

Identifizierung eines neuen Apoptosesignalweges in chemotherapeutikaresistenten Tumorzellen

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

2006

vorgelegt von

Joachim Manns

Die vorliegende Arbeit wurde unter Betreuung von Prof. Dr. S. Laufer an der Universitätsklinik Tübingen (Medizinische Klinik, Abteilung Innere Medizin I, Gastrologische Forschungssektion, Labor Prof. Dr. S. Wesselborg) in der Zeit vom März 2002 bis Juni 2006 angefertigt.

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2006

Dekan: Prof. Dr. Stefan Laufer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Sebastian Wesselborg

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Laufer

DANKSAGUNG

An dieser Stelle geht mein Dank an alle, die mich vor und während der Dissertation tatkräftig unterstützt haben.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Sebastian Wesselborg für die Ermöglichung dieser Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und stetige fachliche Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich Prof. Dr. Stefan Laufer danken für die freundliche und spontane Bereitschaft die Arbeit zu betreuen und die freizügige Weitergabe von experimentellen Substanzen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Christian Peifer und Prof. Dr. G. Dannhardt für die Überlassung von einer Vielzahl von Substanzen zur Testung in meinen Zellsystemen.

Ein aufrichtiger Dank geht auch an Dr. Ingo Engels, der mich über das Phosphorylierungsgeschehen in der Apoptose so umfassend informierte.

Für die Überlassung von Zelllinien danke ich besonders PD Dr. Claus Belka und seinem Labor.

Der unkomplizierten Übernahme der Proteinsequenzierung durch Dr. Alexander Beck gebührt ein besonderer Dank.

Vielen Dank auch an meine Mitstreiter im Labor: Christoph Peter, Sabi Sörös, Michaela Waibel, PD Dr. Gerburg Stein, Kirsten Lauber, Marco Henkel und Merle Daubrawa. Danke für die tatkräftige und schöne Zeit im Labor und die Zeit dazwischen.

Im Einzelnen möchte ich Christoph danken für die differenzierte Auseinandersetzung mit den vielfältigen Problemen des Laboralltags („Das ist eine Bande!“) und die Möglichkeit zur Teilhabe an seinem önologischen Sachverstand.

Danke an Sabi für die schöne, wenn auch zu kurze Zeit im Labor. Luigi wartet.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Eltern und die Familie, die mich stets hilfsbereit unterstützten und ein „ruhender Pol“ in dieser Zeit waren.

Ganz besonders möchte ich aber Silke danken. Sie ist in der Zeit immer für mich da gewesen und hat Laborfrust einfach „weggelächelt“.

DANKE

INHALTSVERZEICHNIS

1	<i>Einleitung</i>	5
1.1	Caspasen und ihre Substrate (Caspasen als Effektoren der Apoptose) ...	7
1.2	Die bekannten Signalwege der Apoptose	11
1.3	Extrinsische Signalwege	13
1.3.1	Todesrezeptorsignalweg.....	13
1.4	Intrinsische Signalwege	16
1.4.1	Der mitochondriale Apoptoseweg und das Apoptosom.....	16
1.4.2	Der ER-Stress Signalweg.....	18
1.4.3	Das PIDDosom.....	19
1.4.4	Der Apaf-1 unabhängige, Bcl-2 inhibierbare Signalweg über Caspase-7.	20
1.5	Regulationsmechanismen in der Apoptose	22
1.5.1	Die Bcl-2-Proteinfamilie	22
1.6	Der PI3K-Akt/PKB-Überlebenssignalweg	25
1.6.1	Die IAP-Proteinfamilie	27
1.6.2	Posttranslationale Regulationen - Rolle von Proteinkinasen und Phosphatasen in der Apoptose	27
1.6.3	Staurosporin und Staurosporinderivate	29
1.6.4	Rolle von Kinaseinhibitoren in der klinischen Anwendung	32
2	<i>Fragestellung</i>	34
3	<i>Material + Methoden</i>	35
3.1	Materialien	35
3.1.1	Reagenzien - Herstellerverzeichnis.....	35
3.1.2	Antikörper	36
3.2	Methoden	38
3.2.1	Zellbiologische Methoden.....	38
3.2.2	Zellbiologische Nachweismethoden des Zelltods.....	42
3.2.3	Biochemische Methoden.....	47
3.2.4	Biochemische Nachweismethoden der Apoptose	53
4	<i>Ergebnisse</i>	62
4.1	JM319-Jurkatzellen sind Chemotherapeutika-resistent und Staurosporin-sensitiv	62
4.2	Untersuchungen zur Beteiligung der verschieden bekannten Apoptose-Signalwege an der Staurosporin-induzierten Apoptose	68
4.2.1	Extrinsischer Todesrezeptorsignalweg.....	68
4.2.2	Untersuchungen zur Beteiligung der verschiedenen bekannten intrinsischen Signalwege an Staurosporin-induzierter Apoptose	70
4.3	Wirkung der Bcl-2-Familienmitglieder auf die Staurosporin-induzierte Apoptose	77
4.3.1	Untersuchungen zur Rolle von Bcl-2 in der Staurosporin-induzierten Apoptose	77
4.3.2	Untersuchungen zur Rolle von Bcl-X _L in der Staurosporin-induzierten Apoptose	89

4.3.3	Untersuchungen zur Rolle von Bax in der Staurosporin-induzierten Apoptose ..	92
4.4	Beteiligung von Proteinen mit Apoptosombezug in der Staurosporin-induzierten Apoptose.	93
4.4.1	Apaf-1.....	94
4.4.2	Caspase-9	102
4.5	Suche nach Apoptosom-ähnlichen hochmolekularen Komplexen in der Caspase-9-Aktivierung	117
4.6	Caspase-9— Identifizierung der Interaktionspartner.....	120
4.7	Untersuchungen zur Identifizierung von durch Staurosporin inhibierten Kinasen in der Apoptose.....	122
4.7.1	Literaturbekannte Kinaseinhibitoren.....	122
4.7.2	Staurosporinanaloga mit Pyrrolidingerüst.....	129
5	<i>Diskussion</i>.....	<i>130</i>
5.1	Bekannte Signalwege der Apoptose.....	131
5.1.1	Todesrezeptorsignalweg.....	131
5.1.2	PIDDosom.....	131
5.1.3	ER-Signalweg.....	131
5.1.4	Bcl-2-Familienmitglieder und ihr Einfluss auf die Staurosporin-induzierte Apoptose.....	132
5.1.5	Apoptosom	133
5.2	Zentrale Rolle der Phosphorylierung in der Apoptose	136
5.2.1	PKB/Akt-abhängige Apoptose ist nicht mit Staurosporin-induzierten Apoptose identisch	137
5.2.2	Wirkung von Staurosporin auf die Phosphorylierung/Kinasen.....	138
5.2.3	Caspase-9-Phosphorylierung zur Aktivitätssteuerung	138
5.2.4	Kinaseinhibitoren	140
5.3	Bindungspartner von Caspase-9.....	141
5.4	Hochmolekularer Caspase-9-Komplex	142
5.5	Ausblick.....	143
6	<i>Zusammenfassung</i>.....	<i>144</i>
7	<i>Literatur</i>	<i>148</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Tabelle 1: verwendete Abkürzungen

