Faktor, der durch Akt phosphoryliert und inaktiviert wird, ist Bad, ein Mitglied der Bcl-2-Familie. Darüberhinaus wird das Tumorsuppressorprodukt Tsc2 (Tuberin), ein Protein, welches mit der tuberösen Sklerose, einer erblichen, benignen Tumorerkrankung, assoziiert wird¹⁴⁵, durch Akt aktiviert.

Zusätzlich zur Apoptose nimmt Akt noch Einfluss auf das Zellwachstum. Einen proliferationsstimulierenden Effekt erreicht Akt einerseits über eine positive Regulation der Expression von Zyklin D1 und eine Suppression zyklinabhängiger Kinasen wie p21 und p27¹⁴⁶, und andererseits über eine Phosphorylierung der Glykogen-Synthase-Kinase (GSK-3), die neben der Steuerung der Glykogenspeicher auch eine Stabilisierung von Zyklin D1 und β -Catenin bewirkt. Dies hat ebenfalls eine Stimulation der Zelle zur Proliferation zur Folge. Weiteren Einfluss auf Größenwachstum und Metabolismus der Zelle

übt Akt über sein Substrat mTOR aus. Durch Aktivierung der nachgeschalteten Kinase p70-S6K wird das Zellwachstum gefördert und durch Hemmung des Transkriptionsregulators 4E-BP1 wird die Proteinsynthese der Zelle angeregt. Eine Hochregulation des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges stellt einen schlechten prognostischen Faktor dar, der häufig zu einer erhöhten Chemoresistenz der malignen Zellen führt.

Einen Überblick des Einflusses des PI(3)K/Akt-Kinaseweges auf die verschiedenen Mechanismen der Apoptoseinduktion gibt Abbildung 1.8.

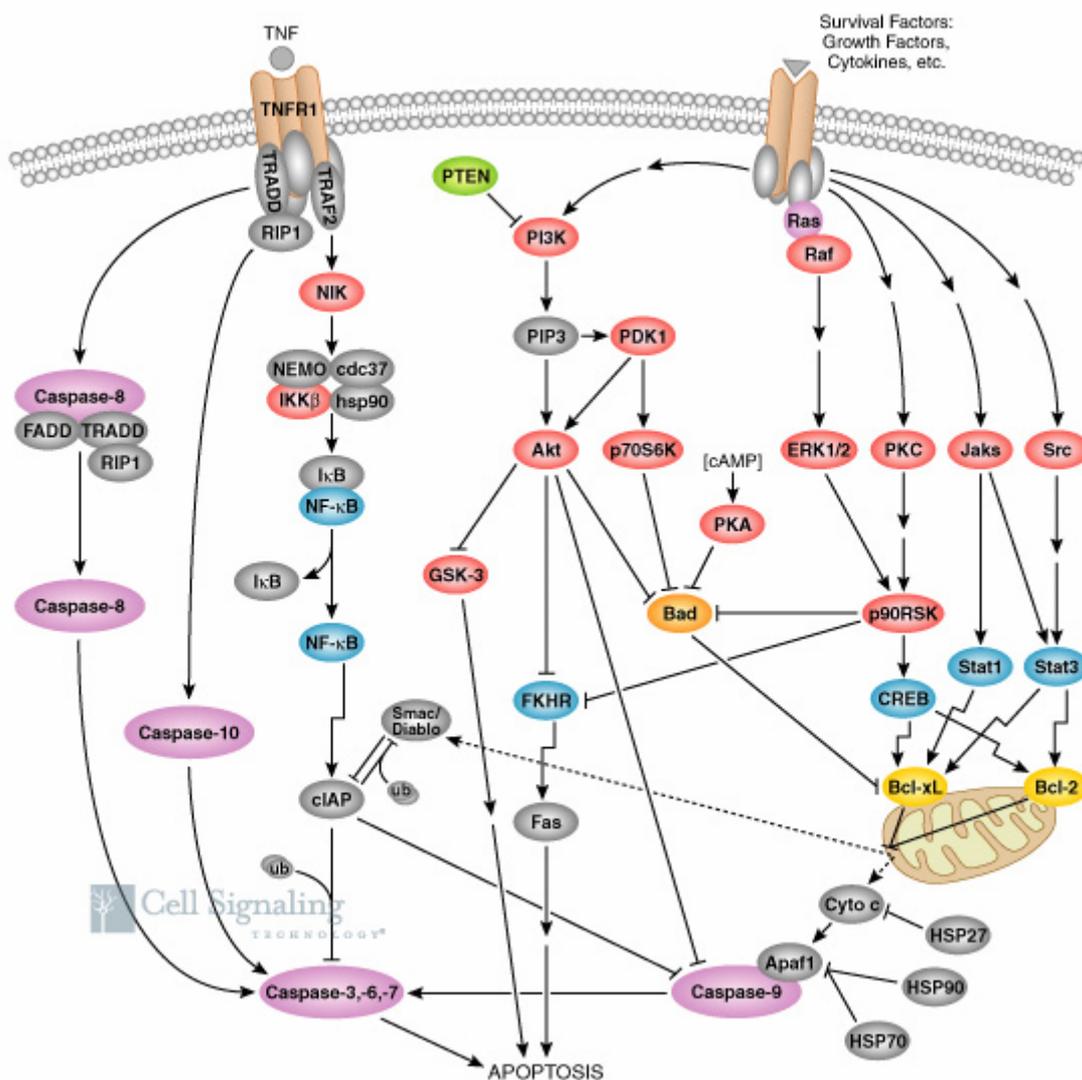


Abb. 1.7: Die Bedeutung des PI(3)K/Akt-Kinaseweges²³⁴: Der PI3K-Signalweg wirkt über einer Akt-Aktivierung der Apoptose entgegen. Akt inhibiert das proapoptische Mitglied der Bcl-2-Familie Bad, Caspase-9, GSK-3 und FKHR mittels Phosphorylierung (rot: Kinasen; grün: Phosphatasen; blau: Transkriptionsfaktoren).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass über den PI(3)K-AKT-Signalweg ein breites Spektrum an proapoptischen und proliferationshemmenden Proteinen durch Phosphorylierung funktionell inaktiviert wird, wodurch Überleben und Proliferation von Zellen, in denen Akt in phosphorylierter, aktiver Form vorliegt, gefördert werden.

1.5 Apoptose und Chemotherapeutika

Maligne Tumoren sind neben den kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den Industrienationen. Die Ursachen für eine Tumorentstehung sind vielfältig. So sind ein Anstieg des Lebensalters aber auch der ständige Kontakt des Körpers mit bestimmten Agenzien wie chemischen Karzinogenen, ionisierenden Strahlen und Viren ursächlich für die Zunahme der Tumorerkrankungen in den vergangenen Jahrzehnten.

Chemotherapeutika bewirken eine Elimination der entarteten Zellen durch verschiedene Mechanismen. Zum einen durch Schädigung der DNA infolge von Interkalierung, kovalente Bindung und Topoisomerase-Hemmung. Zum anderen durch Interferenz mit der DNA-Synthese mittels Enzymhemmung oder Einschleusung von Antimetaboliten, als auch durch die Beeinflussung körpereigener Steuerungswege mit Hilfe von Hormonen, Interferonen oder Antikörpern¹⁴⁷. Ein relativ neuer Weg besteht zudem in der Induktion einer Immunantwort gegen maligne Zellen, vermittelt durch die Präsentation tumorspezifischer Antigene auf Dendritischen Zellen¹⁸³. Eine enge Verbindung von Wirkmechanismen der Chemotherapeutika und Apoptoseinduktion konnte bereits vielfach nachgewiesen werden, wobei auch hier den Caspasen eine zentrale Rolle zuzukommen scheint¹⁴⁸⁻¹⁵³. Die genauen molekularbiologischen Folgen dieser Therapieansätze sind umstritten.

Die Aufdeckung der molekularen Mechanismen des programmierten Zelltodes und das bessere Verständnis der dabei relevanten Vorgänge im Rahmen der Tumorentstehung bzw. Chemo- und Radiosensitivität, haben viele Strategien

zur Wiederherstellung der Apoptoseinduktion in malignen Zellen hervorgebracht. Eine Verbindung zwischen der geringen Neigung zur Apoptose und der Therapieresistenz solider Tumoren konnte bereits mehrfach gezeigt werden und unterstreicht dadurch die potentielle Bedeutung dieser Signalwege in der Tumorthherapie. Experimentelle Studien deuten darüber hinaus an, dass die Förderung des programmierten Zelltods in neoplastischen Zellen zu einem beeindruckenden Anstieg der Chemosensitivität in diesen Zellen führen kann¹⁵⁴. Bisherige therapeutische Ansatzpunkte erfassen die anti-apoptischen Proteine (IAP-Inhibitoren, Bcl-2-Inhibitoren), direkte Apoptoseinduktoren (Todesrezeptor-Agonsiten) und Apoptosemodulatoren wie Protein-Kinasen, -Phosphatasen und Transkriptionsfaktoren.

IAP-Proteine stellen eine hochkonservierte Familie von Caspase-Inhibitoren dar. Eine Überexpression dieser Proteine in Tumorzellen wurde bereits mehrfach beschrieben. Der Einfluss der IAPs auf Proteine am Ende der apoptotischen Signaltransduktion könnte bezüglich der Vermeidung von Interferenzen mit anderen Signalwegen therapeutisch von Vorteil sein. Durch kleinmolekulare Inhibitoren von X-IAP konnte tatsächlich eine Caspase-3-induzierte Apoptose in malignen Zellen beobachtet werden, wobei auch in Kombination mit Chemotherapeutika eine Sensitivitätserhöhung nachweisbar war.

Die Reduktion der Expression des anti-apoptischen Proteins Bcl-2 wurde bereits präklinisch und klinisch evaluiert¹⁵⁵. Ein Beispiel dieser Substanzklasse ist das Oligodeoxynukleotid G3139, welches sich bereits in einer Phase-3-Studie befindet. Präklinisch konnte ein deutlicher Anstieg in der antineoplastischen Effektivität verschiedener zytotoxischer Wirkstoffe in Kombination mit G3139 demonstriert werden¹⁵⁶.

Die Möglichkeit, Apoptose in Tumorzellen durch die Aktivierung von Todesrezeptoren herbeizuführen, wird schon seit langem untersucht. Tatsächlich sind TNF- α und FasL potente Induktoren der Apoptose. Ernsthafte Nebenwirkungen machten einen systemischen Einsatz dieser Stoffe jedoch unmöglich¹⁵⁷. So wurde die Familie der TRAIL-Proteine und Rezeptoren zu einem neuen, interessanten Ziel für viele Arbeitsgruppen. Versuche mit

rekombinanten TRAIL in Tierexperimenten zeigten eine signifikante Regression von Tumoren in Abwesenheit systemischer Toxizität¹⁵⁸. Gegenwärtige Ansätze in der Entwicklung von TRAIL-R1- und TRAIL-R2-Agonisten schließen auch die Verwendung von Rezeptor-Antikörpern mit ein.

Transkriptionsfaktoren wie p53, NF- κ B oder HIF1 α können den apoptotischen Prozess modulieren. Normalerweise wird p53 durch Zellschäden aktiviert und ist in der Lage die Expression proapoptotischer Gene und der Todesrezeptoren hoch zu regulieren. Da viele Tumore Mutationen in dem p53-Gen besitzen, konnte durch die mittels Transfektion ermöglichte Bereitstellung des Wildtyp-Gens eine Einschränkung des Tumorwachstums bereits nachgewiesen werden. Obwohl die Einbringung eines solchen Gens in Vivo noch verbesserungswürdig ist, sind Adenoviren als Übermittler des Wildtyp-Gens schon in der klinischen Erprobung¹⁵⁹.

NF- κ B reguliert die Transkription einer Vielzahl anti-apoptotischer Proteine wie c-IAPs, Bcl-2 oder Bcl-X. Da eine erhöhte NF- κ B-Aktivität in verschiedenen Tumorzellen beobachtet werden konnte, ist der Transkriptionsfaktor ein attraktives Ziel der präklinischen Forschung. NF- κ B ist im Cytosol an inhibitorische Moleküle wie IKK α oder IKK β gebunden und wird erst durch die Abspaltung derselben aktiviert. Der Proteasom-Inhibitor Velcade (PS341) verhindert diese antiapoptotische Freisetzung von NF- κ B und wird bereits in klinischen Studien erprobt¹⁶⁰.

1.6 Fragestellung der Arbeit

Tumorzellen verfügen zum einen über antiapoptotische Mechanismen, die ein verlängertes Überleben und somit Wachstumsvorteil ermöglichen, zum anderen sind in diesen Zellen intrazelluläre Apoptosesignalwege gestört, die eine Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutika-induzierten Zelltod bedingen. Kenntnisse über die Natur der Mechanismen, die der Signaltransduktion der Apoptose zugrunde liegen, stellen somit eine wichtige Voraussetzung für neue Therapieansätze dar. Ein in Tumoren häufig deregulierter Weg ist der

PI(3)K/Akt-Signalweg^{161,162}, wobei eine aberrante Aktivierung von Akt in einer Blockade der Apoptose, Förderung von Proliferation und Neoangiogenese und der Entstehung eines aggressiven Phänotyps mit Resistenz gegenüber zytotoxischer Behandlung resultiert.

Dies macht den PI(3)K/Akt-Kinaseweg zu einer wichtigen Zielstruktur neuer therapeutischer Interventionen. Es konnte bereits wiederholt gezeigt werden, dass eine Blockade der PI(3)K maligne Zellen gegenüber Chemotherapeutika wie Etoposid oder Mikrotubuli-destabilisierende Wirkstoffe sensibilisiert²⁰⁰⁻²⁰⁷.

Ziel dieser Arbeit ist es ein besseres Verständnis für das bisher wenig geklärte Zusammenspiel zwischen Apoptose und dem Überlebens-Signalweg der PI3K zu erlangen. Verwendet werden hierfür verschiedene Zelllinien des Nierenzellkarzinoms, das ein besonders therapieresistentes Malignom mit einer konstitutiven Aktivierung der PI3K darstellt²⁰⁹⁻²¹³.

Die Inhibition des PI(3)-Kinase-Signalweges erfolgt mit LY294002, einer Substanz die an der katalytischen p110 Untereinheit der PI(3)K ansetzt und bereits in verschiedenen Arbeiten eine Reduktion des Wachstums diverser Tumore demonstrierte^{162,198,199}.

Um die Bedeutung der verschiedenen Signalwege der Apoptose und der daran beteiligten Caspasen zu untersuchen, kommen zudem verschiedene Jurkat-Zelllinien zum Einsatz, in welchen die entsprechenden Schlüsselenzyme mittels Transfektion überexprimiert oder ausgeschaltet wurden. Darüber hinaus wird durch die Verwendung des Breitspektrum-Caspase-Inhibitors zVAD die generelle Rolle der Caspasen in diesem Zusammenhang geprüft.

Durch die Erfassung von Apoptosemerkmalen wie DNA-Fragmentierung, Phosphatidylcholin-Exposition und Proliferationshemmung, sowie der veränderten Proteinexpression und der Aktivität der Effektorcaspasen, infolge von PI(3)K-Inhibition sollen die Rolle der PI(3)-Kinase, die Effektivität einer Hemmung mit LY294002 und weitere beteiligte Mechanismen der Apoptose analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1: Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav: Varioklav® Dampfsterilisator	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Durchflusszytometer: FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
ELISA Reader	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Elektrophorese-Apparatur Mini-Protean 3 Electrophoresis System Midigel	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland Owl Separation Systems, Portsmouth, USA
Gefrierschrank Forma Scientific -80°C	Stiel, Tübingen, Deutschland
Heiz- und Magnetrührer RCT basic IKA®	VWR International GmbH Bruchsal, Deutschland
Kühlschrank-Kombination 4°C und -20°C	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Lichtmikroskop: Olympus CK 30-F200	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer 0,1 mm Tiefe	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Baar, CH
Sterilbank	Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Überkopfschüttler	Breda Scientific, Niederlande

Wasserbad	Memmert GmbH+Co.KG Schwabach, Deutschland
Zentrifugen Multifuge 3 S-R Eppendorf-Zentrifuge 5417R	Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
6-Well-Zellkulturplatte Falcon® Multiwell™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
96-Well-Zellkulturplatte T-shape Cellstar®, <i>with lid</i>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
96-Well-Zellkulturplatte U-shape Cellstar®, <i>with lid</i>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Combitips plus 2,5 ml 5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einmalspritze 2-teilig, 10 ml 2-teilig, 20 ml 2-teilig, 50 ml	Braun, Melsungen, Deutschland Braun, Melsungen, Deutschland Braun, Melsungen, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell BioSciences GmbH, Dassel, Deutschland
NUNC Cryo Tube™ Vials 1 ml 1,8 ml	Nalge Nunc Int., Rochester, USA Nalge Nunc Int., Rochester, USA

<p>Pipetten</p> <p>2 ml Falcon®, Polystyrol, steril gestopft</p> <p>5 ml, Polystyrol, steril, gestopft</p> <p>10 ml, Polystyrol, steril, gestopft</p> <p>25 ml, Polystyrol, steril, gestopft</p> <p>50 ml, Polystyrol, steril, gestopft</p>	<p>BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland</p> <p>Corning Inc., Corning, New York, USA</p>
<p>Pipettenspitzen</p> <p>10 µl</p> <p>20 µl</p> <p>200 µl</p> <p>1000 µl</p>	<p>Eppendorf, Hamburg, Deutschland</p> <p>Eppendorf, Hamburg, Deutschland</p> <p>Eppendorf, Hamburg, Deutschland</p> <p>Eppendorf, Hamburg, Deutschland</p>
<p>Polypropylenröhrchen Falcon®, 50 ml</p>	<p>BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland</p>
<p>PP-Test Tube Cellstar®, steril, 15 ml</p>	<p>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland</p>
<p>Reaktionsgefäße, 1,5 ml</p>	<p>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland</p>
<p>Rundbodenröhrchen, Polystyrol, 5 ml, steril, 12 x 75 mm</p>	<p>BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland</p>
<p>Sterilfilter Minisart, 0,20 µm, steril</p>	<p>Sartorius, Göttingen, Deutschland</p>
<p>Whatman-Papier</p>	<p>BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland</p>
<p>Zellkulturflaschen</p> <p>Falcon® Tissue Culture Flask</p> <p>0.2 µm Vented Blue Plug Seal Cap, 75 cm², 250 ml</p> <p>0.2 µm Vented Blue Plug Seal Cap, 25 cm², 70 ml</p> <p>Nunclon™ Zellkulturflaschen 800 ml</p>	<p>BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland</p> <p>BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland</p> <p>BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland</p>

2.1.3 Reagenzien

Tabelle 2.3: Reagenzien

Produkt	Hersteller
30% Acrylamid/Bis-acrylamid (37,5:1)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Annexin-V-FLUOS	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany
Annexin Waschpuffer	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany
Aprotinin	Sigma, St. Louis, USA
Bench Mark™ Prestained Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Biotinylated SDS PAGE Standards, <i>Low Range</i>	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
BSA	Roche, Mannheim, Deutschland
DEVD-AMC	Bachem Biochemica, Heidelberg, Germany
DMSO	Sigma, St. Louis, USA
DTT	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA, 0,5M	Sigma, St. Louis, USA
Fetal Bovine Serum 10082	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
Igepal CA-630	Sigma, St. Louis, USA
LPS	Sigma, St. Louis, USA
Marker für SDS-PAGE, <i>Low Range</i>	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Medium RPMI 1640 with GlutaMAX™ - I + 25 mM HEPES	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
PBS-Puffer, 10-fach	Bio Whittaker, Verviers, Belgien