μ	Mikro (10^{-6})	BRCA-1	Breast Cancer 1
A1	Bcl-2-related protein A1	BSA	Rinderserumalbumin
Akt	(= PKB)	c-Abl	Tyrosinkinase, zelluläres Homolog eines Onkogens des Abelson Maus Leukämie Virus
AMC	Aminomethylcumarin	CAD	Caspase Activated DNase
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1	CARD	Capsize Activation and Recruitment Domain
APS	Ammoniumperoxodisulfat	Casp	Caspase
ATP	Adenosintriphosphat	Caspase	Cystein-Protease mit Aspartat-Spaltspezifität
ATRA	All Trans Retinoic Acid	CD	Cluster of Differentiation
Bad	Bcl-2 Antagonist of Cell Death	CD95	APO-1, Fas
Bak	Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer	CD95L	CD95 Ligand
Bax	Bcl-2 Associated X Protein	CDK	Cyclin Dependent Kinase
Bcl-2	B Cell Lymphoma/ Leukemia-2	CED	Cell Death Protein (<i>C. elegans</i>)
BCR	Breakpoint Cluster Region	CHAPS	(3-([3-Cholamidopropyl]- dimethyl-ammonium)-1- propansulfonat
bcr-Abl	Fusionsprotein aus BCR und c-Abl (bei CML)	CHOP	C/EBP-homologous Protein
BH-Dom.	Bcl-2-Homologie-Domäne	CML	chronische myeloide Leukämie
Bid	BH3 Interacting Domain Death Agonist	CPD	Substanznummerierung (Christian Peifer Dissertation)
Bik	Bcl-2 Interacting Killer	Da	Dalton
Bim	Bcl-2 Interacting Mediator of Cell Death	dATP	Desoxyadenosintriphosphat
BIR	Baculoviral IAP Repeat	DD	Todesdomäne (<i>Death Domain</i>)
Bis-I	Bisindoylmaleimid-I	DED	Todeseffektordomäne (<i>Death Effector Domain</i>)
Blk	Bik-Like Killer Protein		
Bok	Bcl-2-Related Ovarian Killer		
Boo	Bcl-2 Homologue of Ovary		

DEVD-AMC	N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Aminomethylcumarin	FLAG	Epitop (N-DYKDDDDK-C)
DFF45	DNA Fragmentation Factor	FLICE	FADD-Like Ice
DIABLO	Direct IAP Binding Protein with Low pI	FOXO	Forkhead Box 3 A
DISC	Todessignal-Komplex (<i>Death Inducing Signaling Complex</i>)	FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	FSC	Forward Scatter
DMSO	Dimethylsulfoxid	FU	Fluorescence Unit
DNA	Desoxyribonukleinsäure	G418	(= Geneticin [®]), Aminoglykosid-Antibiotikum (Neomycin-ähnl.)
DTT	Dithiothreitol	GADD153	Growth Arrest- and DNA Damage-inducible Gene
ECL	Enhanced Chemiluminescence	GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure	GβL	G beta L
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	h	Stunde(n)
EGTA	Ethylen-bis-(oxyethylen-nitrilo)-tetraessigsäure	HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N2'-Ethansulfonsäure
EndoG	Endonuklease G	Hrk	HARAKIRI
ER	Endoplasmatisches Retikulum	HRP	Meerrettich Peroxidase
ERK	Extra Cellular Signal-regulated Kinase	Htr	Htr2A, Serin Protease
Etopo	Etoposid	Htr2A	Htr Serin Peptidase 2
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter	IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
FADD	<i>Fas-Associating Protein with Death Domain</i> (MORT1)	ICE	<i>Interleukin-1β-Converting Enzyme</i>
Fas	Fibroblast Associated Antigen	IgG	Immunglobulin G
FCS	Fötale Kälberserum	IKK	IκB Kinase
FKHR-L1	Forkhead Transcription Factor	IL	Interleukin
FL	Fluoreszenzkanal	IκB	NFκB Inhibitor A
		JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
		kb	Kilobasen
		kDa	Kilodalton

l	Liter	Omi	mitochondriale Serin-Protease (= Htr, Htr2A, PRSS25)
LC-MS	Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy	PAA	Polyacrylamid
m	Milli (10^{-3})	PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
M	Molarität, molar	PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase	PCR	Polymerase Kettenreaktion
Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia 1	PDK1	<i>3-prime-dependent kinase-1</i>
MDR	Multi Drug Resistance	PI	Propidiumiodid
MEF	murine embryonale Fibroblasten	PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
MEK	Mitogen-activated Protein Kinase Kinase	PIDD	p53-induced Protein with Death Domain
MES	Morpholino-Ethansulfonsäure	PIP2	Phosphoinositol-3,4-diphosphat
min	Minute(n)	PIP3	Phosphoinositol-3,4,5-triphosphat
Mito	Mitomycin C	PKA	Protein Kinase A
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure	PKB	Protein Kinase B (= Akt)
mRNA	<i>Messenger RNA</i>	PKC	Protein Kinase C
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin	PKC $_{\zeta}$	PKC (Isoform ZETA)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid	PMSF	Phenylmethyl-sulfonylfluorid
n	nano	PP2A	Protein Phosphatase 2A
NAD	Nicotinamid Adenin Dinucleotid	PS	Phosphatidylserin
NADH	NAD, hydriert	PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
NF- κ B	nukleärer Faktor kappaB	Puma	p53-upregulated Modulator of Apoptosis
NGFR	Nerve Growth Factor Receptor	PVDF	Polyvinylidendifluorid
Noxa	PMA-induced protein 1	Raf-1	Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1
NP-40	Nonidet P-40, Nonylphenoxypolyethoxyethanol		
OD	Optische Dichte		

RAIDD	RIP-associated ICH1/CED3-homologous Protein with DD	TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Factor
Ras	Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog	TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
RICTOR	Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
RLU	Relative Lumineszenzeinheiten	Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol, Polyethylenglycol-p-isooctylphenolether
RNA	Ribonukleinsäure	Tyr	Tyrosin
rpm	Umdrehungen pro Minute	U	Enzymeinheit
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	UCN-01	7-Hydroxy-Staurosporin
rRNA	Ribosomale RNA	V	Volt
rsk2	ribosomale S6 Kinase 2	VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase	vol	Volumeneinheit
s	Sekunde	vt	Vektor
SAHA	Suberoyl-3-amino-pyridineamide Hydroxamic Acid.	W	Watt
SDS	Natriumdodecylsulfat	X-IAP	X-Linked IAP
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	zVAD-fmk	Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketon
Ser	Serin	$\Delta\psi_m$	Abnahme des mitochondrialen Membran potentials
Smac	Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase	AIF	Apoptosis Inducing Factor
tBid	truncated Bid		
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin		
Thr	Threonin		
TMRE	Tetramethylrhodamin-ethylester		
TNF	Tumornekrose-Faktor		
TRAF	TNF Receptor Associated Factor		

1 Einleitung

In mehrzelligen Organismen stellt der Zelltod den natürlichen Gegenspieler zur Zellproliferation dar. Drei Formen des Zelltodes werden unterschieden: die Nekrose, Autophagie und Apoptose. Nekrose zeigt einen schnellen Verlust der Plasmamembranintegrität und die Abgabe von Zellinhalten in die Umgebung. Autophagie zeichnet sich durch die Bildung von autophagozytierenden Vakuolen im Zytoplasma sterbender Zellen aus.

Die Apoptose ist ein Selbstmordprogramm in einer jeden Zelle, mit dem innerhalb weniger Stunden jede Körperzelle desintegriert und eliminiert werden kann. Nach dem Zelltod schließt sich das Entfernen der Zellüberreste durch Phagozyten an. Die detaillierte Beschreibung der morphologischen und biochemischen Veränderungen während der Apoptose erfolgte erstmals 1972 durch Kerr et al. [1]. 1977 wurden beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* durch Mutationsversuche die Gene identifiziert, welche zu Entwicklungsstörungen durch Apoptosefehler führen [2].

Die physiologischen Bedeutungen der Apoptose liegen in der Embryonalentwicklung, der Morphogenese, in der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase in Zellverbänden, der Elimination von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen und der Regulation des Immunsystems durch die klonale Deletion autoreaktiver Thymozyten und der Herunterregulation der Immunantwort [3, 4] und dient dem Erhalt des Gesamtorganismus. Im menschlichen Körper findet millionenfach Apoptose zur Erhaltung der Körperfunktionen statt (z.B. Regulation der T-Zell-Klonierung, Darmepithelabschilferung, Entfernung gealterter Erythrozyten). Die Mechanismen der Apoptose sind ein evolutionär früh angelegtes Konzept, dessen Signalkomponenten von *Caenorhabditis elegans*, über *Drosophila* bis hin zum Säugersystem evolutionär konserviert ist [5]. Neuere Untersuchungen an *Saccharomyces cerevisiae* zeigen bei Einzellern einen apoptoseähnlichen Zelltod, wobei überraschenderweise eine Einzellerpopulation von der Apoptose einzelner Zellen profitiert [6, 7].

Kommt es zu einer Störung in der Zellhomöostase durch eine erhöhte oder erniedrigte Apoptoserate, entstehen verschiedene Krankheiten [8, 9]. Eine überschießende Apoptose führt zur Verringerung der Zellzahl und eine zu geringe Apoptoserate zur Zellzahlerhöhung. Typische für die erstgenannte Regulationsstörung sind AIDS (viral induzierter Niedergang der T-Helferzellen) [10], Hepatitis (viral induzierter Untergang von Lebergewebe) [11] und Neurodegenerationskrankheiten (Multiple Sklerose [12], Alzheimer'sche Erkrankung [13],

Parkinson'sche Erkrankung [14]). Eine zu geringe Apoptoserate findet sich bei Tumorerkrankungen [15] und diversen Autoimmunerkrankungen (Lupus erythematoses, rheumatoide Arthritis) [16, 17].

Der physiologische Ablauf von Apoptose zeichnet sich durch verschiedene Prozesse aus [18]. Die zu beobachtenden Veränderungen sind Zellschrumpfung, eine Kondensation des Chromatins und eine Aktivierung von Endonucleasen, die die Kern-DNA zwischen den Nucleosomen in Fragmente von ca. 200 Basenpaaren Länge, bzw. ein Vielfaches davon fragmentiert. Des Weiteren zeigt sich ein Verlust des asynchronen Aufbaus der Zellmembran. Die apoptotische Zelle stülpt letztlich ihren Zellinhalt in Membranabschnürungen nach außen, dies wird „Blebbing“ genannt. Diese apoptotischen Körperchen haben die wichtige Aufgabe, den Zellinhalt der apoptotischen Zelle nicht unkontrolliert in das umliegende Gewebe gelangen zu lassen. Während der Nekrose wird der Zellinhalt ins umliegende Gewebe freigesetzt und löst Entzündungsreaktionen hervor. Die gebildeten Vesikel werden von Phagozyten und umliegenden Zellen erkannt und entfernt [19, 4, 20]. Findet dieses „Aufräumen“ nicht statt, so endet die Zelle letztlich sekundär-nekrotisch: Die Membranintegrität der Vesikel kann nicht weiter aufrechterhalten werden. Die Zellinhaltsstoffe werden freigesetzt und es folgt eine Entzündungsreaktion analog zum (primär-) nekrotischen Zelltod [21, 22].

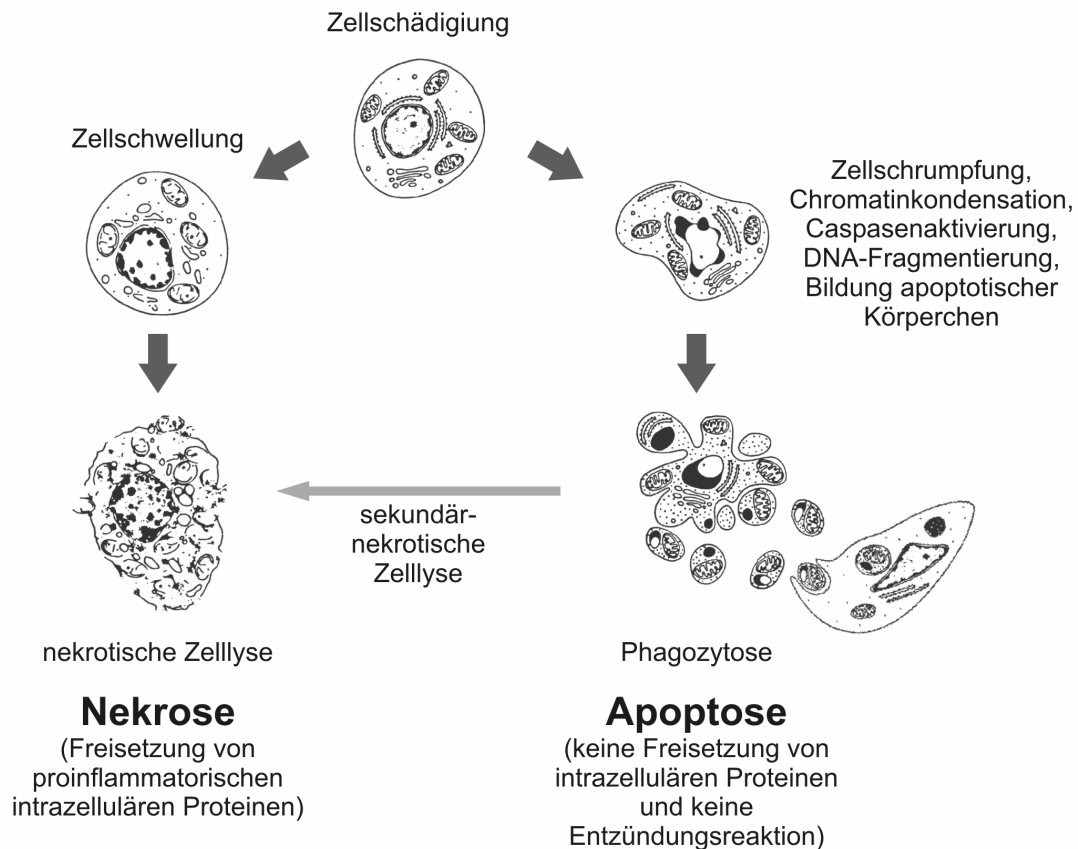


Abbildung 1: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen während der Apoptose.