Penicillin / Streptomycin	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
PMSF	Sigma, St. Louis, USA
Propidiumiodid	SigmaAldrich, München, Deutschland
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Slim Fast Schokolade	Slim Fast Deutschland GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Streptavidin Horseradish Peroxidase Conjugate	Amersham Life Science, Freiburg, Deutschland
TEMED	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tetrazolium	SigmaAldrich, München, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma, St. Louis, USA
Trypsin	Calbiochem®, San Diego, USA
Trypsin-EDTA 25200	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20 = Polyoxyethylenesorbitan monolaurate	Sigma, St. Louis, USA

2.1.4 Antikörper Western-Blot

Tabelle 2.4: 1.AK Western-Blot

Produkt	Hersteller
Hase anti-PARP, polyklonal	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Ziege anti-ReI β , monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Ziege anti-HIF1 α , monoklonal	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Maus anti-caspase-8, monoklonal	Biocheck, Münster, Deutschland

Maus anti-caspase-9, monoklonal	Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA
---------------------------------	--

Tabelle 2.5: 2.AK Western-Blot

Produkt	Hersteller
Hase anti-Maus IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Maus anti-Maus IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Ziege anti-Maus IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland

2.1.5 Medien und Lösungen

Tabelle 2.6: Medien und Lösungen

Produkt	Zusammensetzung
Kernextraktpuffer A	1 mM DTT 0,5 mM PMSF
Kernextraktpuffer C	1 mM DTT 1 mM PMSF
Laufpuffer für SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese	Aqua dest. 192 mM Glycin 25 mM Tris 10% SDS
Lysepuffer für Caspase-Aktivität	20 mM Hepes pH 7,4 84 mM KCL 10 mM MgCl ₂ 0,2 mM EDTA 0,5% NP 40

	1 Mm DTT 1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin 5 µg/ml Aprotinin
Lysepuffer RIPA für Proteinlysate	1% Igepal CA-630 0,5% Natriumdeoxycholat 2 mM EDTA 2 mg/l Aprotinin 1 mM PMSF 1 mM Na-Orthovanadat; in PBS
NP-40-Puffer	0,05 M Hepes pH 7,5 150 mM NaCl 1% Igepal CA-630 2 mM EDTA 10% Glycerin 2 mg/l Aprotinin 1 mM PMSF
Reaktionspuffer Caspase-Aktivität	50 mM Hepes pH 7,3 100 mM NaCl 10% Saccharose 0,1% Chaps 2 mM CaCl ₂ 10 mM DTT
RP10-Medium	Medium RPMI 1640 mit Glutamax-I, 10% hitzeinaktiviertem FCS, 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin
Sammelgel für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	Aqua dest. 400 mM Tris pH 6,7 6% Acrylamid 0,1% SDS
TBS	10 mM Tris-HCl pH 8,0 140 mM NaCl

TBST, 0,5%	10 mM Tris-HCl pH 8,0 140 mM NaCl 0,5% Tween-20
TBST, 0,1%	10 mM Tris-HCl pH 8,0 140 mM NaCl 0,1% Tween-20
Transferpuffer für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	Aqua dest. 192 mM Glycin 25 mM Tris 1000% Methanol
Trenngel für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	Aqua dest. 370 mM Tris pH 8,8 15% Acrylamid 0,1% SDS APS TEMED

2.1.6 Kits

Tabelle 2.7: Kits

Produkt	Hersteller
<i>Annexin-V-FLUOS Staining Kit</i>	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
<i>BCA Protein Assay Reagent Kit</i>	Pierce, Peribo Science, Bonn, Deutschland
<i>ECL™ Western Blotting Detection Reagent Kit</i>	Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland
EIA IL-6	Immunotech, Marseille, Frankreich

2.1.7 Tumorzelllinien

Tabelle 2.8: Verwendete Tumorzelllinien

Zelllinie	Zelltyp
Jurkat FADD -/-	Lauber et al. ¹⁹² , J of Biological Chemistry; 32: 29772-29781 (2001)
Jurkat Caspase 8 -/-	Engels et al. ¹⁹¹ , Oncogene ; 19: 4565-4573 (2000)
Jurkat Caspase 9 -/-	Samraj et al. ¹⁹⁰ , Molecular Biology of the Cell; 18: 84-93 (2007)
Jurkat Bcl2	Nencioni et al. ¹⁹³ , J of Immunology ; 171: 5148-5156 (2003)
A498	Giard et al. ¹⁸⁹ , J Natl Cancer Inst 51: 1417-1423 (1973)
CAKI-2	Fogh et al. ¹⁸⁸ , J Natl Cancer Inst ; 58: 209-214(1977)
MZ1774	Verdegaal et al. ¹⁸⁷ , Cancer Immunology; 56: 587–600 (2007)

2.1.8 Pro- und antiapoptotische Wirkstoffe

LY 294002

LY 294002 ist ein spezifischer PI(3)K (Phosphoinositol 3-kinase)-Inhibitor¹⁶⁴ der Firma Alexis Biochemicals (Grünberg, Germany) der an der ATP-bindenden Seite des Enzyms ansetzt. Er wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in einer Konzentration von 10, 20, 40 und 80 µM eingesetzt.

SH5

Der verwendete AKT-Inhibitor SH5 ist ebenfalls ein Produkt der Firma Alexis Biochemicals (Grünberg, Germany). Durch eine spezifische Inhibierung der

Serin/Threonin-Kinase AKT, führt er zum Zelltod PKB-abhängiger Zellen¹⁶⁵. Nach Lösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde er in den Konzentrationen von 1, 5 und 10 μM verwendet.

Rapamycin

Rapamycin, ein makrozyklischer Antikörper, ist nach Komplexbildung mit FKBP12 in der Lage das Protein mTOR (mammalian target of Rapamycin), einen am Ende der PI(3)Kinase/AKT-Signaltransduktion stehenden, wichtigen Regulator von Zellwachstum und Gentranslation zu inhibieren¹⁶⁶. Das Produkt der Firma Sigma-Aldrich (Hannover, Germany) wurde ebenfalls in Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst und 0,1 μM eingesetzt.

Etoposid

Das häufig angewendete Chemotherapeutikum Etoposid führt über eine Hemmung der Topoisomerase II zu DNA-Strangbrüchen und Chromosomenaberrationen. Der Stoff wurde bei Biozol (Eching, Germany) erworben und in einer Konzentration von 1 μg eingesetzt.

Anti-TRAIL monoclonal Antibody

Anti-TRAIL monoklonale (IgG) Antikörper binden spezifisch an das TRAIL-Antigen auf der Zelloberfläche und führen dadurch zu einer Aktivierung des extrinsischen Apoptose-Pathways¹⁶³. Der Antikörper wurde ebenfalls bei R&D Systems (Minneapolis, MN) erworben und in einer Konzentration von 10 ng verwendet.

zVAD-fmk

Zur Beurteilung der Bedeutung der Caspase-Proteine im Rahmen der durch PI(3)Kinase-Inhibition vermittelten Apoptose, wurde der pan-Caspase-Inhibitor zVAD der Firma Bachem Biochemica (Heidelberg, Germany) in 100 μM -Konzentration eingesetzt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung der Tumorzellen

Sämtliche Tumorzelllinien wurden in RPMI 1640 kultiviert, wobei 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum, 100 units/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (Gibco-BRL, Grand Island, NY) hinzugefügt wurden. Zur Anzucht wurden 175 cm² Kulturflaschen (BD Biosciences, Heidelberg) verwendet und die Zellen in einem Inkubator bei 37 °C, 5% CO₂ und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre in einer Log-Phase gehalten. Bei einer Zelldichte der adhären Zellen von ca. 75% des Flaschenbodens, wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin-EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Nach Zugabe vom FCS-haltigem Medium zur Neutralisation des Trypsin-EDTAs, wurden die Zellen zentrifugiert, nach Verwerfung des Überstandes erneut in Medium resuspendiert und in eine neue Kulturflasche überführt.

Die Suspensionszelllinie Jurkat wurde vereinzelt, sobald sich das Nährmedium infolge der pH-Änderung leicht orange färbte.

2.2.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt. Mit der Bestimmung der Zellzahl wurde stets eine Färbung der Zellen mit Tryphanblau verknüpft. Da der Farbstoff bei lebendigen Zellen die intakte Zellmembran nicht durchdringen kann, erscheinen diese im Lichtmikroskop ungefärbt, während tote Zellen blau angefärbt werden. Die ungefärbten Zellen aus 16 Quadraten der Zählkammer wurden gezählt und daraus die Lebendzellzahl pro Milliliter errechnet:

(Lebendzellzahl in 16 Quadraten) x Verdünnungsfaktor x 10⁴ = Zellzahl/ml.

2.2.1.3 Kryokonservierung der Tumorzellen

Zur Aufbewahrung wurden die Zellen abtrypsinisiert, zentrifugiert und nach anschließender Resuspension ihre Zellzahl bestimmt. Je 10^6 adhärenente Zellen bzw. 5×10^6 Suspensionszellen wurden in 1 ml Einfriermedium (900 μ l Zellsuspension + 100 μ l DMSO) aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und sofort bei -80°C eingefroren.

Um eingefrorenen Zellen aufzutauen wurde die Kryoröhrchen in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt, bis die enthaltene Zellsuspension fast vollständig aufgetaut war. Die Zellen wurden in ein 50 ml Polypropylenröhrchen überführt, sofort 10 ml Medium zugegeben, gemischt und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert, um die Zellen vom im Einfriermedium enthaltenen DMSO zu befreien. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen einmal mit Medium gewaschen, anschließend in 10 ml Medium aufgenommen und in eine 75 cm^2 -Kulturflasche überführt.

Die Zeit für das Einfrieren und Auftauen der Zellen wurde unter 5 min. gehalten, da DMSO bei Raumtemperatur toxisch für die Zellen ist.

2.2.2 Durchflußzytometrie (FACS)

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension im FACS-Gerät durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Infolge der Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl, werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserimpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenem Farbstoff/ Zelle. Zusätzlich werden

durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über Zellgröße und Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der Zellen gewonnen: Zellen streuen Licht in die Vorwärtsrichtung (*forward scatter*) abhängig von ihrer Größe, und Licht in einem Winkel von 90° (*side scatter*) proportional zu ihrer zellulären Granularität (s. Abbildung 2.1).

Die Hauptanwendung der FACS-Analyse besteht in der Erfassung bestimmter Eigenschaften der zu untersuchenden Zellen wie Zelltyp, Präsentation von Rezeptoren oder Antigenen an der Zelloberfläche, Enzymaktivitäten oder Zustand der DNA.

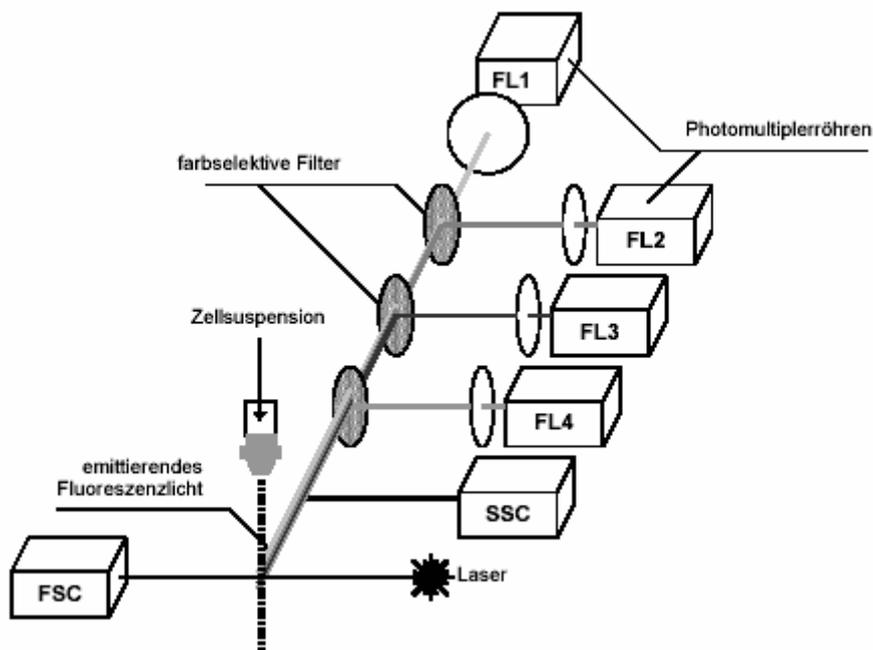


Abbildung 2.1: Prinzip des Durchflusszytometers. FL1-FL4 bezeichnen unterschiedliche Fluoreszenzkanäle. FSC steht für Vorwärtsstreuung, SSC für Seitwärtsstreuung.

Für die durchflußzytometrischen Messungen wurde ein FACS-Calibur der Firma BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die Datenerfassung und -weiterverarbeitung erfolgte an einem Macintosh-Computer mit Hilfe der Cell Quest Research Software, ein Produkt der Firma Beckton Dickinson.

2.2.2.1 Bestimmung der Kernfragmentierung nach Nicolletti et al.

Eines der Hauptmerkmale des apoptotischen Zelltodes ist der Untergang der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Im Rahmen dieses Unterganges kommt es durch die für die Apoptose charakteristischen, inter-nukleosomalen Doppelstrangbrüche, zu multiplen, etwa zweihundert Basenpaare umfassende, Fragmente. Mit Hilfe eines Durchflusszytometers lässt sich diese DNA-Fragmentierung durch die Verwendung des fluoreszierenden, DNA-interkalierenden Stoffes Propidiumiodid darstellen. Da der Farbstoff die intakte Zellmembran nicht passieren kann verwendet man einen hypotonischen Lyse-Puffer (Natrium-Zitrat, 0,1% Triton X-100, 50 µg/ml Propidiumiodid) um die Zellen zu lysieren und dadurch mögliche DNA-Fragmente mit PI anfärben zu können¹⁷². Apoptotische Kerne erscheinen als breiter hypoploider DNA-Peak, der leicht von dem sehr schmalen DNA-Doppelpeak nicht-apoptotischer Zellen mit diploidem (und tetraploidem) DNA-Gehalt unterschieden werden kann

- 2×10^5 Zellen wurden in 6-Well-Platten für 5 Tage (d1-d5) ausgesät und die pro- und antiapoptotische Wirkstoffen an d1 und d3 zugegeben.
- Jeden Tag (nach jeweils 24 h) wurden die entsprechenden Zellen abtrypsinisiert, zentrifugiert (1500 rpm für 5 min) und resuspendiert. Pro Ansatz wurden 10^5 Zellen in 96-Well-Platten überführt und erneut zentrifugiert (1200 rpm für 5 min). Nach schnellem Abschütten des Überstandes wurden die Pellets in 100 µl des PI-enthaltenden Lysepuffers aufgenommen.
- Es folgte eine Inkubation der Proben mit dem Farbstoff für 5-10 min. Anschließend konnte der prozentuale Anteil apoptotischer Kerne mittels Durchflußzytometrie bestimmt werden.

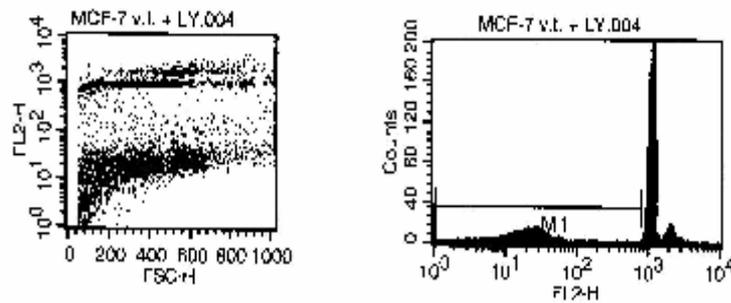


Abbildung 2.2: exemplarische FACS-Kernfragmentierung: Apoptotische Zellkerne sichtbar als „subdiploider DNA-Peak“ in der Durchflußzytometrie.

2.2.2.2 Messung der Phosphatidylserin-Exposition

Der Verlust der asymmetrischen Anordnung der Membranphospholipide ist ein frühes Merkmal der Apoptose^{173,174}. Dabei kommt es zur Exposition von Phosphatidylserin (PS) an der Zelloberfläche¹⁷⁵. Diese Tatsache wird bei der durchflusszytometrischen Analyse apoptotischer Zellen ausgenutzt. Durch Anfärbung der Proben mit Annexin-V-FLUOS, können auf diese Weise apoptotische Zellen nachgewiesen werden^{176,177}. Annexin-V-FLUOS ist ein antikoagulierendes Protein, welches Ca^{2+} -abhängig bevorzugt an anionische Phospholipide bindet. Aufgrund dieser Eigenschaft besteht für Phosphatidylserin eine besonders hohe Affinität. Da nekrotische Zellen infolge des Verlustes der Membranintegrität ebenfalls Annexin binden, ist eine weitere Differenzierung der apoptotischen und nekrotischen Zellen nötig. Hierfür eignen sich DNA-Farbstoffe, wie beispielsweise Propidiumiodid (PI), die nur permeabilisierte Membranen nekrotischer Zellen passieren können. So erscheinen apoptotische Zellen Annexin-positiv und PI-negativ, während nekrotische Zellen hingegen beide Marker binden.

- 2×10^5 Zellen wurden in 6-Well-Platten für 5 Tage (d1-d5) ausgesät und die pro- und antiapoptotischen Wirkstoffen an d1 und d3 zugegeben.

- Nach Inkubation mit den verschiedenen Stoffen (24h, 48h, 72h, 96h, 120h) wurden die Ansätze in Polypropylenröhrchen überführt und anschließend bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Resuspension der Pellets mit PBS wurden 10^6 Zellen in FACS-Röhrchen pipettiert und anschließend erneut abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min).
- Nach vorsichtiger Absaugung des Überstandes wurden die Pellets anschließend in 100 μ l einer Lösung bestehend aus Annexin-V-FLUOS, PI und Annexin-Waschpuffer (1:50) resuspendiert.
- Dann folgte eine 10-minütige Inkubation in Dunkelheit bei Raumtemperatur.
- Schließlich wurden die Proben mit Annexin Waschpuffer 1:5 verdünnt und mit Hilfe des FACS-Calibur gemessen.

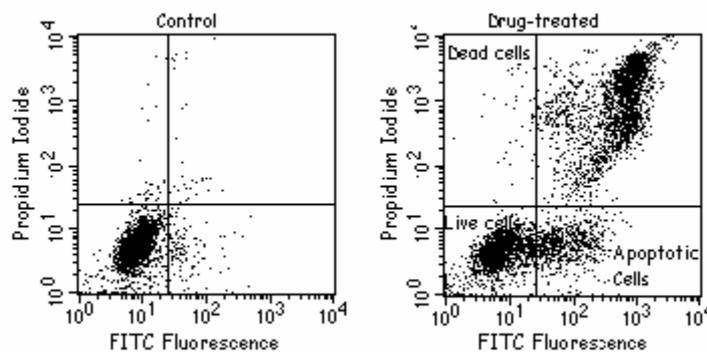


Abbildung 2.3: exemplarische Annexin V- / PI-Färbung¹⁸⁸: unterer li. Quadrant: nicht-apoptotische Zellen; unterer re. Quadrant: Annexin-pos. apoptotische Zellen; oberer re. Quadrant: doppelt-positive, nekrotische Zellen.

2.2.3 Fluorometrische Bestimmung der Caspase-Aktivität

Eine weitere Möglichkeit zur genaueren Differenzierung der Apoptose ist die Messung der Caspase-Aktivität; diese Proteine spielen bei der Ausführung der Apoptose eine zentrale Rolle.

Eine gängige Methode zur Erfassung der Caspase-Aktivität besteht in der Verknüpfung einer für die Effektorcaspasen erkennbaren Peptidsequenz, also

eines Substrates wie DEVD mit dem Coumarin-basierenden Fluoreszenzfarbstoff Aminomethylcoumarin (AMC)^{178,179}. Die intakte Peptid-Coumarin-Verbindung ist nicht fluoreszierend; wird jedoch das Peptid des Ac-DEVD-AMC-Substrates (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Aminomethylcoumarin, Bachem, Heidelberg) durch aktivierte Caspasen abgetrennt so erhält man ein fluoreszierendes Spaltprodukt, das fluorometrisch gemessen werden kann.

- 2×10^5 Zellen wurden in 6-Well-Platten für 5 Tage (d1-d5) ausgesät und die pro- und antiapoptotischen Wirkstoffen an d1 und d3 zugegeben.
- Jeden Tag (nach jeweils 24h) wurden die Zellen abtrypsiniert, mit PBS gewaschen, zentrifugiert und in 96-Well-Platten überführt. Zur Gewinnung zytosolischer Zellextrakte wurden die Zellen mit je 50 μL des Caspase-Aktivität-Lysepuffer (s. Tabelle 2.6) lysiert und darauf folgend 10 min auf Eis inkubiert.
- Der Überstand wurde rasch abgeschüttet, und 150 μL des fluorogenen Reaktionspuffers hinzugegeben.
- Die Freisetzung von Aminomethylcoumarin und damit die Aktivität der Caspasen wurde anschließend bei einer Emissionswelllänge von 475 nm bestimmt.

2.2.4 MTT Assay

Der MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] Assay ist eine photometrische Methode zur Bestimmung von Zellproliferation und -viabilität. In der Tumorforschung kann mit Hilfe des MTT Assays die Chemosensitivität von Tumorzellen bezüglich verschiedener antineoplastischer Substanzen quantitativ beurteilt werden.

Als Grundlage dieses Tests dient die Fähigkeit der mitochondrialen Acetaldehyddehydrogenase, den Tetrazolium-Ring des schwach gelben MTTs zu spalten, wobei dunkelblaue Formazan-Kristalle entstehen. Eine wichtige Voraussetzung für diese Reaktion ist das Vorhandensein der

Reduktionsäquivalente NADH und NADPH, welche nur in vitalen, metabolisch aktiven Zellen synthetisiert werden. Da die gebildeten Kristalle die Zellmembran nicht passieren können, akkumulieren sie in den Zellen. Mittels eines Detergenz können die Zellen lysiert und die Kristalle aufgelöst werden. Da die Nummer der vitalen Zellen direkt proportional zum Level der Formazanbildung ist, ist Farbe der entstandenen Lösung ein quantitatives Maß für die Zellviabilität und kann spektrophotometrisch (ELISA-Reader) ausgewertet werden¹⁸⁰.

- 2×10^6 Zellen wurden in 96-Well-Platten für 5 Tage (d1-d5) ausgesät und die pro- und antiapoptotischen Wirkstoffe an d1 und d3 zugegeben.
- Nach Inkubation (24h, 48h, 72h, 96h, 120h) mit den verschiedenen Stoffen wurden jeweils 20 μ l (5 mg/ml) MTT dazupipettiert und die Ansätze im Brutschrank für mindestens 5 Stunden mit dem Salz inkubiert.
- Zur Auflösung der gebildeten Kristalle wurden anschließend je 100 μ l 10% SDS zugegeben und erneut für mindestens 5 Stunden inkubiert.
- Durch vorsichtig hoch- und runterpipettieren der Lösung in den einzelnen Wells wurde versucht eine möglichst homogene Flüssigkeit zu erhalten.
- Schließlich wurden die Proben mit Hilfe eines Elisa-Readers bei 570 nm ausgewertet.

2.2.5 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest

Enzyme linked Immunosorbent Assays (ELISA) sind eine wichtige Methode um die Konzentrationen von verschiedenen Stoffen in Flüssigkeiten wie Serum, Urin oder Zellkulturüberstand zu messen. Die Konzentration wird über eine Enzym-Substrat Reaktion sichtbar, welche mittels Adsorption gemessen wird. In den hier vorgenommenen Versuchen wurde die Konzentrationen von IL-6 und VEGF untersucht. Um die Zytokine von den anderen im Zellkulturüberstand vorhandenen Stoffen zu trennen, wurden spezifische Antikörper gegen das zu untersuchende Zytokin verwendet.

- Zunächst wurde in eine mit dem spezifischen Antikörper beschichtete 96-Loch-Gewebekulturplatte 200 µl des Zellkulturüberstandes bzw. der Standardlösung gegeben. Die Standardlösungen bestanden aus dem entsprechenden Zytokin in unterschiedlichen Konzentrationen: Für IL-6: 1000 pg/ml, 333 pg/ml, 111 pg/ml, 37 pg/ml, 12,3 pg/ml und 0 pg/ml. Für VEGF: 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 1250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml, 15,6 pg/ml und 0 pg/ml.
- Anschließend wurde die 96-Loch-Gewebekulturplatte mit selbstklebenden Plastikstrips bedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit binden die Zytokine an die Antikörper in der Platte. Nach der Inkubationszeit wurden die Kavitäten entleert und 3 x mit 400 µl Wasch-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die 96-Loch-Gewebekulturplatte auf saubere Handtücher geschlagen, um die gesamte Flüssigkeit aus den Kavitäten zu entfernen. Dadurch blieben lediglich die an den Antikörper gebundenen Zytokine übrig.
- Als nächsten Schritt wurden Antikörper in die Kavitäten gegeben, die zum einen an die Zytokine binden und zum anderen an die bereits in der Platte immobilisierten Enzyme. Die an den Zweit-Antikörper gebundene Enzyme katalysieren dabei Reaktionen, bei denen die entsprechenden Substrate zu einem Farbstoff umgesetzt werden.
- Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit im Dunkeln, wurden jeweils 50 µl einer Stopp-Lösung in die Kavitäten gegeben, um die Enzym-katalysierten Reaktionen zu beenden. Die Platten wurden sofort im ELISA-Reader bei 405 nm gemessen. Hierbei ist die Intensität der Färbung proportional zur Konzentration.

2.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht. Nach der Separation durch eine SDS-

(Sodiumdodecylsulfat) Polyacrylamid- Gelelektrophorese können die Proteine durch Bindung von spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden.

Die Ladung eines Proteins wird von der Anzahl geladener Aminosäurereste und damit von der Aminosäurezusammensetzung bestimmt. Das SDS führt als anionisches Detergenz dabei zu einer Überdeckung der proteinspezifischen Ladungen. Alle Proteine sind damit über ein konstantes Ladung/Masse-Verhältnis vergleichbar. Zur Reduktion von Disulfidbrücken in den Proteinen wird dem Probenpuffer Dithiothreitol (DTT) beigemischt. Außerdem werden die Proben zur Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine für mehrere Minuten auf 100°C erhitzt. Dadurch können die Proteine allein nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden, wobei die Beweglichkeit der Proteine umgekehrt proportional zu diesem Gewicht ist¹⁸¹. Bei der hier eingesetzten diskontinuierlichen SDS- Page wird zusätzlich durch Vorschaltung eines Sammelgels eine starke Fokussierung der Proteinbanden und damit eine verbesserte Trennleistung erreicht wird.

Nach erfolgter Auftrennung der Proteinlysate durch Gelelektrophorese werden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu werden das Polyacrylamidgel und die Membran in eine Blotting-Apparatur eingespannt. Die zu transferierenden Proteine bewegen sich wie bei der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. So wandern die Proteine des Polyacrylamidgels zur Membran, welche sich auf der Anodenseite befindet. Anschließend können die geblotteten Proteine durch spezifische und sehr sensitive Ag-Ak-Reaktionen nachgewiesen werden¹⁸².

Vor der Inkubation mit dem Erst-Antikörper wird die Membran noch mit Hilfe eines Proteingemisches geblockt, da so später unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Membran vermieden werden können. Um die Nitrozellulosemembran nach erfolgter Inkubation von überschüssigem Erst-Antikörper zu befreien, wird sie mit TBS und TBST gewaschen. Anschließend erfolgt die Zugabe eines weiteren Antikörpers, welcher gegen den Erst-Antikörper gerichtet und mit einer Peroxidase konjugiert ist. Auf diese Weise wird die Detektion des gesuchten Proteins mit Hilfe eines ECL™ Plus System

ermöglicht. Das in der ECLTM –Lösung enthaltene Lumigen PS-3 Acridin Substrat wird durch die Antikörper-gebundene Peroxidase oxidiert. Das Produkt luminesziert und färbt den in einer Röntgenfilmkassette aufgelegten Audiographiefilm an den entsprechenden Positionen des Proteins auf der Membran.

2.2.6.1 Herstellung von Proteinlysaten

- Die als Pellets vorliegenden Tumorzellen wurden auf Eis 10 Minuten lang mit 80- 100 µl (je nach Pelletgröße) NP-40-Puffer durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette lysiert.
- Daraufhin wurden die Proben bei 14000 rpm und 4°C für 15-30 Minuten zentrifugiert und die Überstände in Cryocups bei –80°C weggefroren.
- Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurden 5 µl des Lysates mit 20 µl NP-40 gemischt bei –20°C gelagert.
- Die Auswertung der Proteinkonzentration erfolgte unter Verwendung des „BCA Protein Assay Reagent Kit“ nach Anweisung des Herstellers im Multi- Detektions- Reader SLT Rainbow.

2.2.6.2 Herstellung von Kernextrakten

- Nach Waschen der Tumorzellen in PBS wurden die Pellets auf Eis 15 Minuten lang mit 400 µl des Kernextrakt-puffers A (s. Tabelle 2.6) inkubiert.
- Anschließend wurden 25 µl NP-40 10% zugegeben und die Proben für 10 Sekunden gevortext.
- Daraufhin wurden die Proben bei 14000rpm und 4°C für 30 Sekunden zentrifugiert und die Überstände vollständig abgenommen.
- Die Pellets wurden mit 50 µl des Kernextrakt Puffers C resuspendiert und während einer 15-minütigen Inkubation auf Eis mehrmals geschüttelt.

- Nach einer erneuten Zentrifugation bei 1400rpm und 4°C für 5 min konnten die Überstände in Cryocups überführt und bei -80°C weggefroren werden.

2.2.6.3 Durchführung von SDS-Page und Western-Blot

- Nach obenstehendem Schema (s. Tabelle 2.6) wurden Acrylamid, Tris Puffer, H₂O bidest. und SDS-Lösung gemischt und mit 10% APS und TEMED die Polymerisation des Trenngels eingeleitet. Eine Vertikalzelle wurde mit dem Trenngel zu bis zu 2/3 ihres Endvolumens aufgefüllt und das Gel mit Isopropanol überschichtet um eine glatte Trennfläche zu erhalten. Nach halbstündiger Polymerisation des Trenngels wurde die Isopropanol-Schicht mit Wasser ausgespült, ein Sammelgel (s. Tabelle 2.6) in Gelkammer bis zum oberen Glasrand aufgegossen und ein Kamm eingesetzt.
- Vor dem Auftrag der Proben wurde jeweils eine Proteinmenge von 20 µg mit dem SDS-Probenpuffer (3x) im Verhältnis 3:1 verdünnt und für 5 Minuten bei 100°C inkubiert. Nach abgeschlossener Polymerisation des Sammelgels wurden die Proben aufgelegt und die Elektrophorese bei einer Spannung von 120 V durchgeführt.
- An die Auftrennung der Proteinlysate durch Gelelektrophorese folgend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierzu wurde ein „Sandwich“ in folgender Orientierung gebildet: mit Transferbuffer durchtränkte Schwämme, Filterpapier, Nitrozellulose Membran, Gel, Filterpapier, Schwämme. Dieses wurde luftblasenfrei in eine Blotting Apparatur eingespannt (Anode unten, Kathode oben) und im Transferbuffer bei 350mA für 1 h bei 4°C geblottet.
- Nach Abschluss des Transfers wurde die Nitrozellulosemembran sofort in eine Wanne mit 1x TBS überführt, um ein Austrocknen zu vermeiden. Danach wurde die Membran in 4% Slimfast in TBS, 0,5% Tween für eine Stunde geblockt um unspezifische Bindungsstellen zu verhindern (bei

Kernextrakten erfolgte vor der Blockung noch eine Färbung mit Ponceau-Lösung).

- Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran mit dem jeweiligen Primär-Antikörper in 2% Slimfast für eine Stunde oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Um die Membran nach erfolgter Inkubation von überschüssigem Erst-Antikörper (s. Tabelle 2.4) zu befreien, wurde sie kurz in TBS, 0,5% Tween geschwenkt und im Folgenden dreimal in TBST, 0,5% für je fünf Minuten gewaschen. Die Membran wurde dann in die Lösung, die den Zweit-Antikörper (s. Tabelle 2.5) enthielt (2% Slimfast in TBST, 0,5%), überführt.
- Nach einer Inkubation von 1-2 h bei Raumtemperatur wurde sie erneut gewaschen. Hierzu wurde die Membran (bzw. die Membranstreifen) kurz in TBS, 0,5% Tween ausgeschwenkt und anschließend dreimal für je fünf Minuten mit TBST, 0,5% gewaschen. Im Folgenden wurde für vier Minuten in TBST, 3% gewaschen, danach erneut kurz in TBS, 0,5% Tween ausgeschwenkt und ein weiteres mal für 3 min in TBS, 0,5% Tween gewaschen. Abschließend wurden noch zwei weitere Waschschrte in 1x TBS durchgeführt. Die Detektion des vom Primär-Antikörper erkannten Proteins erfolgte mit einem ECL-System. Dabei wurde die abgetropfte, aber nicht trockene Membran in ein Gemisch aus je 1 ml ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 überführt und für eine Minute darin inkubiert. Danach wurde die Membran in Klarsichtfolie eingeschlagen und in eine Filmkassette gelegt. Im Dunkeln erfolgte die Exposition von Röntgenfilmen.

2.2.7 Statistische Auswertung

Jedes Experiment wurde mindestens dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. Zur Beurteilung einer Signifikanz der Ergebnisse wurde der zweiseitige T-Test verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Die Inhibition der PI(3)-Kinase in humanen Nierenzellkarzinom-Zellen hemmt die Zytokin-Sekretion und induziert den apoptotischen Zelltod

Der PI(3)K-Signalweg spielt eine zentrale Rolle in der Regulation einer Vielzahl zellulärer Funktionen wie Proliferation, Wachstum und Apoptose^{194,195}. Zur Analyse der Effektivität einer Inhibition der PI(3)-Kinase in humanen Nierenzellkarzinomen (NZK) wurden die Zelllinien MZ1774, CAKI-2 und A498 mit verschiedenen Konzentrationen des PI(3)K-Inhibitors LY294002 inkubiert. Zusätzlich wurde Rapamycin, ein potenter Inhibitor von mTOR, einer Proteinkinase, die der PI(3)-Kinase nachgeschaltete Effekte vermittelt, in diesen Experimenten verwendet. Mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest (ELISA) wurde schließlich der Einfluss dieser Behandlung der NZK-Zellen auf deren Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie IL-6 und VEGF erfasst. Eine Überexpression dieser Moleküle findet man unter anderem bei einer Mutation im Von-Hippel-Lindau-Gen, wie sie häufig beim klarzelligen NZK und einigen hereditären NZK vorkommt und welche einen schlechten prognostischen Faktor darstellt²⁰⁹.

Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung dieser Tumorzellen mit LY294002 schon in niedriger Konzentration sehr effizient die Sekretion von IL-6 und VEGF hemmt (gezeigt für die Zelllinie MZ1774, s. Abb. 3.1 A, B).

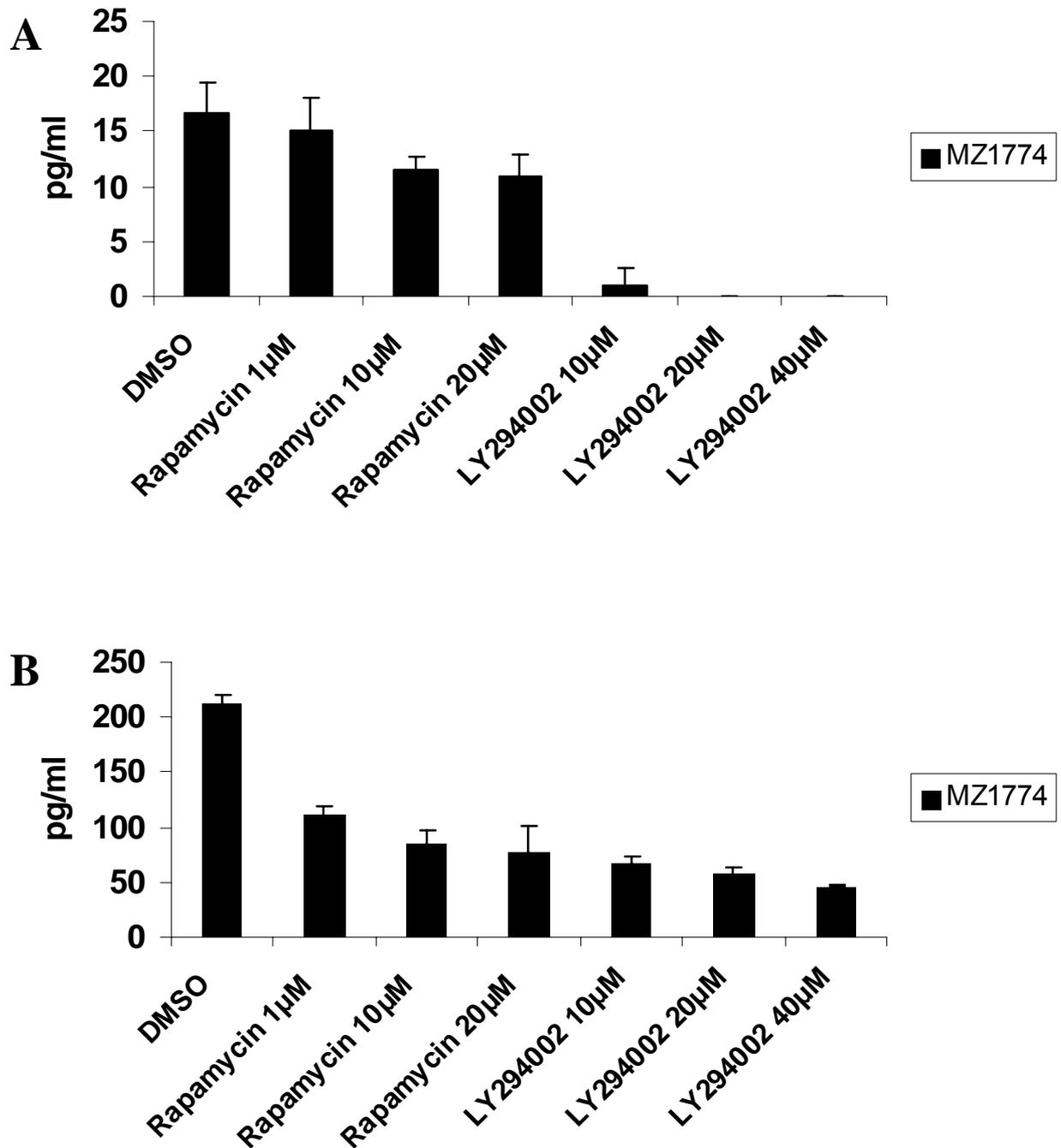


Abbildung 3.1: Reduktion der Sekretion von autokrinen Wachstumsfaktoren beim Nierenzellkarzinom infolge PI(3)K-Inhibition mittels LY294002. 2×10^6 Zellen wurden in 10 ml Medium kultiviert und mit den angegebenen Konzentrationen von LY294002 und Rapamycin behandelt. Nach 48-h wurden die Sekretion von IL-6 (A) und VEGF (B) mittels ELISA-Reader bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen.