Während der Apoptose schrumpft die Zelle, Zytoplasma und Zellkern werden kondensiert. Anschließend wird der Zellkern fragmentiert und die Zelle zerfällt in kleine, membranumschlossene Vesikel, die apoptotischen Körperchen. Diese werden schließlich von benachbarten Zellen oder von professionellen Phagozyten internalisiert und abgebaut. (Nach: [23])

Die morphologischen und biochemischen Merkmale der Apoptose sind durch die von den Caspasen gespaltenen Substrate charakterisiert. Die Aktivierung der Caspasekaskade ist daher der zentrale Mechanismus der Apoptose.

1.1 Caspasen und ihre Substrate (Caspasen als Effektoren der Apoptose)

Viele apoptotische Stimuli bewirken in der Zelle letztlich die Aktivierung einer zentralen Proteinfamilie – den Caspasen. Sie sind eine hoch konservierte Gruppe von Cystein-Proteasen, die ihre Substrate hinter Aspartat-Aminosäuren spalten [24]. Dieser spezifischen Eigenschaft verdanken sie ihren Namen (*Cysteiny*l Aspartat-Specific *Prote*ASE) [25]. Im Menschen finden sich 13 verschiedene Caspasen (Caspase-1 bis Caspase-12 und Caspase-14). Caspasen

sind 30–55 kDa schwere Zymogene, die erst durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Diese Aktivierung der Proform erfolgt durch andere Caspasen [26] oder autoproteolytisch durch das Prinzip der induzierten Proximität [27]. Unter Entfernung der N-terminal gelegenen Prodomäne erfolgt die Spaltung der Proform und lässt je eine leichte (10–12 kDa) und eine schwere Untereinheit entstehen (17–20 kDa) [28]. Je zwei leichte und zwei schwere Untereinheiten bilden den hetero-tetrameren, katalytisch aktiven Komplex.

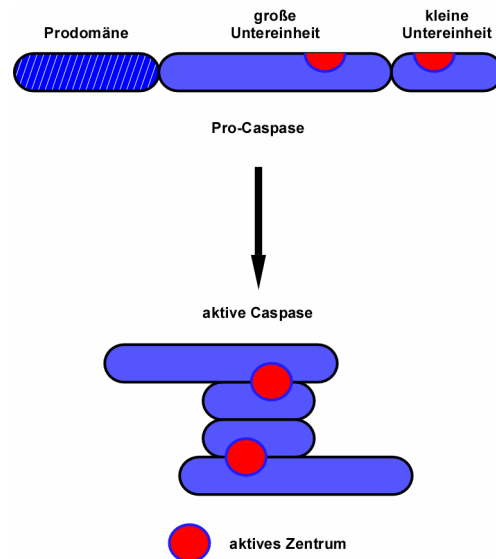


Abbildung 2: Mechanismus der Caspasenaktivierung

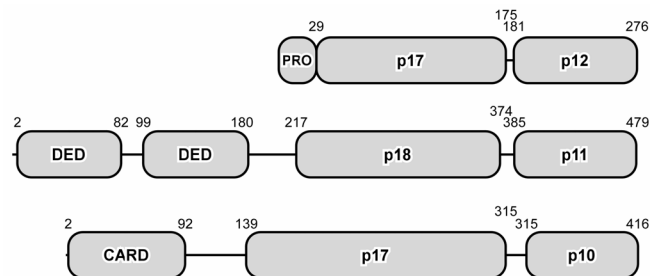
Caspasen bilden einen hetero-tetrameren Komplex nach Abspaltung der Prodomäne. Der aktive Komplex formt sich aus 2 leichten und 2 schweren Untereinheiten.

Die in der Apoptose beteiligten Caspasen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Die Initiatorcaspasen, welche am Beginn der Caspasekaskade stehen, und die Effektorcaspasen, welche von den Initiatorcaspase aktiviert werden und die Apoptose durch Spaltung von Proteinen einleiten.

Tabelle 2: Initiator- und Effektorcaspasen

Initiatorcaspasen	Effektorcaspasen
Caspase-2	Caspase-3
Caspase-8	Caspase-6
Caspase-9	Caspase-7
Caspase-10	

Die inflammatorischen Caspasen als dritte Gruppe spielen bei der Zytokinreifung im Entzündungsgeschehen eine Rolle (Caspase-1, Caspasen-4 & -5, Caspasen-11 & -12).

**Abbildung 3: Primärstruktur der Caspasen 3, 8 und 9**

Caspasen besitzen eine kleine (p10–12) und eine große (p17–18) Untereinheit. Dazu kommt eine Prodomäne (PRO), eine Todeseffektordomäne (DED) oder eine Caspaserekrutierungsdomäne (CARD).

Die Initiatorcaspasen (Caspase-2, Caspase-8, Caspase-9, und Caspase-10) werden durch Oligomerisierung autoprozessiert. Für die nötige Nähe sorgen die Adapterproteine FADD (Fas-Associating Protein with Death Domain), RAIDD (RIP-associated ICH1/CED3-homologous Protein with DD) oder Apaf-1, die eine homodimere Wechselwirkung über die, mit den Caspasen gemeinsamen, Domänen DED oder CARD herstellen. Eine Aktivierung der Initiatorcaspasen durch die Effektorcaspasen Caspase-3 und -6 [29] ist möglich.

Die Effektorcaspasen werden durch die Initiatorcaspasen proteolytisch gespalten und damit aktiviert [30]. Die Effektorcaspasen Caspase-3 und Caspase-7 liegen schon in ihrer latenten Form als Dimer vor. Bei Caspase-8 und Caspase-9 ist die Dimerisierung ein Teil der Aktivierung [31].

Eine umfassende Übersicht der Caspasesubstrate findet sich in [32, 33]. Exemplarisch werden in der folgenden Tabelle 3 einige Substrate aufgelistet.

Tabelle 3: Caspasesubstrate [32]

Substrat	Caspase	Funktion	Literatur
Bid	Caspase-8	über Aktivierung von Bax + Bak Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs.	[34]
DFF45/CAD	Caspase-3	Caspase-3 spaltet DFF45 zu DFF40, das von ICAD nicht mehr inaktivierbar ist. DFF40 fragmentiert DNA in 200-bp- Stücke	[35-37]
PARP-1/-2	Caspase-7, -3	DNA –Reparaturenzym	[38, 39]
β -Spectrin		Zytoskelettstrukturprotein, Beteiligung am „Blebbing“ der apoptotischen Zelle	[40]
Lamin A		Kernstrukturprotein	[41]
c-Abl		Zellzyklusarrest	[42]
BRCA-1		Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur	[43]
NF- κ B		Kernregulationsfaktor	[44]

Caspasen werden in den verschiedenen Signalwegen der Apoptose aktiviert. Caspase-9 ist in der postmitochondrialen Signalfolge das wichtigste Protein neben Apaf-1. Wie dieses ist es für die Apoptosombildung unerlässlich. Das Zymogen Pro-Caspase-9 (46 kDa) wird im Apoptosom unter Abspaltung der Pro-Domäne zur Caspase-9-Spaltform (35 kDa) aktiviert [45]. So aktiviert spaltet sie Caspase-3 und leitet den Zelltod ein.