Diese Inhibition beruhte auf einer reduzierten nukleären Translokation von HIF1 α , einem Transkriptionsfaktor, von dem gezeigt werden konnte, dass er eine pathogenetisch wichtige Rolle bei der Progression des Nierenzellkarzinoms und der damit verbundenen Bildung von VEGF spielt²²⁴. Außerdem wird RelB, ein Mitglied der NF- κ B-Familie, die an der Regulation der IL-6-Transkription mitbeteiligt ist, vermindert in den Zellkern transloziert (s. Abb. 3.2).

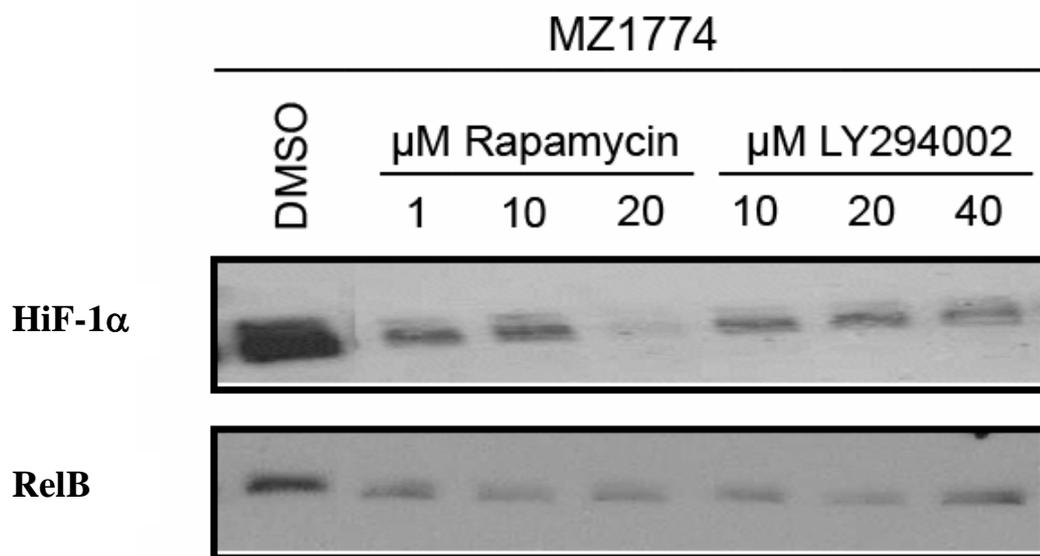
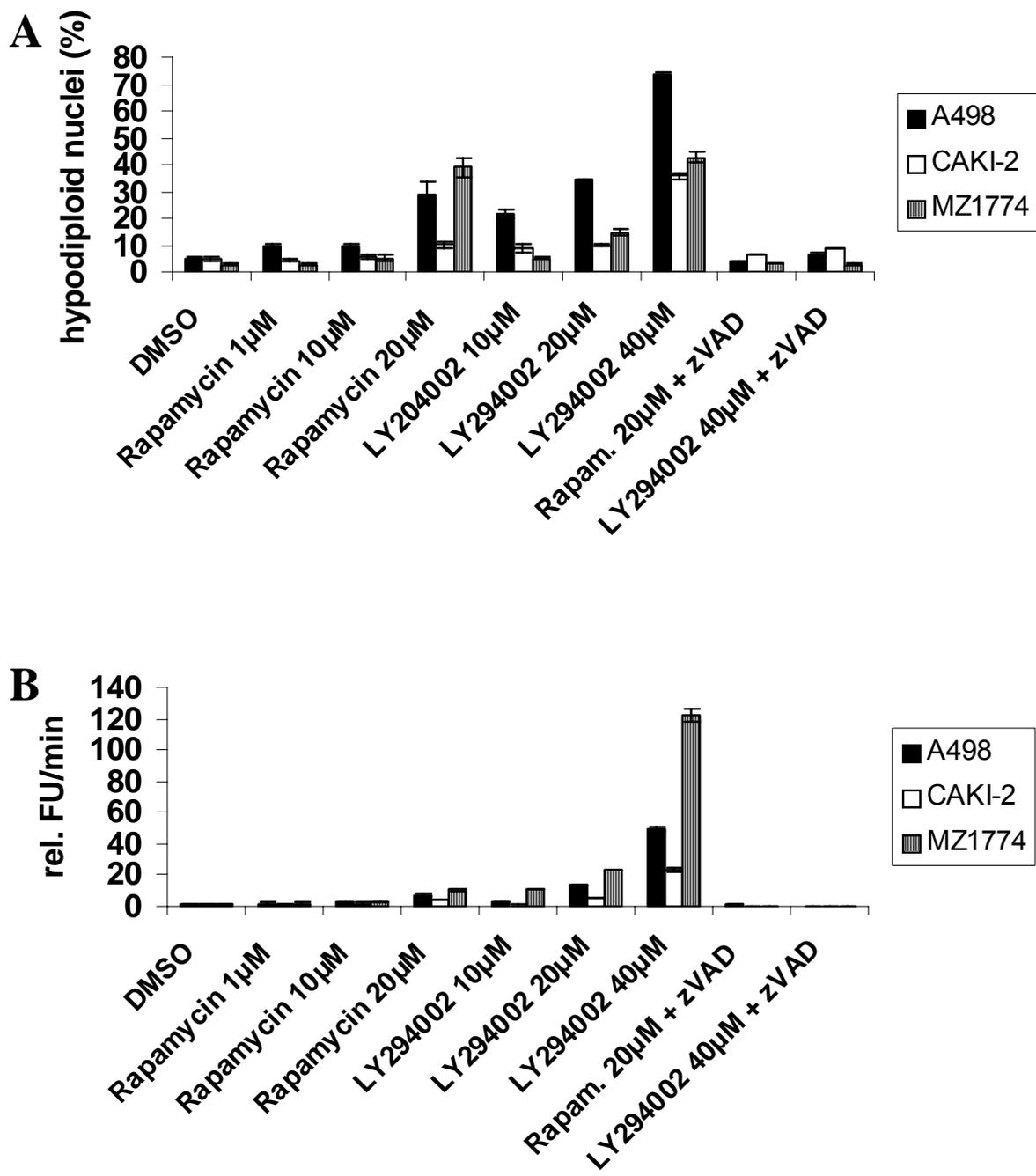


Abbildung 3.2: LY294002 und Rapamycin bewirken eine reduzierte Expression von RelB und HIF1 α . 1×10^6 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Rapamycin und LY294002 über 48h inkubiert. Die anschließend hergestellten Kernextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die verminderte Expression der Transkriptionsfaktoren mit anti-HIF1 α bzw. anti-RelB im Western-Blot nachgewiesen.

Die inhibitorische Wirkung war teilweise Folge einer Induktion des apoptotischen Zelltodes, wie durch Erfassung der nukleären DNA-Fragmentation und der erhöhten Caspase-Aktivität nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 3.3 A, B).



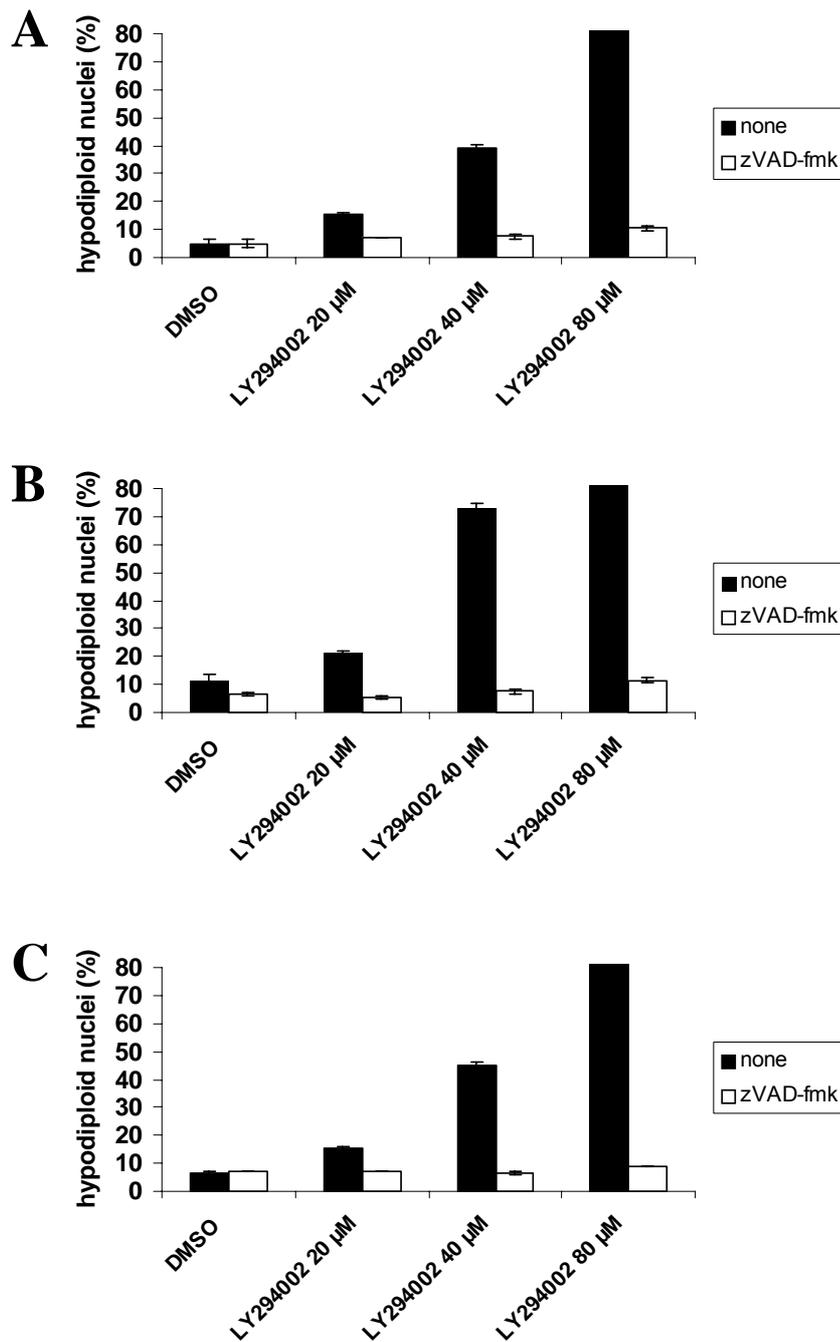
3.3: Apoptose-Induktion und Caspase-Aktivierung durch LY294002 und Rapamycin. 2×10^5 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Rapamycin und LY294002 über 48h inkubiert. Die konzentrationsabhängige Apoptose der Nierenzellkarzinom-Zellen wurde durch durchflußzytometrische Färbung hypoploider DNA aus apoptotischen Zellkernen bestimmt (A). Zusätzlich wurde eine Aktivierung der Caspasen anhand der Spaltung des fluoreszierenden Caspase-Substrates DEVD-AMC fluorometrisch erfasst (B). Es werden die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen gezeigt.

3.2 Die Apoptoseinduktion durch PI(3)K-Inhibition ist unabhängig vom extrinsischen, rezeptorvermittelten Signalweg

Um die beteiligten Mechanismen im Rahmen einer Apoptoseinduktion durch LY294002 zu analysieren, wurde zunächst die Rolle des extrinsischen, durch Todesrezeptoren vermittelten, Signalweges untersucht. Hierzu wurden Jurkat-Zellen verwendet, die entweder eine dominant-negative Mutante des Adapterproteins FADD exprimierten, oder defizient für Caspase-8, der proximalen Caspase bei der Vermittlung der Apoptose durch Todesrezeptoren, waren. FADD ist für die Transduktion des apoptotischen Signals via CD95, TNF-Rezeptor 1 und den TRAIL-Rezeptoren verantwortlich. Die Weiterleitung des Signals erfolgt anschließend durch eine Aktivierung der Caspase-8.

Es zeigte sich, dass die Inkubation der FADD- und Caspase-8-defizienten Zellen mit LY294002 ähnliche apoptotische Effekte hatte wie bei den Vektor-Kontrollzellen, was darauf hindeutet, dass die Apoptoseinduktion durch LY294002 unabhängig vom extrinsischen Signalweg ist. Wie erwartet waren die proapoptotischen Effekte von LY294002 durch die Zugabe des pan-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk komplett aufhebbar. (s. Abb. 3.4 A-C).

Die Induktion der Apoptose der Zellen durch PI(3)K-Inhibition wurde zudem durch Erfassung der Phosphatidylserin-Exponierung mittels Annexin-V-FITC-Färbung bestätigt. Darüber hinaus wurde der Einfluss dieser Inhibition auf die Viabilität der Zellen photometrisch mit Hilfe eines MTT Assays erfasst. (s. Abb. 3.5 A, B)



3.4: Die Inhibition der Signaltransduktion über FADD und Caspase-8 hat keinen Einfluss auf die durch LY294002 vermittelte Apoptose. 2×10^5 Jurkat-A3-Zellen (Vektorkontrolle) (A), und die FADD- und Caspase-8-defizienten Jurkat-Zellen (B,C) wurden mit DMSO (schwarze Balken) oder 100 µM zVAD-fmk (weiße Balken) über 1 h inkubiert und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen von LY294002 über 24 h stimuliert. Die Induktion der Apoptose wurde im Durchflußzytometer durch Propidiumiodid-Färbung hypodiploider, apoptotischer Zellkerne bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen.

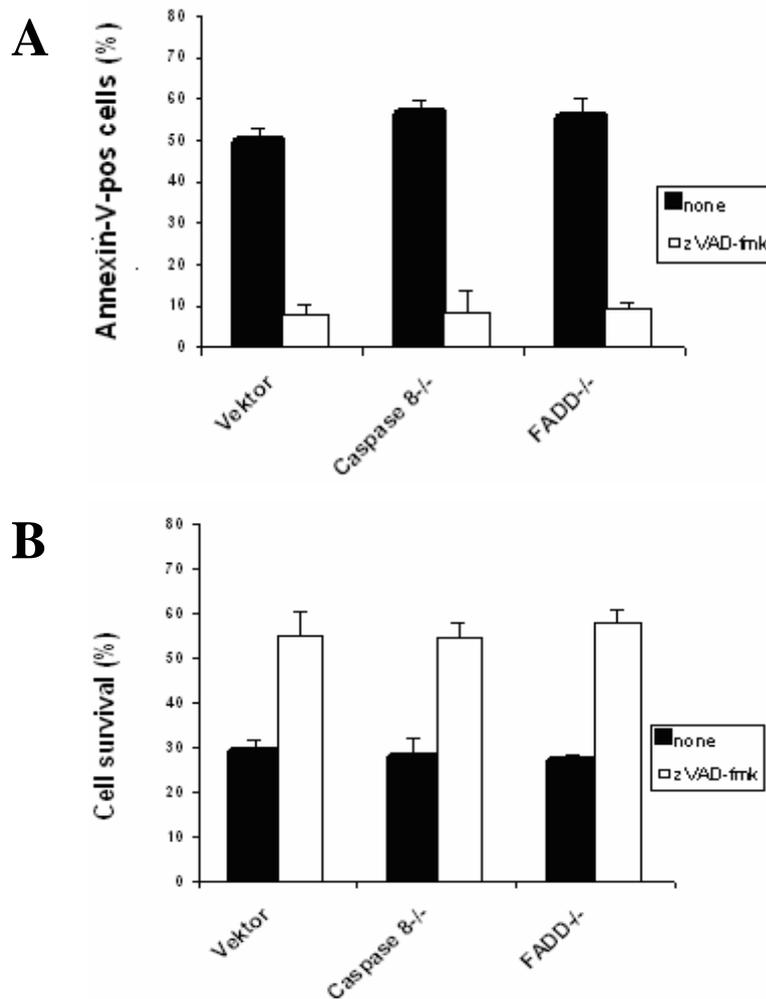


Abbildung 3.5: Phosphatidylserin-Exponierung und reduzierte Zellviabilität unter Behandlung mit LY294002. 2×10^5 Jurkat-A3-Zellen (Vektorkontrolle), und die FADD- und Caspase-8-defizienten Jurkat-Zellen wurden mit LY294002 in einer Konzentration von $80 \mu\text{M}$ über 24 h stimuliert. Anschließend wurde die Phosphatidylserin-Exponierung mittels Annexin-V-FITC-Färbung (A) im Durchflußzytometer bestimmt und die Viabilität der Tumorzellen photometrisch mit Hilfe eines MTT Assays (B) erfasst.

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen führte die Inkubation der Jurkat-Zellklone mit dem PI(3)K-Inhibitor zu einer Spaltung des Caspase-Substrates Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), einem wichtigen DNA-Reperatur-Gen, und zu einer Aktivierung von Caspase-8 und -9. Durch Verwendung des Akt-Inhibitors SH5 konnte zudem gezeigt werden, dass die Apoptoseinduktion mit LY294002 sehr wahrscheinlich über eine verminderte Aktivität von Akt vermittelt wird (s. Abb. 3.6).