Zusätzlich wird eine vom Apoptosom unabhängige Aktivierung von Caspase-9 diskutiert [46]. Dabei spielen im Aktivierungsgeschehen Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen eine wichtige Rolle [47-53]. Die phosphorylierte Form der Caspase-9 ist inaktiv und Dephosphorylierung ermöglicht die Aktivierung. Staurosporin kann als Kinasenhemmer eine Phosphorylierung von Caspase-9 inhibieren. Die dann überwiegenden Phosphatasen würden Caspase-9 dephosphorylieren und aktivieren. Da die Spaltung von Caspase-9 unter Staurosporininkubation sehr schnell abläuft und Phosphorylierungen ebenfalls sehr schnelle

Regulationsmechanismen sind, liegt der Schluss nahe, dass beides im Zusammenhang stehen mag.

1.2 Die bekannten Signalwege der Apoptose

Es gibt eine ganze Reihe von endogenen und exogenen Stimuli, die in Zellen Apoptose induzieren können: Zytokine, der Entzug von Wachstumsfaktoren [54], physikalischer Stress durch z.B. UV- oder Gamma-Strahlung [55], sowie chemischer Stress durch z.B. reaktive Sauerstoffspezies [56]. Außerdem können Bakterien [57], Viren [58] und verschiedene Stoffe (z.B. Zytostatika [59-61], Tributylzinn [62], Inhibitoren der Proteinbiosynthese) Apoptose auslösen. Die Apoptose ist wie die Zellproliferation und Zelldifferenzierung in eine inter- und intrazelluläre Kommunikation eingebunden. Dabei wird Apoptose über verschiedene Signalwege eingeleitet und reguliert. Je nach Ausgangspunkt der Apoptoseauslösung wird nach extrinsischen und intrinsischen Signalwegen unterschieden. Extrinsische Signalwege werden von außerhalb der Zelle aktiviert; intrinsische Signalwege lösen Apoptose durch intrazelluläre Vorgänge aus.

Die Signalwege der Apoptose und deren Gegenspieler werden im Folgenden kurz dargestellt.

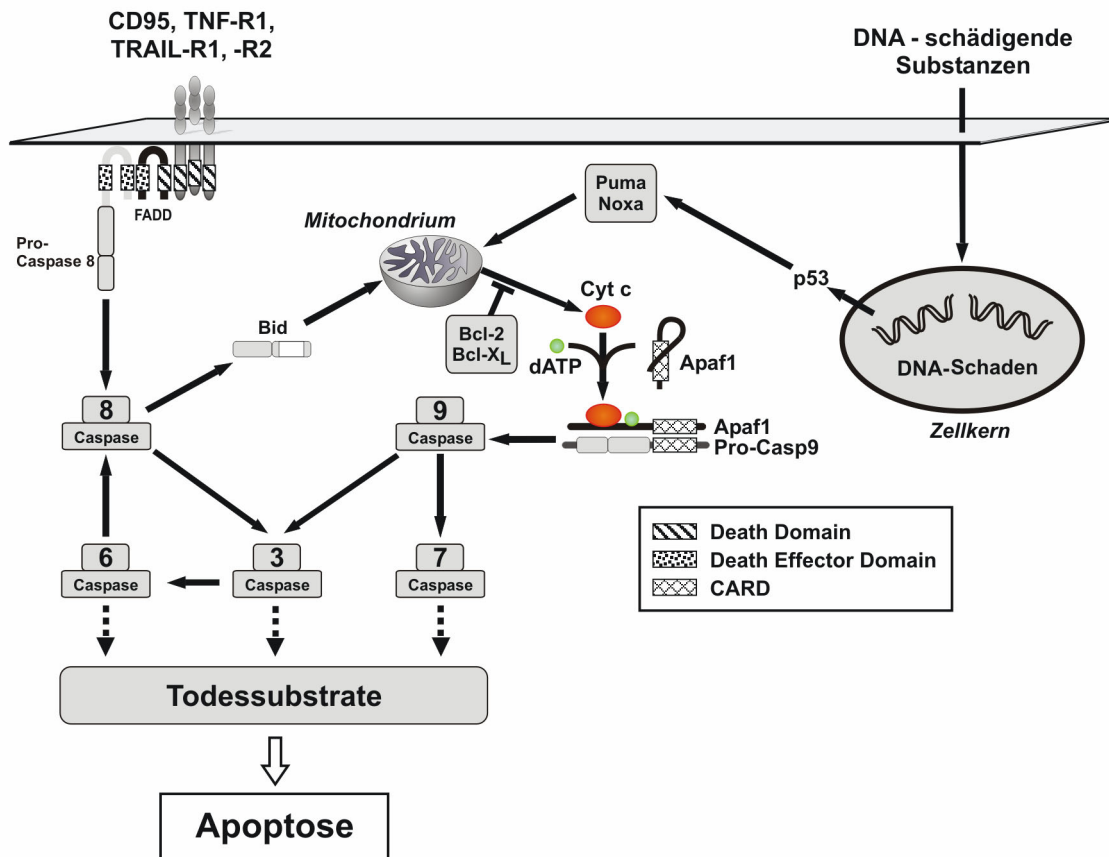


Abbildung 4: Die apoptotischen Signalwege

Die Apoptose wird in der Zelle auf verschiedenen Signalwegen stimuliert. Die beiden bestuntersuchten Signalwege sind der extrinsische und der mitochondriale Weg. Beide enden in einer gemeinsamen Caspasekaskade, die durch Spaltung von Todessubstraten Apoptose auslöst. Der extrinsische Weg wird durch externe Stimulierung von Oberflächenrezeptoren ausgelöst. Der mitochondriale Signalweg läuft nach interner Aktivierung über das Mitochondrium und das Apoptosom. Der extrinsische Weg kann über eine Bid-Spaltung an den intrinsischen Weg koppeln und verstärkt werden. Das PIDDosom verbindet den Signalweg der genotoxischen Substanzen mit dem Mitochondrium. Durch Bcl-2 inhibierbar sind alle Signalwege, die das Mitochondrium durchlaufen.