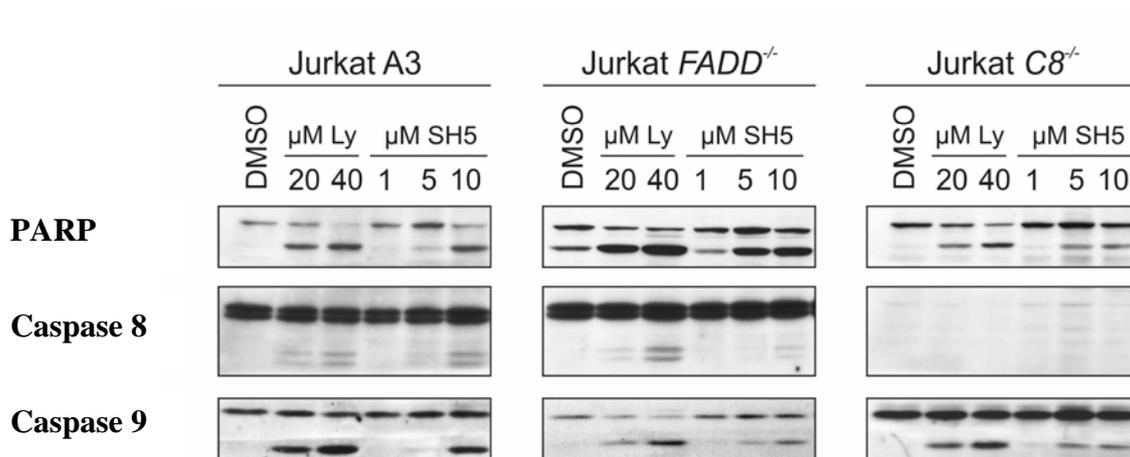


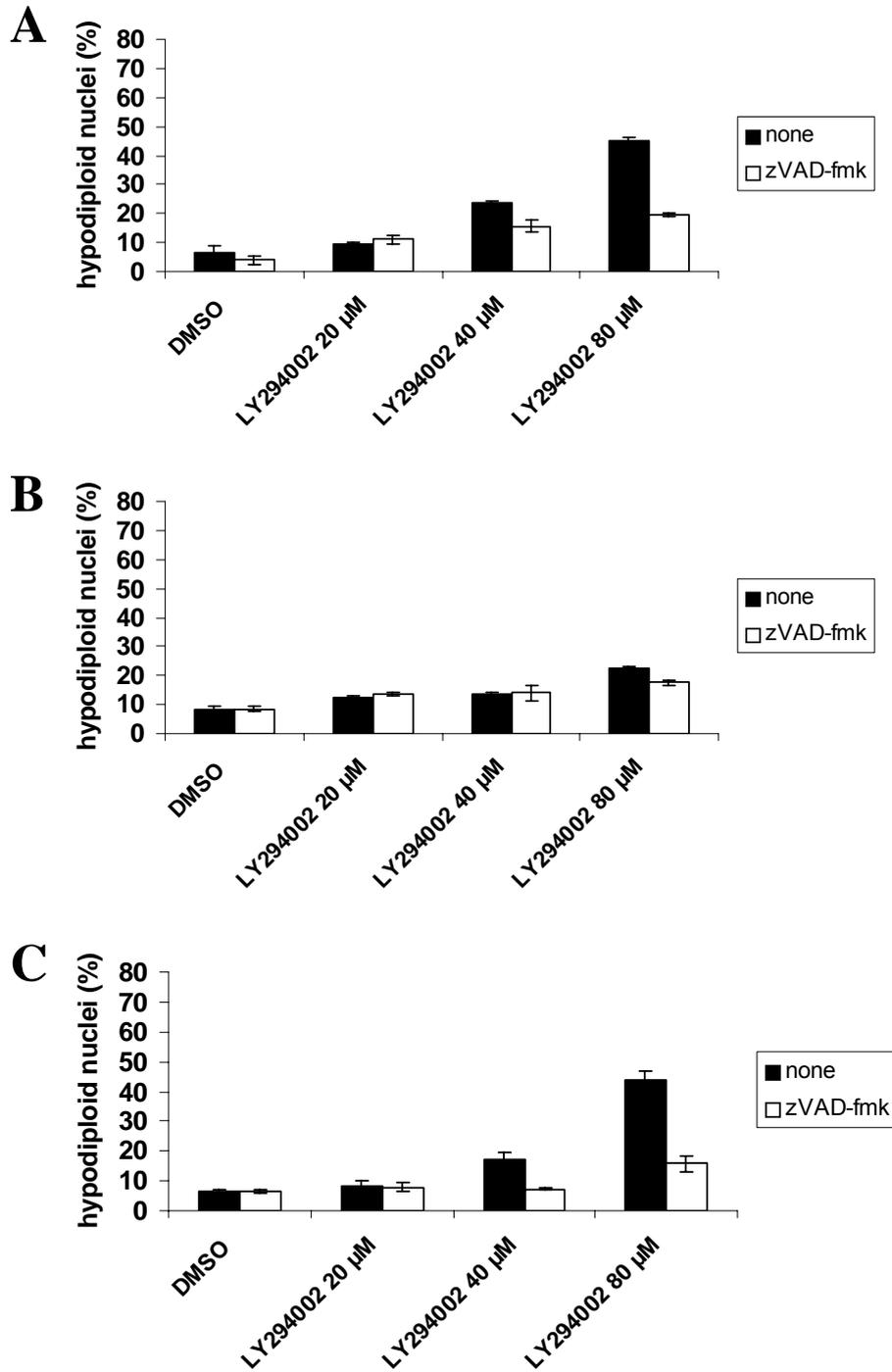
Abbildung 3.6: Die Inhibition des PI(3)K/Akt-Signalweges führt zur Spaltung von PARP und Aktivierung von Caspase-8 und -9. 1×10^6 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von LY294002 und SH5 über 24h inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Spaltung von PARP, Caspase-8 und Caspase-9 im Western-Blot nachgewiesen.

3.3 Die Apoptoseinduktion infolge PI(3)K-Inhibition wird durch den intrinsischen, mitochondrialen Signalweg vermittelt und benötigt eine Aktivierung von Caspase-9

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass die Apoptoseinduktion durch LY294002 unabhängig von dem extrinsischen Signalweg stattfindet, wurde anschließend die Bedeutung der intrinsischen Signalübertragung untersucht. Dazu wurden Jurkat-Zellen verwendet die stabil Bcl-2 überexprimieren oder defizient für Caspase-9 sind. Die Überexpression von Bcl-2 oder ein Defekt in der Biosynthese von Caspase-9 verhindert die Apoptoseinduktion und eine Freisetzung von Cytochrom C durch Chemotherapeutika, die an dem mitochondrialen Cytochrom C/Apaf-1/Caspase-9-Signalweg ansetzen^{192, 217}.

Im Vergleich zur Vektorkontrollzelle (s. Abb. 3.7 A, C) konnte eine komplette Inhibition der Apoptoseinduktion durch LY294002 in den Bcl-2-überexprimierenden (s. Abb. 3.7. B) und den Caspase-9-defizienten (s. Abb. 3.7 D) Jurkatzellen beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass der

apoptotische Zelltod durch PI(3)K-Inhibition über dem intrinsischen, mitochondrialen Signalweg vermittelt wird.



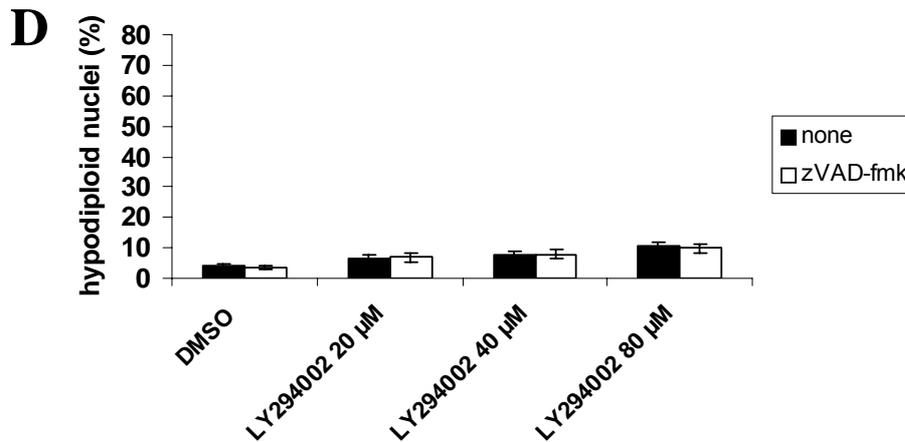


Abbildung 3.7: Apoptose infolge PI(3)K-Inhibition wird durch eine Überexpression von Bcl-2 oder eine Defizienz an Caspase-9 verhindert. 5×10^6 Jurkatzellen die Bcl-2 überexprimieren (B) bzw. Caspase-9 defizient (D) sind, als auch die entsprechenden Vektor-Kontrollzellen (A, C) wurden mit DMSO (schwarze Balken) oder $100 \mu\text{M}$ zVAD-fmk (weiße Balken) über 1 h vorbehandelt und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen von LY294002 über 24 h stimuliert. Die Apoptose wurde durch Bestimmung der hypodiploiden, apoptotischen Zellkerne durchflußzytometrisch erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung.

Dem entspricht auch die Beobachtung, dass die Inkubation mit LY294002 zu einer konzentrationsabhängigen Spaltung von PARP in den Kontrollzellen führt, wohingegen dieser Effekt in den Bcl-2-überexprimierenden und den Caspase-9-defizienten Zellen komplett verhindert wurde (s. Abb. 3.8 A, B). Zur Kontrolle wurden die Zellen zusätzlich mit Etoposid oder TRAIL behandelt.

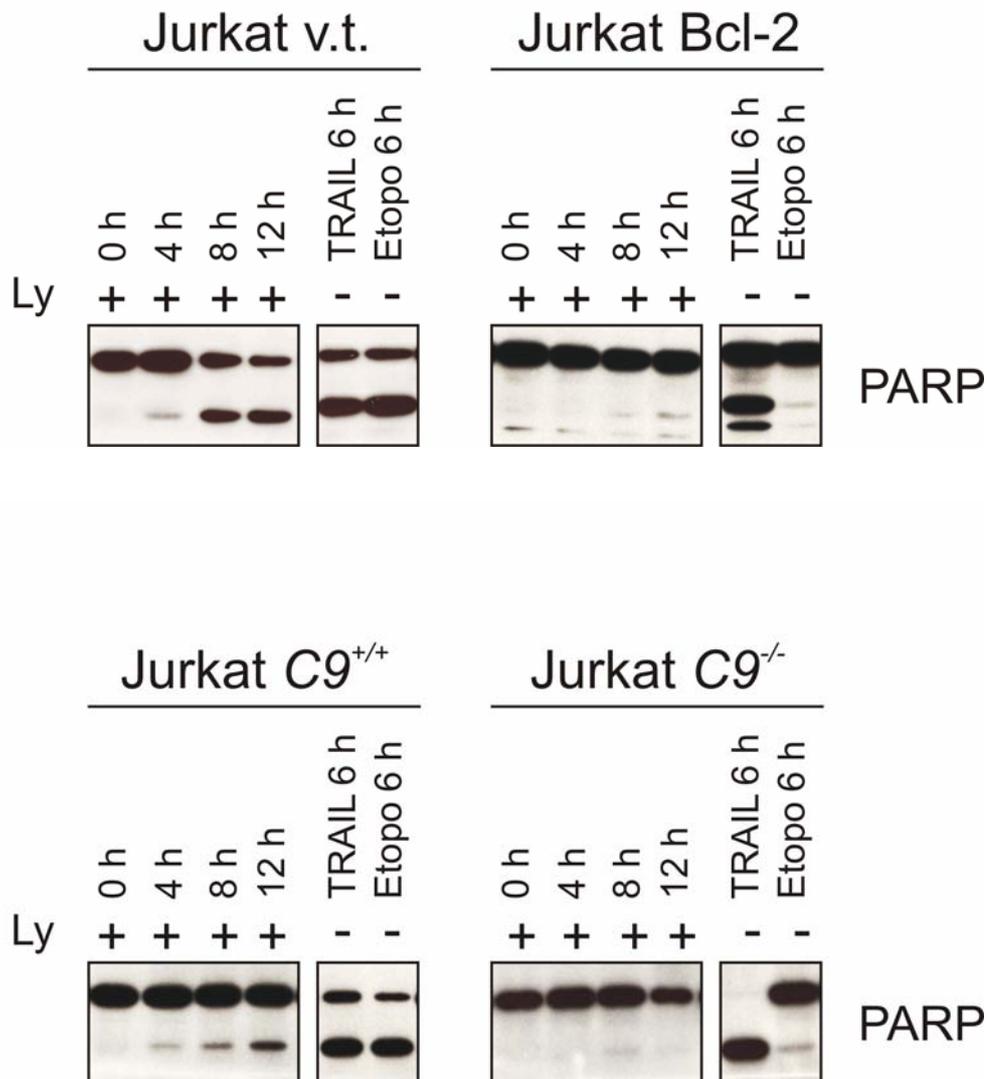


Abbildung 3.8: Eine Überexpression von Bcl-2 oder eine Defizienz an Caspase-9 inhibiert die LY294002-vermittelte Caspase-Aktivierung. 2×10^6 Jurkatzellen die Bcl-2 überexprimieren (B) bzw. Caspase-9 defizient (D) sind, als auch die entsprechenden Vektor-Kontrollzellen (A, C) wurden mit $40 \mu\text{M}$ LY294002 für die angegebene Zeitdauer inkubiert. Die Spaltung von PARP wurde mittels Immunoblotting nachgewiesen. Als Kontrolle wurden die Zellen zudem mit 40 ng/ml TRAIL oder $25 \mu\text{g/ml}$ Etoposid stimuliert.

3.4 TRAIL und Etoposid potenzieren die Wirkung von PI(3)K-Inhibitoren in Jurkat-Zellen

Wie bereits in anderen Arbeiten beschrieben wurde, kann die kombinierte Gabe von Inhibitoren der PI(3)-Kinase mit antineoplastischen Substanzen wie Etoposid oder Doxorubicin zu einer erhöhten Apoptoserate von malignen Zellen führen²⁰⁰⁻²⁰⁷. In der folgenden Versuchsreihe konnten ähnliche Ergebnisse auch in Jurkat-Zellen dargestellt werden. Wie in Abbildung 3.9 veranschaulicht führte die zusätzliche Gabe von Etoposid, einem Wirkstoff⁸⁴ der die Topoisomerase II hemmt und über den mitochondrialen Signalweg den Zelltod herbeiführt, zu einer gesteigerten apoptotischen Potenz der PI(3)-Inhibition in den Kontroll- und Caspase-9 exprimierenden Jurkat-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden beobachtet, wenn die Zellen mit dem Todesrezeptor-Liganden TRAIL behandelt wurden. Interessanterweise war dieser Effekt von TRAIL, anders als bei der Inkubation mit Etoposid, auch in den Caspase-9-defizienten Zellen nachweisbar, was möglicherweise eine neue therapeutische Kombination darstellen könnte.

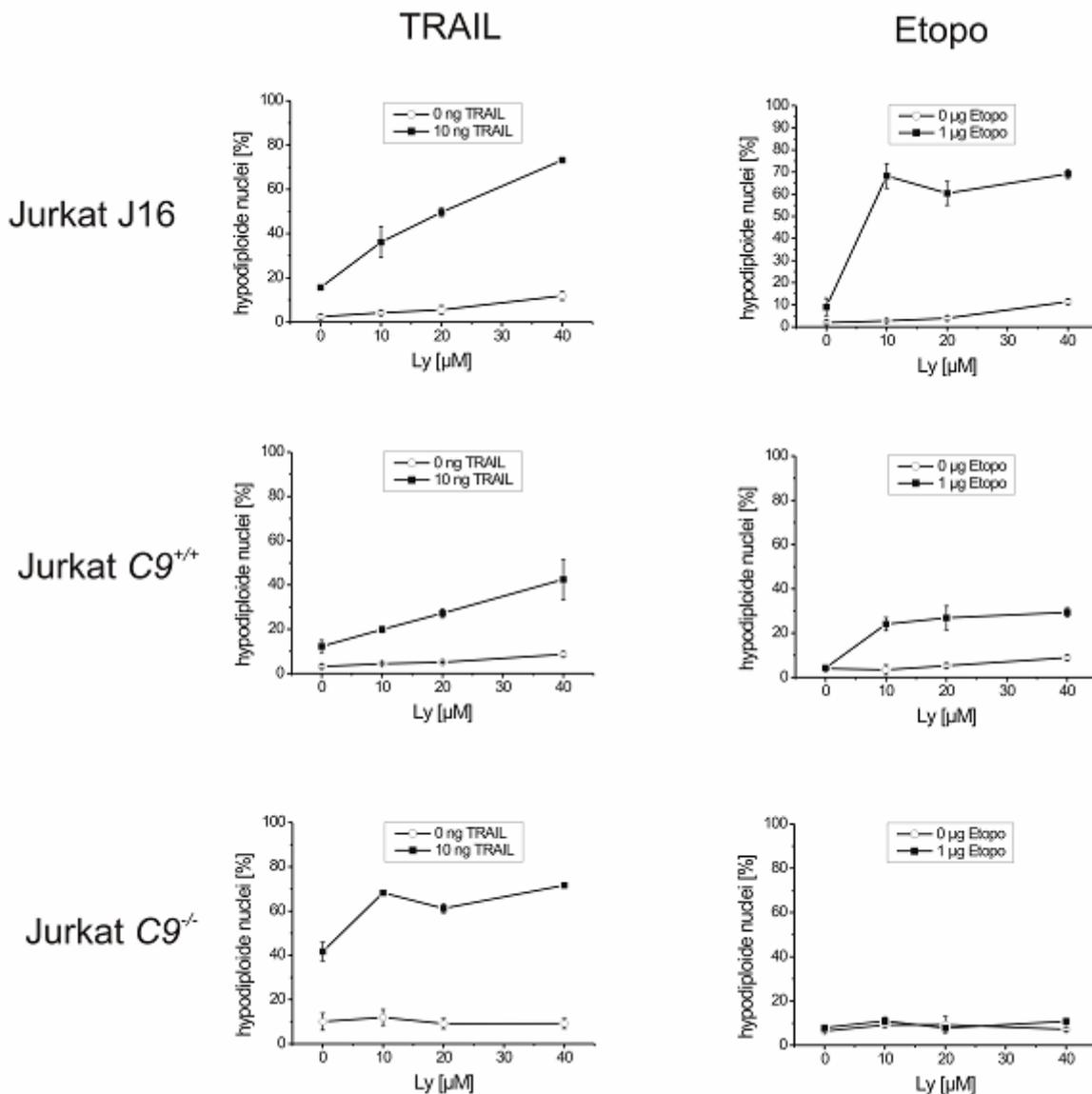


Abbildung 3.9: PI(3)K-Inhibitoren steigern die TRAIL- und Etoposid-induzierte Apoptose in Jurkat-Zellen. 2×10^6 Capsase-9-exprimierende oder -defiziente Jurkatzellen wurden über 24-h mit Etoposid oder TRAIL und LY294002 in den angegebenen Konzentrationen über 24 h stimuliert. Die Induktion der Apoptose wurde im Durchflußzytometer durch Propidiumiodid-Färbung hypdiploider apoptotischer Zellkerne bestimmt. Es werden die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen gezeigt.

4. Diskussion

Eine aberrante Hochregulation des PI(3)K-Signalweges ist ein häufiges Ereignis in der Karzinogenese vieler maligner Erkrankungen. Infolge dieser Aktivierung kommt es zur Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP3), das selbst als Aktivator verschiedener Effektorproteine fungiert, deren wichtigster Vertreter Akt ist. Dabei bindet PIP3 an die PH-Domäne von Akt, rekrutiert es an die Plasmamembran und ermöglicht auf diese Weise dessen Phosphorylierung an der Position T308 des katalytischen Zentrums unter Mitwirkung der Proteinkinase PDK-1¹⁹⁷. Zur vollen Aktivierung von AKT wird jedoch noch eine zweite Phosphorylierung an dem hydrophobischen Ende (S473) durch die Kinase PDK-2 benötigt. Diese Kinase wird wahrscheinlich durch den rictor-mTOR-Komplex gebildet²¹⁶. Mittels Aktivierung nachgeschalteter Substrate und Signalwege kontrolliert AKT fundamentale, zelluläre Prozesse wie Proliferation, Motilität, Adhäsion, Transformation, Angiogenese und Zelltod. Einer Aktivierung von AKT entgegen wirkt das Tumorsuppressorgen PTEN (*Phosphatase und Tensin Homolog*), das über eine Dephosphorylierung von PIP3 die Bildung von AKT mitreguliert.

Eines der am ausführlichsten untersuchten, nachgeschalteten Substrate von AKT ist die Serin/Threonin-Kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*), welche in der Zelle als molekularer Sensor die Regulation der Proteinbiosynthese in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit benötigter Baustoffe beeinflusst. Der mTOR-Signalweg wird in seiner Funktion durch eine direkte Inaktivierung mittels TSC1 und TSC2 (*tuberous sclerosis complex*) gebremst. Eine Inhibierung von TSC2 führt indirekt über eine vermehrte Bildung der GTPase Rheb zu einer verstärkten Aktivierung von mTOR^{216,218,219}. mTOR bewirkt über nachgeschaltete Effektorproteine wie 4e-BP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1*) oder dem ribosomalen Protein p70S6-Kinase eine Stimulation der Proteinsynthese und einen Eintritt in die G1-Phase des Zellzyklus.

Der PI(3)K-Signalweg wurde lange Zeit als linear betrachtet. Jedoch weisen neueste Forschungsergebnisse auf eine beträchtliche Vernetzung mit anderen

Signalwegen wie beispielsweise dem der MAP-Kinase (*mitogen activated protein kinase*) oder NF- κ B hin. Darüber hinaus unterstreicht die zunehmende Zahl der in diesem Zusammenhang neu identifizierten positiven und negativen Rückkoppelungsmechanismen die zentrale Bedeutung dieses Signalwegs und macht ihn damit zu einem höchst interessanten Angriffspunkt neuer Therapien^{194,195,216,219}.

Die genaue Rolle des PI(3)/AKT/mTOR-Signalweges bei Nierenzellkarzinomen (NZK) ist noch nicht geklärt. Eine Mutation oder Herabregulierung von PTEN wurde in einer Vielzahl von Nierenzellkarzinomen beschrieben und stellt einen unabhängigen, prognostischen Faktor für das krankheitsspezifische Überleben entsprechender Patienten dar. Auch eine verminderte Aktivität von TSC1 und TSC2 konnte in diesen Malignomen nachgewiesen werden. Die damit verbundene gesteigerte Aktivität von mTOR führt zu einer Hochregulation von HIF1 α und VEGF. Daher nimmt der PI(3)K-Signalweg entscheidenden Einfluss auf eines der wichtigsten Ereignisse im Rahmen der Karzinogenese des NZK^{198,215,216,220,222}.

Am Anfang der malignen Transformation des Nierengewebes findet man häufig eine gestörte Funktion des Von-Hippel-Lindau-Gens (VHL-Gen), welches auf dem langen Arm des Chromosoms 3 lokalisiert ist²⁰⁹. Die Vererbung eines Defektes in diesem Gen führt zur Erkrankung am Von-Hippel-Lindau-Syndrom, das die häufigste Ursache des vererbten, klarzelligen Nierenzellkarzinom darstellt. Darüber hinaus findet sich eine Mutation im VHL-Gen auch bei bis zu 75% der Patienten mit einem sporadisch aufgetretenem NZK^{210,212}. Das Produkt des VHL-Gens bildet eine Komponente des (VHL)-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes. Dieser Komplex ist in der Lage durch Polyubiquitination überschüssiges HIF-1, -2 und -3 zu entfernen. Ein Verlust in der Funktion dieses Komplexes führt zu einer Akkumulation von HIF1 α . Dieses Protein transloziert nach Bindung an HIF1 β in den Zellkern und induziert dort die Transkription von Wachstums- und angiogenetischen Faktoren wie IL-6, EGF, TGF, VEGF und PDGF. Die Folge einer aberranten Funktion des (VHL)-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist eine unkontrollierte, permanente Aktivierung von HIF1 α und daraus resultierend eine gesteigerte Angiogenese, eine bessere

Adaption der Tumorzellen an Sauerstoffarmut und niedrigen pH im Gewebe, als sowie eine erhöhte Zellproliferation und –viabilität. Die sezernierten Wachstumsfaktoren binden an die entsprechenden Tyrosinkinase-Rezeptoren der NZK-, Endothel- und Stromazellen und bewirken so eine autokrine und parakrine Stimulation. Eine Aktivierung dieser Rezeptoren initiiert intrazellulär eine kaskadenartige Signaltransduktion über verschiedene Signalzweige, zu welchen auch der PI(3)K-Signalweg gehört.

Substanzen, welche die PI(3)K-Signalübertragung durch Inhibition des mTOR-Moleküls unterbrechen, wie z.B. Temsirolimus (CCI-779, Wyeth Pharmaceuticals) oder Everolimus (RAD001, Novartis Pharma), zeigten vielversprechende Effekte in klinischen Studien. In der randomisierten Phase-III-Studie ARCC bewirkte Temsirolimus einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber einer Standardtherapie mit Interferon alfa (IFN- α). Temsirolimus wurde deshalb vor kurzem in den USA zur Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms zugelassen. Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass diese Substanzen unter anderem über eine Herabregulierung der Translation und Expression von HIF1 α wirken^{199,208,213,214,223}.

Ziel dieser Arbeit ist es ein besseres Verständnis für das bisher wenig geklärte Zusammenspiel zwischen Apoptose und dem Überlebens-Signalweg der PI3K zu erlangen, sowie die Effekte einer PI(3)K-Inhibition in Nierenzellkarzinomen proximal von mTOR zu analysieren. Das NZK zählt zu den 10 häufigsten Ursachen eines Tumor-assoziierten Todes bei einer jährlich zunehmenden Inzidenz (derzeit etwa 200.000 /a)¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Die am besten untersuchten und kommerziell erwerblichen Inhibitoren der PI(3)K sind LY294002 und Wortmannin. Beide setzen an der p110 katalytischen Untereinheit an. LY294002 inhibiert sehr wirksam das Wachstum verschiedener Malignome sowohl in vitro, als auch im Tiermodell, vermittelt durch eine Induktion des apoptotischen Zelltodes als Folge einer spezifischen Blockade des PI(3)K/AKT-Signalweges¹⁹⁹.

Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von NZK-Zellen mit LY294002 zu einer deutlichen Reduktion der Sekretion von IL-6, einem autokrin

wirksamen Wachstumsfaktor der NZK-Zellen, und VEGF, einem Promotor der Tumorangio-genese, führt. Dies war bedingt durch eine reduzierte nukleäre Expression von RelB, einem Transkriptionsfaktor der NF- κ B-Familie, und HIF1 α , einem Transkriptionsfaktor von Genen, die bei der zellulären Reaktion auf Hypoxie beteiligt sind. LY294002 ist also in der Lage, die auto- und parakrin stimulierte Proliferation der malignen Zellen und die in diesem Zusammenhang wichtige Neovaskularisation potent zu unterbrechen. Interessanterweise war diese inhibitorische Wirkung von LY294002 signifikant höher als bei dem mTOR-Inhibitor Rapamycin. Darüber hinaus konnte durch die Zugabe des PI(3)K-Inhibitors zum Kulturmedium die Apoptose in allen untersuchten NZK-Zellen effektiv induziert werden.

Die genauen Mechanismen, über welche PI(3)K-Inhibitoren den programmierten Zelltod auslösen werden kontrovers diskutiert¹⁹⁶. AKT ist in der Lage das Mitglied der Bcl-2-Familie Bad zu phosphorylieren und dadurch die Sequestrierung der mitochondrialen Membran einzuleiten. In seiner unphosphorylierten Form ist Bad für die Inaktivierung von anti-apoptotische Proteine wie Bcl-XL und Bcl-2 zuständig. Auch NF- κ B ist in der Apoptose-Regulation durch die PI(3)K über die Phosphorylierung einer Vielzahl von Molekülen, welche die Zelle vor apoptotischen Signalen schützen, involviert. Auf die Weise wird den zelltod-fördernden Stimuli durch Proteine der Forkhead-Familie, I κ B-Kinase, MDM2 oder Procaspase-9 entgegengewirkt.

Um den Einfluss von LY294002 auf die apoptotische Signaltransduktion zu analysieren, wurden Jurkat-Zellklone verwendet, die entweder defizient für wichtige Proteine im Rahmen der Weiterleitung des apoptotischen Signals waren, oder Bcl-2, ein antiapoptotisch wirksames Molekül, überexprimierten. Die Blockade des extrinsischen, Todesrezeptoren-vermittelten Signalweges mittels FADD- oder Caspase-8-defizienten Jurkatzellen hatte keinen Einfluss auf die Apoptoseinduktion durch PI(3)K-Inhibition. In beiden Jurkat-Mutanten konnten die für die Apoptose charakteristische, inter-nukleosomalen Doppelstrangbrüchen der DNA, als auch die Exposition von Phosphatidylserin (PS) an der Zelloberfläche, nachgewiesen werden. Zusätzlich war der zelltodfördernde Effekt von LY294002 in der reduzierten Viabilität der

Tumorzellen im MTT Assay erkennbar. Vermittelt wurde die Apoptose unter anderem durch eine erhöhte Aktivität der Caspasen in den behandelten Zellen. Wie erwartet waren zudem die Caspase-Aktivierung und Apoptose durch die Zugabe des pan-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk komplett aufhebbar.

Gegensätzlich hierzu wurde eine komplette Inhibition der Apoptoseinduktion durch LY294002 in den Bcl-2-überexprimierenden und den Caspase-9-defizienten Jurkatzellen erreicht. Dies deutet darauf hin, dass die Initiation der Apoptose durch LY294002 einer Aktivierung des mitochondrialen Signalweges bedarf. Dem entspricht auch die Beobachtung, dass die Inkubation mit LY294002 zu einer konzentrationsabhängigen Spaltung von PARP, einem wichtigen DNA-Reperatur-Gen, in den FADD- und Caspase-8-defizienten, nicht aber in den Bcl-2-überexprimierenden oder Caspase-9-defizienten Jurkatzellen, geführt hatte. Die Ergebnisse bei einer zusätzlichen Verwendung des Akt-Inhibitors SH5 indizieren zudem, dass die Apoptoseinduktion mit LY294002 sehr wahrscheinlich über eine verminderte Aktivität von Akt vermittelt wird.

Wie kürzlich gezeigt werden konnte, steigert die Verwendung von PI(3)K-Inhibitoren die Sensibilität von Tumorzellen gegenüber der Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika und Liganden der Todesrezeptor-Familie^{201,204}. Passend zu diesen Erkenntnissen beobachteten wir eine erhöhte Rate des apoptotischen Zelltodes bei einer gemeinsamen Verwendung von LY294002 und TRAIL bzw. Etoposid in der Behandlung von Jurkat-Zellen. Erstaunlicherweise steigerte die gleichzeitige Stimulation mit LY294002 und TRAIL auch die Apoptose in den Caspase-9-defizienten Jurkat-Zellen, welche ursprünglich resistent gegen PI(3)K-Inhibitoren waren. Diese erhöhte Sensitivität lässt sich durch die Fähigkeit der PI(3)K-Inhibitoren zur Herabregulierung von cFLIP und Oligomerisierung von DR5 (TRAIL-R2) erklären²⁰⁴. Auf diese Weise wird die Signalübertragung über den DISC-Komplex (*death-inducing-signaling-komplex*) unterstützt. Diese Ergebnisse weisen auf eine interessante therapeutische Option in der Behandlung von Tumorzellen mit reduzierter Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika wie TRAIL hin. Wie für die Caspase-9-defizienten Jurkat-Zellen gezeigt, könnte eine

Kombination mit PI(3)-Inhibitoren diese erniedrigte Sensitivität möglicherweise durchbrechen.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Inhibition des PI(3)K-Signalweges in Nierenzellkarzinomen zu einer verminderten Sekretion von Wachstums- und angiogenetischen Faktoren, infolge einer Herabregulierung der Expression von RelB und HIF1 α , führt. Darüber hinaus induziert der PI(3)K-Inhibitor LY294002 den programmierten Zelltod unabhängig der Todesrezeptor-vermittelten Signalübertragung über Aktivierung des intrinsischen, mitochondrialen Apoptoseweges. Dieser Effekt kann durch die Topoisomerase-Inhibitoren oder TRAIL zusätzlich gesteigert werden. Die Resultate dieser Arbeit geben Anreiz zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien, die über eine Beeinflussung des PI(3)K-Signalweges das häufige Problem der Chemoresistenz von Malignomen überwinden.

5. Zusammenfassung

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase spielt eine essentielle Rolle in einer Vielzahl zellulärer Funktionen wie Proliferation, Migration, Angiogenese und Zelltod. Als ein wichtiger Regulator des Zellüberlebens stellt sie zudem einen direkten Gegenspieler der Apoptose dar. Wie kürzlich nachgewiesen werden konnte, findet sich eine konstitutive Aktivierung der PI(3)K in verschiedenen humanen Tumoren wie beispielsweise dem Prostata-, Ovarial- oder Bronchialkarzinom^{200,201}. Daher stellt die Inhibition dieses Signalweges eine viel versprechende Option für zukünftige Behandlungen maligner Erkrankungen dar.

Das Nierenzellkarzinom (NZK) ist ein besonders therapieresistenter Tumor, an dem jährlich weltweit bis zu 100.000 Menschen sterben. Die Erstlinien-Standardtherapie dieses Malignoms erwies sich bisher als weitgehend erfolglos. Auch der Einsatz von Zytokinen wie IL-2 oder IFN-alpha brachte nur eine geringe objektive Ansprechrates von etwa 10-20%²⁰⁸. Da eine erhöhte Aktivität des PI(3)K/AKT-Signalweges in einem Großteil der Nierenzellkarzinome beschrieben wird, sollten in dieser Arbeit die molekularen Folgen einer Hemmung der PI(3)-Kinase und die antineoplastische Effektivität von LY294002, einem spezifischen Inhibitor dieses Enzyms, bei Nierenzellkarzinomen untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von NZK-Zellen mit LY29002 die Sekretion der Wachstums- und angiogenetischen Faktoren IL-6 und VEGF über eine Beeinflussung der Expression von RelB und HIF1 α inhibiert. Darüber hinaus wurde infolge der Stimulation der malignen Zellen mit LY294002 eine Induktion der Apoptose in allen verwendeten NZK-Zelllinien beobachtet. Um die molekularbiologischen Folgen einer Induktion des programmierten Zelltodes mit LY294002 zu analysieren, wurden Jurkat-Zellklone verwendet, die entweder defizient für wichtige Proteine im Rahmen der Weiterleitung des apoptotischen Signals waren oder Bcl-2, ein antiapoptotisch wirksames Molekül, überexprimierten. In den durchgeführten Experimenten konnte kein Effekt von LY294002 auf die Apoptose von Caspase-8- und FADD-defizienten Zellen im

Vergleich zu ihren Vektor-Kontrollzellen nachgewiesen werden. Gegensätzlich hierzu waren Tumorzellen, die Bcl-2 überexprimierten oder defizient für Caspase-9 waren, resistent gegenüber einer Apoptose-Induktion mittels PI(3)K-Inhibition. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Inhibition durch LY294002 zu einer mitochondrial-vermittelten, unabhängig des extrinsischen Signalweges erfolgenden Apoptose führt. Dem entspricht auch die Beobachtung, dass die Inkubation mit LY294002 zu einer konzentrationsabhängigen Spaltung von PARP, einem wichtigen DNA-Reperatur-Gen, in den FADD- und Caspase-8-defizienten, nicht aber in den Bcl-2-überexprimierenden oder Caspase-9-defizienten Jurkatzellen, führte. Zudem konnte durch eine gemeinsame Verwendung von LY294002 und TRAIL bzw. Etoposid in der Behandlung von Jurkat-Zellen eine erhöhte Rate des apoptotischen Zelltodes erreicht werden. Erstaunlicherweise steigerte die gleichzeitige Stimulation der Zellen mit LY294002 und TRAIL die Apoptose auch in den ursprünglich LY294002-resistenten, Caspase-9-defizienten Jurkat-Zellen.

6. Ausblick

Die genaue Kenntnis der multiplen Vernetzungen eines Signalweges ist unerlässlich, um die biologischen Konsequenzen einer Interferenz dieses Systems verstehen zu können. Die Identifizierung der Komponenten des PI(3)K-Signalweges, welche an der malignen Entartung körpereigener Zellen beteiligt sind, stellen einen essentiellen Schritt in der Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten dar. Durch gezielte Beeinflussung dieses, in einer Vielzahl von Tumoren hochregulierten Überlebenssignals, kann möglicherweise eine Überwindung der Chemoresistenz verschiedener Malignome erreicht werden. Darüber hinaus besteht die berechtigte Hoffnung, dass es durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren seltener zu Nebenwirkungen kommt als bei Medikamenten, die als generelle Wachstums-Suppressoren fungieren.

7. Literaturverzeichnis

1. Vogt C (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*), Solothurn.
2. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*; 26:239-57.
3. McDonnell TJ, Nunez G, Platt FM, Hockenberry D, London L, McKearn JP, Korsmeyer SJ (1990). Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B-cell population. *Mol Cell Biol.*; 10(5):1901-7
4. Green DR, Reed JC (1998 a). Mitochondria and apoptosis. *Science*; 281:1309-12.
5. Sarasin A, Stary A (1997). Human cancer and DNA repair-deficient diseases. *Cancer Detect Prev*; 21:406-11.
6. Cotman CW, Anderson AJ (1995). A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*; 10:19-45.
7. Tatton WG, Chalmers-Redman R., Brown D., Tatton N. (2003). Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol*; 53:61-70.
8. Thompson CB (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*; 267:1456-62.
9. Golstein P, Ojcius DM, Young JD (1991). Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev*; 121:29-65.
10. Wyllie, AH (1995). The genetic regulation of apoptosis. *Curr Opin GenetDev*; 5(1): p. 97-104.
11. Cariers A, Reinehr R, Fischer R, Warskulat U, Haussinger D (2002). c-Jun-N-terminal kinase dependent membrane targeting of CD95 in rat hepatic stellate cells. *Cell Physiol Biochem*; 12:179-86.
12. Pozzi S, Malferrari G, Biunno I, Samaja M (2002). Low-flow ischemia and hypoxia stimulate apoptosis in perfused hearts independently of reperfusion. *Cell Physiol Biochem*; 12:39-46.
13. Nagata S, Golstein P (1995). The Fas death factor. *Science*; 267(5203): 1449-56.