1.3 Extrinsische Signalwege

1.3.1 Todesrezeptorsignalweg

Der Todesrezeptorsignalweg beginnt mit der Aktivierung eines Todesrezeptors. Dies sind verschiedene Subtypen der TNF-Rezeptor-Superfamilie, CD95/Fas [63], TNF-Rezeptor [64] und die TRAIL-Rezeptoren [65]. Sie bestehen alle aus einem extrazellulären Teil, einer Transmembrandomäne und einem intrazellulären Teil. Am extrazellulären Ende bindet der Rezeptorligand (CD95-Ligand, TNF α und TRAIL) und verändert so die Konformation des Rezeptors; er wird aktiviert und drei der Ligand-Rezeptor-Komplexe trimerisieren. Die Trimerisierung rekrutiert intrazellulär das Adapterprotein FADD über dessen Todesdomäne (DD) an die intrazellulär gelegene DD des Rezeptors. Durch diese Komplexbildung kann die Proform der Caspase-8 mit ihrer Todeseffektordomäne (DED) homophil an die DED des Adapterproteins FADD (Fas-Associating Protein with Death Domain) koppeln und bildet den Death Inducing Signaling Complex (DISC). Im DISC wird durch induzierte Proximität aus der Proform der Caspase-8 die aktive Spaltform gebildet [66-68], welche durch Spaltung der Effektorcaspase Caspase-3 Apoptose auslöst.

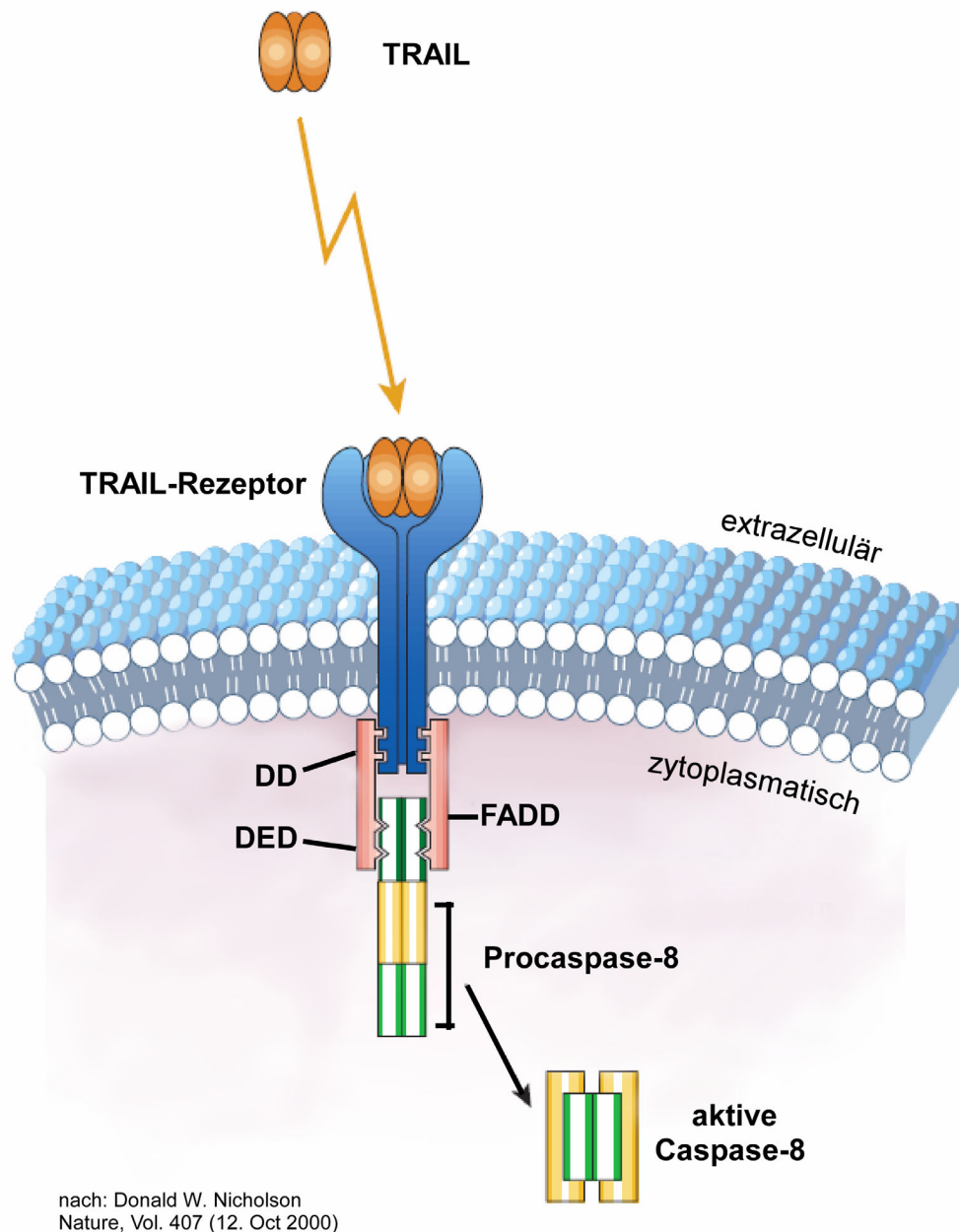


Abbildung 5: Todesrezeptorsignalweg

Der extrinsische Signalweg wird durch verschiedene Signalstoffe (z.B. TRAIL, CD95-Ligand) von außerhalb der Zelle angesteuert und kann Apoptose in der aktivierten Zelle auslösen. Dazu lagert sich der Ligand an den Rezeptor an und dieser trimerisiert. Die Aktivierung wird durch das Adapterprotein FADD an die Initiatorcaspase Caspase-8 weitergegeben. Caspase-8 wird durch Abspaltung der Prodomäne aktiviert und löst die apoptotische Caspasekaskade aus.

Die extrinsische Apoptose kann dabei in manchen Zelllinien nur über eine mitochondriale Verstärkung ablaufen. Zellen in denen extrinsische Apoptoseauslösung ausschließlich auf diesem Wege möglich ist, werden als Typ-II-Zellen bezeichnet, im Gegensatz zu den Typ-I-

Zellen, in denen es keine solche Verstärkung braucht, da Caspase-8 direkt Caspase-3 aktiviert [69, 70]. Mechanistisch läuft die Verstärkung in Typ-II-Zellen über eine Spaltung von Bid in tBid durch Caspase-8. Das zytosolische tBid transloziert es an die Mitochondriummembran und induziert dort die Oligomerisierung von Bax und Bak. Eine Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium ist die Folge [71, 72]. Cytochrom c bildet mit dATP, Caspase-9 und Apaf-1 zusammen das Apoptosom (Abbildung 7).

1.4 Intrinsische Signalwege

1.4.1 Der mitochondriale Apoptoseweg und das Apoptosom

Mitochondrien haben verschiedene Funktionen in der Zelle, z.B. die Produktion von ATP durch aeroben Metabolismus, die Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichtes und die Regulation der Apoptose.

Viele Apoptoseauslöser aktivieren den mitochondrialen Signalweg [73, 74]. Das zentrale Ereignis des mitochondrialen Signalwegs ist die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Inter-membranraum des Mitochondriums ins Zytosol der Zelle [75]. Außerdem ins Zytosol freigesetzte Proteine sind Smac/DIABLO (Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase/ Direct IAP Binding Protein with Low pI), Endo G (Endonuklease G) und AIF (Apoptosis Inducing Factor) [76-78]. AIF ist ein Flavoprotein mit Redoxaktivität; Endonuklease G wird mit der mitochondrialen DNA-Replikation in Verbindung gebracht. Beide Proteine werden während der Caspase-abhängigen Freisetzung aus dem Mitochondrium [79] zum Zellkern rekrutiert, wo sie zur Caspase-unabhängigen [80] Spaltung der genomischen DNA beitragen. Cytochrom c stammt aus der Elektronentransportkette an der inneren Mitochondrienmembran [81]. Der Verlust von Cytochrom c ist auch der Endpunkt der mitochondrialen Energiegewinnung. Die Zelle verarmt an ATP [82]. Wird Cytochrom c aufgrund von Perforation der Mitochondrienmembran ins Zytosol freigesetzt, lagert es sich an die WD40-Domäne des Apaf-1 an [83]. Apaf-1 vollzieht eine Konformationsänderung unter Hydrolyse von dATP und oligomerisiert zum Heptamer unter Exposition der Caspase-rekrutierungsdomänen (CARD) [84]. Die Apaf-1-CARD bindet Caspase-9 über deren CARD-Domäne und bildet das Apoptosom. In diesem heteromeren Proteinkomplex (~700 kDa) wird Caspase-9 nach dem Prinzip der induzierten Proximität autoproteolytisch prozessiert und damit aktiviert [85, 86]. Pro-Caspase-3 wird von aktiver Caspase-9 aktiviert [87-92]. Aktivierte Caspase-3 löst sich vom Apoptosom, spaltet die Todessubstrate und besiegelt den Zelltod [93].

Vermutlich ist auch XIAP (X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein) am Aufbau des Apoptosoms beteiligt [94]. Caspase-9 präsentiert eine IAP-Bindungsstelle nach Aufnahme ins Apoptosom und XIAP inhibiert Caspase-9 durch Bindung an diese [95]. Nach der Freisetzung von Smac/DIABLO aus dem Mitochondrium wird XIAP von diesem neutralisiert [96]. Danach ist Caspase-9 aktivierbar und kann Caspase-3 im Apoptosom aktivieren.

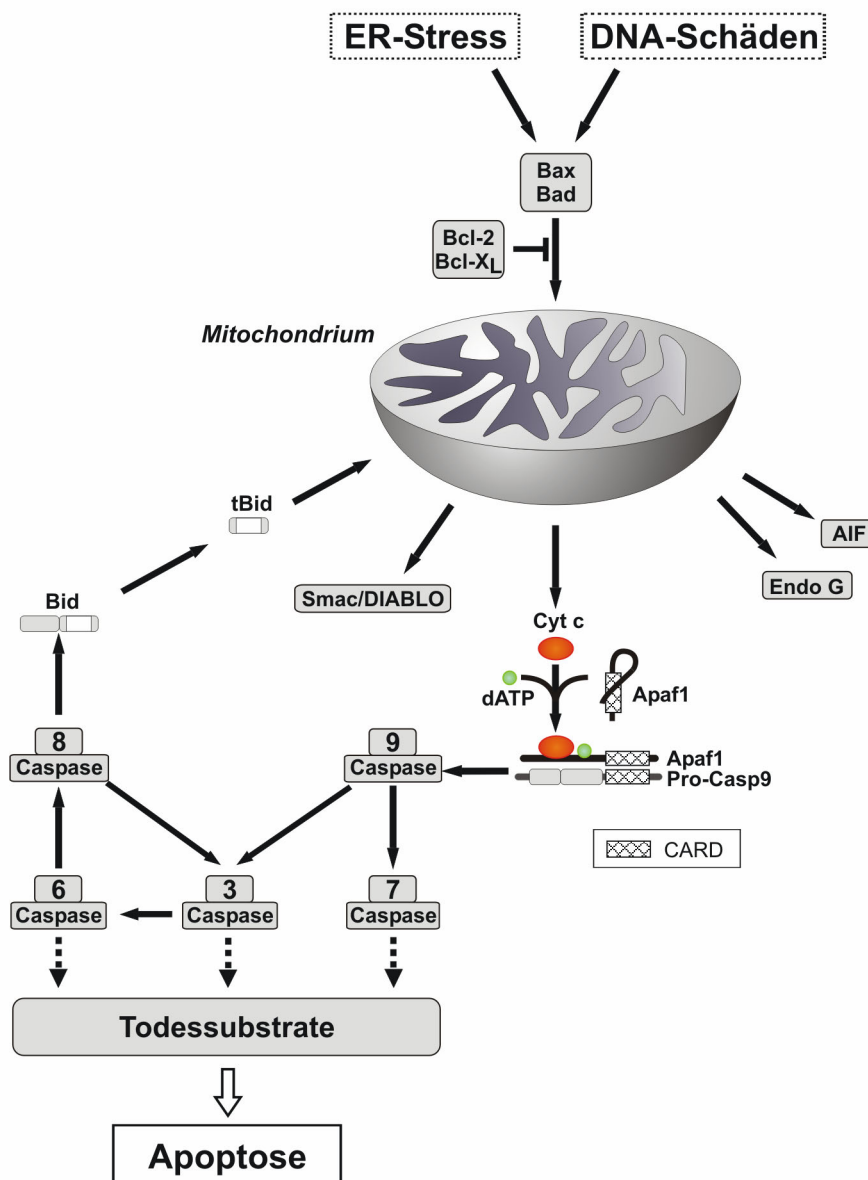


Abbildung 6: mitochondrialer Signalweg

Im mitochondrialen Signalweg steht eine Schädigung des Mitochondriums durch verschiedene apoptotische Stimulantien am Anfang. Die zytosolischen Proteine Bax und Bak zerstören die Membranintegrität der Mitochondrienmembran und führen zu einer Freisetzung mitochondrialer Proteine. Es sind EndoG, AIF, Smac/DIABLO oder Cytochrom c, die in der Zelle dann Signalwege zur Apoptose anschalten. Durch Cytochrom c wird die Bildung des Apoptosoms ermöglicht (Abbildung 7).

Der Apoptosomkomplex ist ein hoch konservierter Komplex und schon in *C. elegans* nachgewiesen. Die Komplexbildung des Apoptosoms ist der entscheidende Schritt der mitochondrialen Apoptose [97].

Der mitochondriale Signalweg kann von verschiedenen Proteinen gehemmt werden. Exemplarisch sind zu nennen Bcl-2 [98], Bcl-XL [98], Hexokinasen [99], Protein Kinase A (PKA) [100], Protein Kinase C_{epsilon} (PKC_ε) [101] und Glycogen Synthase Kinase-3_{beta} (GSK3_β) [102].