-
14. Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH (1998). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*; 245(4915): 301-5.
 15. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*; 60:619-42.
 16. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*; 182(5): 1545-56.
 17. Callahan MK, Williamson P, Schlegel RA (2000). Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes. *Cell Death Differ*; 7(7): 645-53.
 18. Krahling S, Callahan MK, Williamson P, Schlegel RA. (1999). Exposure of phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages. *Cell Death Differ*; 6(2): 183-9.
 19. Alnemri ES, Livingston, DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*; 87: 171-183
 20. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*; 75: 641-52.
 21. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman K.T., Howard A.D., Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*; 356:768-74.
 22. Blanchard H, Kodandapani L, Mittl PR, Marco SD, Krebs JF, Wu JC, Tomaselli KJ, Grutter MG (1999). The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure Fold Des*; 7:1125-33.
 23. Watt W, Koeplinger KA, Mildner AM, Heinrikson RL, Tomasselli AG, Watenpaugh KD (1999). The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure Fold Des*; 7:1135-43.

-
24. Howard AD, Kostura MJ, Thornberry N, Ding GJ, Limjuco G, Weidner J, Salley JP, Hogquist KA, Chaplin DD, Mumford RA (1991). IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31-kDa IL-1 alpha. *J Immunol.*; 1:147(9):2964-9.
 25. Sleath PR, Hendrickson RC, Kronheim SR, March CJ, Black RA (1990). Substrate specificity of the protease that processes human interleukin-1 beta. *J Biol Chem.*; 25:265(24):14526-8.
 26. Cohen GM (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.*; 326:1-16.
 27. Rano TA, Timkey T, Peterson EP, Rotonda J, Nicholson DW, Becker JW, Chapman KT, Thornberry NA (1997). A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1beta converting enzyme (ICE). *Chem Biol*; 4:149-55.
 28. Nicholson DW (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 6:1028-42.
 29. Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA (1994) Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*; 370:270-5.
 30. Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD (1994) Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 betaconverting enzyme a (p20/p10)2 homodimer. *Cell*; 78:343-52.
 31. Thornberry NA, Lazebnik Y (1998). Caspases: enemies within. *Science*; 281:1312-6.
 32. Shi Y (2002 a). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*; 9:459-70.
 33. Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, Wallach D (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*; 9:267-276.
 34. Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J (1998). Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr. Biol.*; 8:1001-1008.

-
35. Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman S A., Lowe SW, Penninger JM, Mak TW (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*; 94:339-352.
 36. Martin SJ, Green DR (1995). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell*; 82:349-52.
 37. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ, Williams LT (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*; 10; 278(5336):294-8.
 38. Gerner C, Gotzmann J, Frohwein U, Schamberger C, Ellinger A, Sauer mann G (2002). Proteome analysis of nuclear matrix proteins during apoptotic chromatin condensation. *Cell Death Differ*; 9: 671-81.
 39. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata SA (1998). caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*; 391:43-50.
 40. Halenbeck R, MacDonald H, Roulston A, Chen TT, Conroy L, Williams LT (1998). CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45. *Curr Biol.*; 8:537-40.
 41. Sakahira H, Enari M, Nagata S (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*; 391:96-9.
 42. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*; 281(5383):1680-3.
 43. Carswell EA, Old LJ, Kassel, Green S, Fiore N, Williamson B. (1997) Anendotoxin-induced factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 72:3666-3670.
 44. Zheng L, Fisher G, Miller RE, Peschon J, Lynch DH, Lenardo MJ (1995). Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature*; 28:377(6547):348-51.
 45. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*; 254:439-59.
 46. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*; 76:959-62.

-
47. Gruss HJ, Dower SK (1995). Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood*; 85:3378-404.
 48. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*; 74:845-53.
 49. Itoh N, Nagata SA (1993). Novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem.*; 268:10932-7.
 50. Nagata S (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*; 88:355-65.
 51. Ashkenazi A, Dixit VM (1998). Death receptors: signaling and modulation. *cience*; 281:1305-8.
 52. Wallach D, Kovalenko AV, Varfolomeev EE, Boldin MP (1998). Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict. *Curr Opin Immunol.*; 10:279-88.
 53. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*; 104:487-501.
 54. Aggarwal BB (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*; 3:745-56.
 55. Beutler B, van Huffel C (1994). Unraveling function in the TNF ligand and receptor Families. *Science*; 264:667-8.
 56. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*; 3:673-82.
 57. Eck MJ, Ultsch M, Rinderknecht E, de Vos AM, Sprang SR(1992). The structure of human lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) at 1.9-A resolution. *J Biol Chem*; 267:2119-22.
 58. Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, Pongstingl H und Krammer PH (1992). Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J. Biol. Chem.*; 267:10709.
 59. McGeehan GM, Becherer JD, Bast RC Jr., Boyer CM, Champion B, Connolly KM, Conway JG, Furdon P, Karp S, Kidao S (1994). Regulation of tumour necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature*; 370:558-61.

-
60. Krammer PH (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*; 407(6805):789-95.
 61. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*; 81: 505-12
 62. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan, AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM(1997a). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*; 276:111-113.
 63. Boldin MP, Goncharov T, Goltsev YV, Wallach D (1996). Involvement ofMACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor induced cell death. *Cell*; 85:803-815.
 64. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer P H, Peter ME (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.*; 14:5579-5588.
 65. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*; 85: 817-827.
 66. Ashkenazi A, Dixit VM (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*; 281:1305-8.
 67. Kurmlier M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J(1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*; 388:190-195.
 68. Srinivasula SM, Ahamad M, Otilie S, Bullrich F, Banks S, Wang Y, Fernandes-Alnemri T, Croce CM, Litwack G, Tomaselli KJ, Armstrong RC, Alnemri ES (1997). FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*; 272:18542-18545.
 69. Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R, Dixit VM (1997). I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*; 272:17255-17257.
 70. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17:1675-1687.

-
71. Stennicke HR, Jurgensmeier JM, Shin H, Deveraux Q, Wolf BB, Yang X, Zhou Q, Ellerby HM, Ellerby LM, Bredesen D, Green DR, Reed JC, Froelich CJ, Salvesen GS (1998). Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem.*; 273(42):27084-90.
 72. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*; 94:491-501.
 73. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*; 94:481-490.
 74. Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*; 12:611-20.
 75. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH, Walczak H (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*; 12:599-609.
 76. Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL, Hofmann K, Kataoka T, Holler N, Tschopp J (1997). TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity*; 7:831-6.
 77. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL, Lyons RH, Garg M, Duan DR, Xing L, Gentz R, Ni J, Dixit VM (1996). Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science*; 274:990-2.
 78. Bodmer JL, Burns K, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Thome M, Bornand T, Hahne M, Schroter M, Becker K, Wilson A, French LE, Browning JL, MacDonald HR, Tschopp J (1997). TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas(Apo-1/CD95). *Immunity*; 6:79-88.
 79. Pan G, Bauer JH, Haridas V, Wang S, Liu D, Yu G, Vincenz C, Aggarwal BB, Ni J, Dixit VM (1998). Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett*; 431:351-6.
 80. Susin SA, Zamzami N, Kroemer G (1998). Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta.*; 1366(1-2):151-65.
 81. Cohen GM (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326:1-16.

-
82. Cryns V, Yuan J (1998). Proteases to die for. *Genes Dev.* 12:1551-1570.
 83. Ferrari D, Stepczynska A, Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K (1998). Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis. *J. Exp. Med.*; 188:979-984.
 84. Wesselborg S, Engels IH, Rossmann E, Los M, Schulze-Osthoff K (1999). Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction. *Blood*; 93:3053-3063.
 85. Belka C, Marini P, Lepple-Wienhues A, Budach W, Jekle A, Los M, Lang F, Schulze-Osthoff K, Gulbins E, Bamberg M (1999). The tyrosine kinase Ick is required for CD95-independent caspase-8 activation and apoptosis in response to ionizing radiation. *Oncogene*; 18:4983-4992.
 86. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*; 94:491-501.
 87. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*; 94:481-490.
 88. Zha J, Weiler S, Oh, KJ, Wei MC, Korsmeyer, SJ (2000). Posttranslational NMyristoylation of BID as a Molecular Switch for Targeting Mitochondria and Apoptosis. *Science*; 290:1761-1765.
 89. Petit PX, Susin SA, Zamzami N, Mignotte B, Kroemer G (1996). Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett*; 396:7-13.
 90. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F (1999). Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem*; 264:687-701.
 91. Li F, Srinivasan A, Wang Y, Armstrong RC, Tomaselli KJ, Fritz, LC (1997). Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. Bcl-xL has activity independent of cytochrome c release. *J. Biol. Chem.*; 272:30299-30305.
 92. Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, Erikson J, Nowell PC, Croce CM (1984). Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science*; 29;224(4656):1403-6.

-
93. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, Korsmeyer SJ (1985). Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell*; 41(3):899-906.
 94. Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*; 335:440-2.
 95. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X (1997b). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*; 275:1129-1132.
 96. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*; 275:1132-1136.
 97. Kroemer G (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat. Med.* 3:614-620.
 98. Reed JC (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature*; 387 :773-776.
 99. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*; 69:217-45.
 100. Puthalakath H, Strasser A (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ*; 9:505-12.
 101. Nguyen M, Millar DG, Yong VW, Korsmeyer SJ, Shore GC (1993). Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem*; 268:25265-8.
 102. Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, Korsmeyer SJ, Shore GC (1998). Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol*; 143:207-15.
 103. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998). Bid, a Bcl2-interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*; 94:481-90.
 104. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*; 91:479-89.

-
105. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*; 94:481-90.
 106. Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettlesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*; 381:335-41.
 107. Antonsson B, Martinou JC (2000). The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res*; 256:50-7.
 108. Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G (1998). Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 95:4386-4391.
 109. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*; 397:441-6.
 110. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*; 410:549-54.
 111. Lu CX, Fan TJ, Hu GB, Cong RS (2003). Apoptosis-inducing factor and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin*; 35:881-5.
 112. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*; 102:33-42.
 113. Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*; 406:855-862.
 114. Srinivasula SM, Datta P, Fan XJ, Fernandes-Alnemri T, Huang Z, Alnemri ES (2000). Molecular Determinants of the Caspase-promoting Activity of Smac/DIABLO and Its Role in the Death Receptor Pathway. *J. Biol. Chem.*; 275:36152-36157.
 115. Srinivasula SM, Hedge R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*; 410:112-116.

-
116. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*; 102:43-53.
 117. Li LY, Luo X, Wang X (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*; 412:95-9.
 118. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000 a). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*; 403:98-103.
 119. Pahl HL, Baeuerle PA (1995). A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. *EMBO J*; 14:2580-8.
 120. Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A (2003). Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci*; 1010:186-94.
 121. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y (2002). An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem*; 277:34287-94.
 122. Deveraux QL, Reed JC (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*; 13:239-52.
 123. Salvesen GS, Duckett CS (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 3:401-10.
 124. Deveraux QL, Reed JC (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*; 13:239-52.
 125. Sun C, Cai M, Meadows RP, Xu N, Gunasekera AH, Herrmann J, Wu JC, Fesik SW (2000). NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J Biol Chem*; 275:33777-81.
 126. Shi Y (2002 b). A conserved tetrapeptide motif: potentiating apoptosis through IAP-binding. *Cell Death Differ*; 9:93-5.
 127. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*; 102:33-42.
 128. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*; 102:43-53.

-
129. Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*; 406:855-62.
 130. Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM (1996). Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat. Med.*; 2:574-577.
 131. Fulda S, Sieverts H, Friesen C, Herr I, Debatin K. M. (1997a). The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res.*; 57:3823-3829.
 132. Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/. *Nature*; 373:438-441.
 133. Ferrari D, Stepczynska A, Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K (1998). Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis. *J. Exp. Med.*; 188:979-984.
 134. Wesselborg S, Engels IH, Rossmann E, Los M, Schulze-Osthoff K (1999). Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction. *Blood*; 93:3053-3063.
 135. Eischen CM, Kottke TJ, Martins LM, Basi GS, Tung JS, Earnshaw WC, Leibson PJ, Kaufmann SH (1997). Comparison of apoptosis in wild-type and Fas resistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. *Blood*; 90:935-943.
 136. Wesselborg S, Engels IH, Rossmann E, Los M, Schulze-Osthoff K (1999). Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction. *Blood*; 93(9):3053-63.
 137. Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasoni L, Bernard A, Mermoud JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*; 277(5324):370-2.
 138. Otter I, Conus S, Ravn U, Rager M, Olivier R, Monney L, Fabbro D, Borner C (1998). Related Articles, Links The binding properties and biological activities of Bcl-2 and Bax in cells exposed to apoptotic stimuli. *J Biol Chem.*; 273(11):6110-20.
 139. Cantley LC (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*; 296(5573):1655-7. Review.

-
140. Mitsiades CS, Mitsiades N, Koutsilieris M (2004). The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development. *Curr Cancer Drug Targets*; 4(3):235-56.
 141. Maehama T, Dixon JE (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem.*; 273(22):13375-8.
 142. Liu Q, Sasaki T, Koziaradzki I, Wakeham A, Itie A, Dumont DJ, Penninger JM (1999). SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival. *Genes Dev.*; 13(7):786-91.
 143. Romashkova JA, Makarov SS (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*; 401(6748):86-90.
 144. Mitsiades CS, Mitsiades N, Koutsilieris M (2004). The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development. *Curr Cancer Drug Targets*; 4(3):235-56.
 145. Potter CJ, Pedraza LG, Huang H, Xu T (2003). The tuberous sclerosis complex (TSC) pathway and mechanism of size control. *Biochem Soc Trans.*; 31(Pt 3):584-6.
 146. Mitsiades CS, Mitsiades N, Koutsilieris M (2004). The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development. *Curr Cancer Drug Targets*; 4(3):235-56.
 147. Lüllmann H, Mohr K (1999). Pharmakologie und Toxikologie. Thieme. 452-461.
 148. Miyashita T, Reed JC (1993). Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood*; 81:151-157.
 149. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE (1993). p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*; 74:957-967.
 150. Strasser A, Harris AW, Jacks T, Cory S (1994). DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell*; 79:329-339.
 151. Yang E, Korsmeyer SJ (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood*; 88:386-401.
 152. Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K (1999). The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity*; 10:629-639.

-
153. Datta R, Banach D, Kojima H, Talanian RV, Alnemri ES, Wong WW, Kufe DW (1996). Activation of the CPP32 protease in apoptosis induced by 1-beta-Darabinofuranosylcytosine and other DNA-damaging agents. *Blood*; 88:1936-1943.
 154. Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM, Gallegos A, Abraham R, Ashendel C, Zalkow L, Matter WF, Dodge J, Grindey G (1994). Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res.*; 54(9):2419-23
 155. Hu L, Zaloudek C, Mills GB, Gray J, Jaffe RB (2000). In vivo and in vitro ovarian carcinoma growth inhibition by a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (LY294002). *Clin Cancer Res.*; 6(3):880-6.
 156. Schultz RM, Merriman RL, Andis SL, Bonjouklian R, Grindey GB, Rutherford PG, Gallegos A, Massey K, Powis G (1995). In vitro and in vivo antitumor activity of the phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor, wortmannin. *Anticancer Res.*; 15(4):1135-9.
 157. Hu Y, Qiao L, Wang S, Rong SB, Meuillet EJ, Berggren M, Gallegos A, Powis G, Kozikowski AP (2000). 3-(Hydroxymethyl)-bearing phosphatidylinositol ether lipid analogues and carbonate surrogates block PI3-K, Akt, and cancer cell growth. *J Med Chem.*; 43(16):3045-51.
 158. Qiao L, Nan F, Kunkel M, Gallegos A, Powis G, Kozikowski AP (1998). 3-Deoxy-D-myo-inositol 1-phosphate, 1-phosphonate, and ether lipid analogues as inhibitors of phosphatidylinositol-3-kinase signaling and cancer cell growth. *J Med Chem.*; 41(18):3303-6.
 159. Omura-Minamisawa M, Diccianni MB, Batova A, Chang RC, Bridgeman LJ, Yu J, de Wit E, Kung FH, Pullen JD, Yu AL (2000). In vitro sensitivity of T-cell lymphoblastic leukemia to UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) is dependent on p16 protein status: a Pediatric Oncology Group study. *Cancer Res.*; 60(23):6573-6.
 160. Graves PR, Yu L, Schwarz JK, Gales J, Sausville EA, O'Connor PM, Piwnicka-Worms H (2000). The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *J Biol Chem.*; 275(8):5600-5.
 161. Cantley LC (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*; 296(5573):1655-7.
 162. Vivanco I, Sawyers CL (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2(7):489-501.

-
163. Eimon PM, Kratz E, Varfolomeev E, Hymowitz SG, Stern H, Zha J, Ashkenazi A (2006). Delineation of the cell-extrinsic apoptosis pathway in the zebrafish. *Cell death differ*; 13 (10): 1619-30.
 164. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-enzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem.*; 269(7):5241-8.
 165. Kozikowski AP, Sun H, Brognard J, Dennis PA (2003). Novel PI analogues selectively block activation of the pro-survival serine/threonine kinase, Akt. *JACS*; 125:1144
 166. Mita MM, Mita A, Rowinsky EK (2003). Mammalian target of rapamycin: a new molecular target for breast cancer. *Clin Breast Cancer*; 4(2):126-37.
 167. Ferrari D, Wesselborg S, Bauer MK, Schulze-Osthoff K (1998). Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis: D. Ferrari, et al.; *J. Exp. Med.*; 188:979.
 168. Wesselborg S, Engels ICH, Rossmann E, Los M, Schulze-Osthoff K (1999). Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction. *Blood*; 93:3053
 169. Schmidt M, Luger N, Pauels HG, Schulze-Osthoff K, Domschke W, Kucharzik T. (2000). IL-10 induces apoptosis in human monocytes involving the CD95 receptor/ligand pathway. *Eur. J. Immunol.*; 30:1769
 170. Nencioni A, Lauber K, Grunebach F, Van Parijs L, Denzlinger C, Wesselborg S, Brossart P (2003). Cyclopentenone prostaglandins induce lymphocyte apoptosis by activating the mitochondrial apoptosis pathway independent of external death receptor signaling. *J Immunol.*; 171(10):5148-56.
 171. Appel S, Mirakaj V, Bringmann A, Weck MM, Grunebach F, Brossart P (2005). PPAR-gamma agonists inhibit toll-like receptor mediated activation of dendritic cells via the MAP kinase and NF-kappaB pathways. *Blood*; 106(12):3888-94
 172. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodid staining and flow cytometry. *J Immunol Methods.*; 39(2):271-9.
 173. Andree HAM, Reutelingsperger CPM, Hauptman R, Hemker HC, Hermens WTh, Willems GM (1990). Binding of vascular anticoagulant a (VACa) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem*; 265:4923.

-
174. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*; 148:2207.
 175. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*; 184:39-51.
 176. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH (1994). Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. *Blood*; 84:1415-1420.
 177. Homburg CH, de Haas M, von dem Borne AE, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos D (1995). Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood*; 85:532-40.
 178. Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S (1996). Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature*; 380(6576):723-6.
 179. Rivett AJ, Savory PJ, Djaballah H (1994). Multicatalytic endopeptidase complex: proteasome. *Methods Enzymol.*; 244:331-50.
 180. Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.*; 65(1-2):55-63.
 181. Cooper TG (1981). eukaryotic genetics and molecular biology. *Nature*; 289(5794):119-20.
 182. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*; 76(9):4350-4.
 183. Brossart P (2002). Dendritic cells in vaccination therapies of malignant diseases. *Transfus Apher Sci.*; 27(2):183-6.
 184. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 73(8):2013-26.
 185. Zimmermann, KC, Bonzon C, Green DR (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*; 92(1):57-70.

-
186. Lincz LF (1998). Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death. *Immunol Cell Biol.*; 76(1):1-19.
 187. Verdegaal E, Hoogstaten C, Sandel M, Kuppen P, Brink A, Claas F, Gorsira M, Graadt van Roggen J, Osanta A (2007). Functional CD8 T-Cells infiltrate into nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer Immunology*; 56 (5): 587-600.
 188. Fogh J, Wright WC, Loveless JD (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst*; 58: 209-214.
 189. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Amstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*; 51 (5): 1417-23.
 190. Samraj AK, Sohn D, Schulze-Osthoff K, Schmitz I (2007). Loss of Caspase-9 Reveals Its Essential Role for Caspase-2 Activation and Mitochondrial Membrane Depolarization. *Molecular Biology of the cell.*; 18: 84-93.
 191. Engels I, Stepczynska S, Stroh C, Lauber K, Berg C, Schwenzler R, Wajant S, Jaenicke RU, Porter AG, Belka C, Gregor M, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S (2000). Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene*; 19: 4563-4573.
 192. Lauber K, Appel H, Schlosser S, Gregor M, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S (2001). The adapter protein apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1) is proteolytically processed during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*; 32:29772-29781.
 193. Nencioni A, Lauber K, Grünebach F, Van Puijs L, Denzlinger C, Wesselborg S, Brossart P (2003). Cyclopentone prostaglandins induce lymphocyte apoptosis by activating the mitochondrial apoptosis pathway independent of external death receptor signaling. *The Journal of Immunology*; 171: 5148-5156.
 194. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK (2005). Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat.Rev.Cancer*, 5:921-929.
 195. Sansal I, Sellers WR (2004). The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J.Clin.Oncol.*; 22:2954-2963.
 196. Shaw RJ, Cantley LC (2006). Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*; 441:424-430.

-
197. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*; 95: 29-39.
 198. Hara S, Oya M, Mizuno R, Horiguchi A, Marumo K, Murai M (2005). Akt activation in renal cell carcinoma: contribution of a decreased PTEN expression and the induction of apoptosis by an Akt inhibitor. *Ann.Oncol.*; 16:928-933.
 199. Sourbier C, Lindner V, Lang H, Agouni A, Schordan E, Danilin S, Rothhut S, Jacqmin D, Helwig JJ, Massfelder T (2006). The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new target in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res.*; 66:5130-5142.
 200. Fujiwara Y, Kawada K, Takano D, Tanimura S, Ozaki K, Kohno M (2006). Inhibition of the PI3 kinase/Akt pathway enhances doxorubicin-induced apoptotic cell death in tumor cells in a p53-dependent manner. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*; 340:560-566.
 201. Fujiwara Y, Hosokawa Y, Watanabe K, Tanimura S, Ozaki K, Kohno M (2007). Blockade of the phosphatidylinositol-3-kinase-Akt signaling pathway enhances the induction of apoptosis by microtubule-destabilizing agents in tumor cells in which the pathway is constitutively activated. *Mol.Cancer Ther.*; 6:1133-1142.
 202. Krystal, GW, Sulanke G, Litz J (2002). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling blocks growth, promotes apoptosis, and enhances sensitivity of small cell lung cancer cells to chemotherapy. *Mol.Cancer Ther.*; 1:913-922.
 203. Martelli AM, Tazzari, PL, Tabellini G, Bortul R, Billi AM, Manzoli L, Ruggeri A, Conte R, Cocco L (2003). A new selective AKT pharmacological inhibitor reduces resistance to chemotherapeutic drugs, TRAIL, all-trans-retinoic acid, and ionizing radiation of human leukemia cells. *Leukemia*; 17:1794-1805.
 204. Poh TW, Huang S, Hirpara JL, Pervaiz S (2007). LY303511 amplifies TRAIL-induced apoptosis in tumor cells by enhancing DR5 oligomerization, DISC assembly, and mitochondrial permeabilization. *Cell Death.Differ.*; 14(10):1813-25.
 205. Rahmani M, Yu C, Reese E, Ahmed W, Hirsch K, Dent P, Grant S (2003). Inhibition of PI-3 kinase sensitizes human leukemic cells to histone deacetylase inhibitor-mediated apoptosis through p44/42 MAP kinase inactivation and abrogation of p21(CIP1/WAF1) induction rather than AKT inhibition. *Oncogene*; 22:6231-6242.

-
206. Shingu T, Yamada K, Hara N, Moritake K, Osago H, Terashima M, Uemura T, Yamasaki T, Tsuchiya M (2003). Synergistic augmentation of antimicrotubule agent-induced cytotoxicity by a phosphoinositide 3-kinase inhibitor in human malignant glioma cells. *Cancer Res.*; 63:4044-4047, 2003.
207. Uchida M, Iwase M, Takaoka S, Yoshida S, Kondo G, Watanabe H, Ohashi M, Nagumo M, Shintani S (2007). Enhanced susceptibility to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells treated with phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *Int.J.Oncol.*; 30:1163-1171.
208. Curti, BD (2004). Renal cell carcinoma. *JAMA*; 292:97-100.
209. Gnarra JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, Latif F, Liu S, Chen F, Duh FM (1994) . Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat.Genet*; 7: 85-90.
210. Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG Jr (1995). Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat.Med.*; 1:822-826.
211. Turner KJ, Moore JW, Jones A, Taylor CF, Cuthbert-Heavens D, Han C, Leek RD, Gatter KC, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Cranston D, Harris AL (2002). Expression of hypoxia-inducible factors in human renal cancer: relationship to angiogenesis and to the von Hippel-Lindau gene mutation. *Cancer Res.*; 62:2957-2961.
212. Wiesener MS, Munchenhagen PM, Berger I, Morgan NV, Roigas J, Schwartz A, Jurgensen JS, Gruber G, Maxwell PH, Loning SA, Frei U, Maher E., Grone HJ, Eckardt KU (2001). Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal carcinomas. *Cancer Res.*; 61:5215-5222.
213. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawski E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IG, Barbarash O, Gokmen E, O'Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ (2007). Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N.Engl.J.Med.*; 356:2271-2281.
214. Cho D, Signoretti S, Regan M, Mier JW, Atkins MB (2007). The role of mammalian target of rapamycin inhibitors in the treatment of advanced renal cancer. *Clin.Cancer Res.*; 13:758-763.
215. Hidalgo M, Rowinsky EK (2000). The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene*; 19:6680-6686.

-
216. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*; 307: 1098-1101.
217. Nencioni A, Lauber K, Grunebach F, Brugger W, Denzlinger C, Wesselborg, Brossart P (2002). Cyclopentenone prostaglandins induce caspase activation and apoptosis in dendritic cells by a PPAR-gamma-independent mechanism: regulation by inflammatory and T cell-derived stimuli. *Exp.Hematol.*; 30:020-1028.
218. Brenner W, Farber G, Herget T, Lehr HA, Hengstler JG, Thuroff JW (2002). Loss of tumor suppressor protein PTEN during renal carcinogenesis. *Int.J.Cancer*; 99:53-57.
219. Brugarolas JB, Vazquez F, Reddy A, Sellers WR, Kaelin WG Jr. (2003). TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and -independent pathways. *Cancer Cell*; 4:147-158.
220. El Hashemite N, Walker V, Zhang H, Kwiatkowski DJ (2003). Loss of Tsc1 or Tsc2 induces vascular endothelial growth factor production through mammalian target of rapamycin. *Cancer Res.*; 63:5173-5177.
221. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT (2002). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol.Cell Biol.*; 22:7004-7014.
222. Parry L, Maynard JH, Patel A, Clifford SC, Morrissey C, Maher ER, Cheadle JP, Sampson JR (2001). Analysis of the TSC1 and TSC2 genes in sporadic renal cell carcinomas. *Br.J.Cancer*; 85:1226-1230.
223. Motzer RJ, Bukowski RM (2006). Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.*; 24:5601-5608.
224. Shinjima T, Ova M, Takayanagi A, Mizuno R, Shimizu N, Murai M (2007) Renal cancer cells lacking hypoxia inducible factor (HIF)-1alpha expression maintain vascular endothelial growth factor expression through HIF-2alpha. *Carcinogenesis*; 28(3):529-36.
225. www.cellsignal.com/reference/pathway/Inhib_Apop.asp (2005)

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AIDS *acquired immune deficiency syndrom*

AIF *Apoptosis-Inducing Factor*

AK *Antikörper*

AKT/PKB *Proteinkinase B*

AMC *Aminomethylcumarin*

ANT *Adeninnukleotid-Translokator*

Apaf-1 *Apoptotic Protease-Activating Factor-1*

APO *Apoptosis Antigen*

ATP *Adenosin-Triphosphat*

Bad *Bcl-2 Antagonist of Cell Death*

Bak *Bcl-2 Homologous Antagonist / Killer*

Bax *Bcl-2 Associated X Protein*

Bcl-2 *B Cell Lymphoma/Leukemia- 2*

Bfl-1 *Bcl-2 Homologue Isolated from a Human Fetal Liver*

BH-Domäne *Bcl-2-Homologie-Domäne*

Bid *BH3 Interacting Domain Death Agonist*

Bik *Bcl-2 Interacting Killer*

Bim *Bcl-2 Interacting Mediator of Cell Death*

BIR *Baculoviral IAP Repeat*

Blk *Bik-Like Killer Protein*

CAD *Caspase-activated DNase*

CARD *Caspase Recruitment Domain*

Casp *Caspase*

Caspase *Cysteiny-Aspartat-spezifische Proteinase*

CD *Cluster of Differentiation*

CD95L *CD95-Ligand*

CDC 27 *cell-division cycle 27*

CED *Cell Death Protein*
CHAPS 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CHOP *C/EBP homology protein*
CPP32 *Cysteine Protease 32*
dATP *Desoxyadenosintriphosphat*
Daxx *Fas Death Domain-Associated Protein*
DcR *Decoy Receptor*
DD *Todesdomäne (Death Domain)*
DED *Todeseffektordomäne (Death Effector Domain)*
DEVD-AMC *N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Aminomethylcumarin*
DIABLO *Direct IAP Binding Protein with Low pI*
DISC *Todessignal-Komplex (Death Inducing Signaling Complex)*
DMSO *Dimethylsulfoxid*
DN *dominant-negativ*
DNA *Desoxyribonucleinsäure*
DR *Todesrezeptor (Death Receptor)*
DTT *Dithiothreitol*
ECL *Enhanced Chemoluminescence*
EDTA *Ethylendiamintetraessigsäure*
EGF *epidermal growth factor*
EGTA *Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure*
ELISA *Enzyme linked Immunosorbent Assay*
ER *Endoplasmatisches Retikulum*
FACS *Fluorescence Activated Cell Sorting*
FADD *Fas-Associating Protein with Death Domain (MORT1)*
Fas *Fibroblast Associated Antigen*
FCS *fötales Kälberserum (fetal calf serum)*
FL *Fluoreszenz-Kanal*
FLICE *FADD-like ICE*
FLIP *FLICE Inhibitory Protein*
FSC *Forward Scatter*
FU *Fluorescence Unit*

GADD153 *growth arrest DNA-damage 153*
GFP *Grün-fluoreszierendes Protein*
GST *Glutathion-S-Transferase*
HEPES *N-2-Hydroxyethylpiperazin-N2'-Ethansulfonsäure*
HDM2 *humanes Homolog des murinen mdm2-Gens*
HIF1 α *hypoxia inducible factor 1, alpha subunit*
IAP *Inhibitor of Apoptosis Protein*
ICAD *Inhibitor of CAD*
ICE *Interleukin-1 β -Converting Enzyme*
I-FLICE *Inhibitor of FLICE*
IL *Interleukin*
kD *Kilodalton*
MACH *MORT-Associated CED-3 Homologue*
MAPK *mitogen activated protein kinase*
Mch *Mammalian CED-3 Homologue*
Mcl-1 *Myeloid Cell Leukemia Sequence 1*
MORT1 *Mediator of Receptor Induced Toxicity 1*
mTOR *mammalian target of rapamycin*
MTT *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
NADH *Nicotinamid-AdeninDinucleotid-Hydroeen*
NADPH *Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat-Hydroeen*
NF- κ B *nuclearfactor kappa-B*
NGF *nerve growth factor*
NIAP *Neuronal IAP*
NK-Zellen *Natural Killer Cells*
NP-40 *Nonidet P40, Nonylphenoxypolyethoxyethanol*
NZK *Nierenzellkarzinom*
PARP *Poly(ADP-Ribose)Polymerase*
PBS *Phosphate Buffered Saline*
PCD *programmed cell death*
PDGF *platelet-derived growth factor*
PI *Propidiumiodid*

PI(3)K *Phosphatidylinositol-3-Kinase*
PIP3 *Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat*
PLAD *Pre-Ligand Assembly Domain*
PMSF *Phenylmethylsulfonylfluorid*
PS *Phosphatidylserin*
PT *Permeabilitätstransitions-Poren*
PTEN *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosom 10*
ROS *Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)*
Rpm *rotations per minute*
SDS *Natriumdodecylsulfat*
SDS-PAGE *SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese*
Smac *Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase*
STAT1 *signal transduction and activator of transduction factor 1*
TEMED *Tetramethylethylenediamine*
TBS *Tris Buffered Saline*
TGF *transforming growth factor*
TNF *Tumornekrose-Faktor*
TRADD *TNF Receptor-Associated Death Domain Protein*
TRAIL *TNF-Related Apoptosis-Inducing Factor*
TRAIL-R *TRAIL-Rezeptor*
TRAMP *TNF Receptor-Related Apoptosis Mediating Protein*
TRID *TRAIL Receptor without an Intracellular Domain*
Tris *Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan*
TSC *tuberous sclerosis complex*
VDAC *voltage-dependent anion channel*
VEGI *vascular endothelial cell-growth inhibitor*
VEGF *vascular endothelial growth factor*
VHL-Gen *Von-Hippel-Lindau-Gen*
X-IAP *X-linked IAP*
zVAD-fmk *Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluormethylketon*

8.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1:** Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen in apoptotischen Zellen
- Abb. 1.2:** Die Familie der humanen Caspasen
- Abb. 1.3:** Aktivierung der Caspasen am Beispiel der Caspase-3
- Abb. 1.4:** CD 95–Signalweg
- Abb. 1.5:** Regulation der Apoptose über den Mitochondrien-Signalweg
- Abb. 1.6:** Mitglieder der Bcl-2-Familie
- Abb. 1.7:** Die Bedeutung des PI(3)K/AKT-Kinaseweges
- Abb. 2.1:** Prinzip des Durchflusszytometers
- Abb. 2.2:** exemplarische FACS-Kernfragmentierung
- Abb. 2.3:** exemplarische Annexin V- / PI-Färbung
- Abb. 3.1:** Reduktion der Sekretion von autokrinen Wachstumsfaktoren beim Nierenzellkarzinom infolge PI(3)K-Inhibition mittel LY294002
- Abb. 3.2:** LY294002 und Rapamycin bewirken eine reduzierte Expression von RelB und HIF1 α
- Abb. 3.3:** Apoptose-Induktion und Caspase-Aktivierung durch LY294002 und Rapamycin
- Abb. 3.4:** Die Inhibition der Signaltransduktion über FADD und Caspase-8 hat keinen Einfluss auf die durch LY294002 vermittelte Apoptose
- Abb. 3.5:** Phosphatidylserin-Exponierung und reduzierte Zellviabilität unter Behandlung mit LY294002
- Abb. 3.6:** Die Inhibition des PI(3)K/AKT-Signalweges führt zur Spaltung von PARP und Aktivierung von Caspase-8 und –9
- Abb. 3.7:** Apoptose infolge PI(3)K-Inhibition wird durch eine Überexpression von Bcl-2 oder eine Defizienz an Caspase-9 verhindert
- Abb. 3.8:** Eine Überexpression von Bcl-2 oder eine Defizienz an Caspase-9 inhibiert die LY294002-vermittelte Caspase-Aktivierung
- Abb. 3.9:** PI(3)K-Inhibitoren steigern die TRAIL- und Etoposid-induzierte Apoptose in Jurkat-Zellen

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Caspase-Substrate

Tabelle 2.1: Geräte

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.3: Reagenzien

Tabelle 2.4: 1.AK Western Blot

Tabelle 2.5: 2.AK Western Blot

Tabelle 2.6: Medien und Lösungen

Tabelle 2.7: Kits

Tabelle 2.8: Verwendete Tumorzelllinien

8.4 Danksagung

PD Dr. med. Peter Brossart danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, die Ermöglichung dieser Arbeit, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, dafür dass er immer ein offenes Ohr für alle Fragen hatte und mich mit seiner Begeisterung für die Forschung anstecken konnte.

Dr. rer. nat. Marco Henkel und Dipl. biol. Karin von Schwarzenberg für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und die geduldige Hilfe bei deren Interpretation.

Dr. rer. nat. Kirsten Lauber für die vielen Erklärungen, Ratschläge und Ermunterungen.

Herrn Prof. Dr. Wesselborg danke ich für viele wertvolle Tips während der Anfertigung dieser Arbeit.

Bei Frau Dr. Silke Appel, Dipl. Biochem. Anita Bringmann, Dipl. biol. Katharina Brauer und Herrn Dipl. Biochem. Markus Weck bedanke ich mich herzlich für zahlreiche praktische Anregungen und motivierende Gespräche.

Sylvia Stephan, Bruni Schuster und Tina Hörnle für die technische Unterstützung, die gute Organisation des Labors und die stets gute Stimmung.

Ich danke dem Graduiertenkolleg "Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter Prozesse,794" für die freundliche Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Mein Dank gilt darüber hinaus allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Immuntherapie für das angenehme Arbeitsklima im Labor.

8.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Dennis Nicolas Conzelmann
Geburtsdatum	21. September 1979
Nationalität	Deutsch

Studium und Schulausbildung

Seit 10/07	Assistenzarzt am Olgahospital Stuttgart, Abteilung für Pädiatrie
07/07 – 09/07	Assistenzarzt an der Kinderklinik Ravensburg, Abteilung für Pädiatrie
05/06/07	3. Staatsexamen; Note: 2,0
12/06 – 03/07	Praktisches Jahr im Universitätsspital Zürich, Abteilung für Innere Medizin
08/06 – 12/06	Praktisches Jahr im Olgakrankenhaus des Klinikums Stuttgart, Abteilung für Pädiatrie
04/06 – 08/06	Praktisches Jahr im Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, U.S.A, Abteilung für onkologische Chirurgie
03/06	2. Staatsexamen; Note: 1,6

10/04 – 07/07	Stipendiat des Grauiertenkollegs Tübingen „Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter Prozesse“, GK794
Seit 03/04	Doktorarbeit, Arbeitsgruppe Immuntherapie, Medizinische Klinik Universität Tübingen. (gefördert durch das Graduiertenkolleg 794)
12/03 – 05/04	Brown University Medical School, Providence, U.S.A (Auslandssemester, gefördert durch die Landesstiftung Baden-Württemberg)
09/03	1. Staatsexamen; Note: 2,0
09/02	Physikum; Note: 2,0
10/00	Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen Beginn des Studiums der Humanmedizin
09/99 - 08/00	Zivildienst, Deutsches Rotes Kreuz Tübingen
08/90 - 07/99	Allgemeines Gymnasium, Albstadt-Ebingen Abitur; Note: 1,7