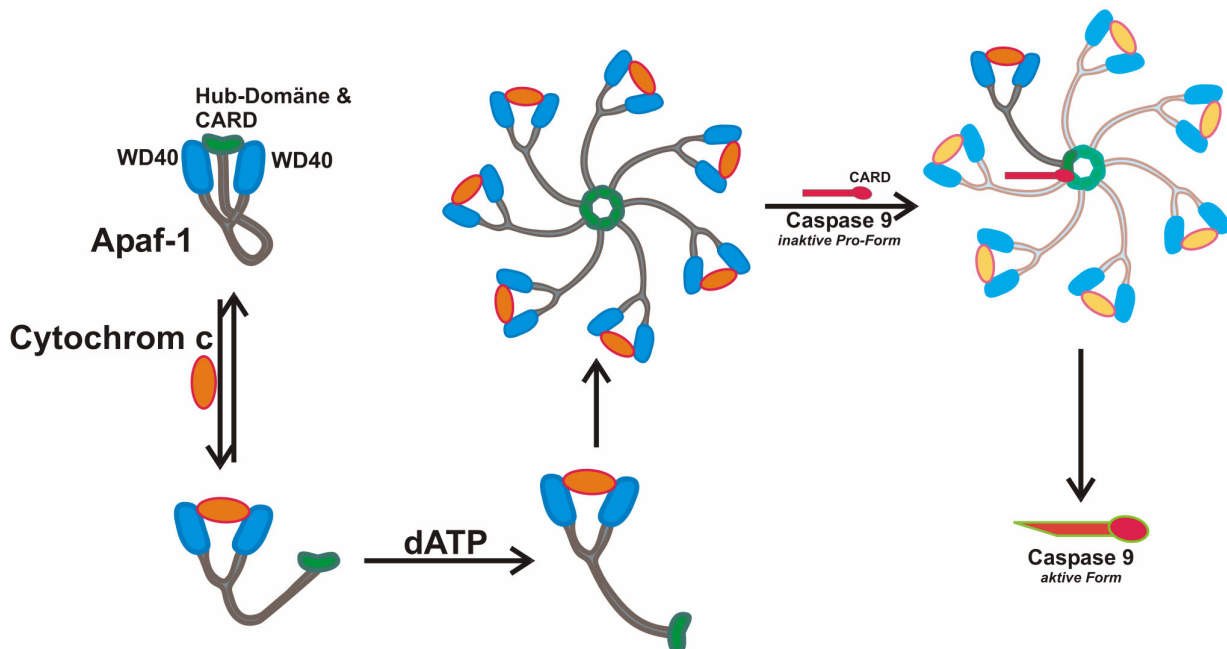


Abbildung 7: Apoptosom

Diese hochmolekulare Struktur besteht aus den vier Komponenten: Apaf-1, Caspase-9, Cytochrom c und ATP. Die Initiatorcaspase Caspase-9 wird in diesem Komplex aktiviert. Das Apoptosom rekrutiert Caspase-3 und aktiviert sie durch aktive Caspase-9. Aktive Caspase-3 verlässt den Komplex und spaltet dann so genannte Todessubstrate und terminiert den Zelltod. Die Anlagerung von Caspase-9 erfolgt über deren CARD-Domäne an die CARD-Domäne von Apaf-1. (Nach: Acehan et al. [85])

Der Integritätsverlust der Mitochondrienmembran ermöglicht sowohl eine Freisetzung von Cytochrom c als auch einen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$). Es ist bislang unklar, welcher der beiden Prozesse den anderen beeinflusst [103-105]. Wird mit Zytostatika Apoptose stimuliert, so folgt ein Verlust an Cytochrom c ohne gleichzeitigen Potentialverlust.

1.4.2 Der ER-Stress Signalweg

Ein weiterer intrinsischer Apoptosesignalweg ist der ER-Stress Signalweg. Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist der Ort in der Zelle, an dem die Biosynthese von Glykoproteinen, Lipiden und Steroiden stattfindet. ER-Stress entsteht z.B. durch Störungen in der Calcium-

Homöostase des ER, Anhäufung von falsch gefalteten bzw. falsch glykosylierten Proteinen im ER oder Glukosemangel [106, 107]. Der Ausgangspunkt des ER-Signalwegs ist unbekannt. Die Weiterleitung zu Apoptoseproteinen schien bis vor kurzem zumindest im Mausexperiment gesichert. So war die Beteiligung von Caspase-12 [108] als essentiell erachtet worden: Sie aktiviert direkt Caspase-9 und diese dann Caspase-3. Die Beteiligung von Cytochrom c ist bei dieser Aktivierung nicht notwendig [108, 109]. Durch kürzlich nachgewiesene Apoptosombeteiligung ist diese Ansicht in Frage gestellt [110]. In beiden Fällen ist das Vorhandensein von Caspase-9 für die Apoptose essentiell. Da im Humansystem meist keine Caspase-12 zu finden ist, erfolgt dort die ER-Stress-Weiterleitung zum Zellkern über CHOP/GADD153, einem Transkriptionsfaktor, der die Bcl-2-Transkription vermindert und so Apoptose auslöst [111]. Beobachtungen in Rattenzellen lassen weiter auf einen Cytochrom c-abhängigen, Caspase-8- und Bid-unabhängigen Weg schließen [112]. Der Signalweg ist nur fragmentarisch bekannt. Es werden ebenso Cytochrom c/Apaf-1-unabhängige Wege diskutiert [113]. Die Standpunkte in diesem Bereich sind noch sehr widersprüchlich, was zum Großteil an spezies- und gewebespezifischen Besonderheiten liegt. Der wahrscheinliche Hauptweg der ER-bedingten Apoptoseaktivierung beim Menschen läuft über mitochondrial/Apaf-1-abhängige Wege die eine Beteiligung von c-Abl [114] oder Calcium [115] benötigen. Calciumverlust des ER führt zu Calciumanstieg im Mitochondrium [116]. Dort wirkt der Calciumanstieg proapoptotisch unter Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs.

1.4.3 Das PIDDosom

Der Zellkern ist ein weiterer Zellbestandteil, der am programmierten Zelltod beteiligt ist. Tschopp et al. beschrieben das im Zellkern angesiedelte PIDDosom [117]. Die DNA-Schädigung durch DNA-Interkalatoren wird vom PIDDosom-Signalweg über eine Caspase-2-abhängige Spaltung von Bid [118] auf das Mitochondrium weitergeleitet und wirft dort den mitochondrialen Apoptoseweg an.

Funktionell wird nach Schädigung des Zellkerns durch DNA-schädigende Substanzen (z.B. Etoposid und andere Zytostatika) p53-abhängig verstärkt PIDD (p53-induced protein with death domain) synthetisiert. An die Todesdomäne (Death Domain, DD) von PIDD lagert sich die DD des Adapterproteins RAIDD (RIP-associated ICH1/CED3-homologous Protein with death domain) homodimer an. An die Caspaserekrutierungsdomäne (Caspase Recruitment Domain, CARD) von RAIDD wird ebenfalls homodimer die CARD von Caspase-2 rekrutiert und es bildet sich das PIDDosom [117]. Das PIDDosom überträgt die zur Apoptose führende

Schädigung des Zellkerns über Puma/Noxa an das Mitochondrium. Caspase-2 ist in diesem Prozess entscheidend für die Weiterleitung im Signalweg. Sie spaltet Bid in tBid [119-121]. tBid agiert in gleicher Weise, wie unter der extrinsischen Apoptoseauslösung beschrieben. Letztlich wird Cytochrom c freigesetzt und das Apoptosom gebildet [119, 120]. Die Bildung des PIDDosoms ähnelt der Bildung des Apoptosoms (Abbildung 7) im extrinsischen Signalweg. In Zellen, in denen die Zellkerne entfernt wurden, ist jedoch weiterhin Apoptose möglich [122, 123].

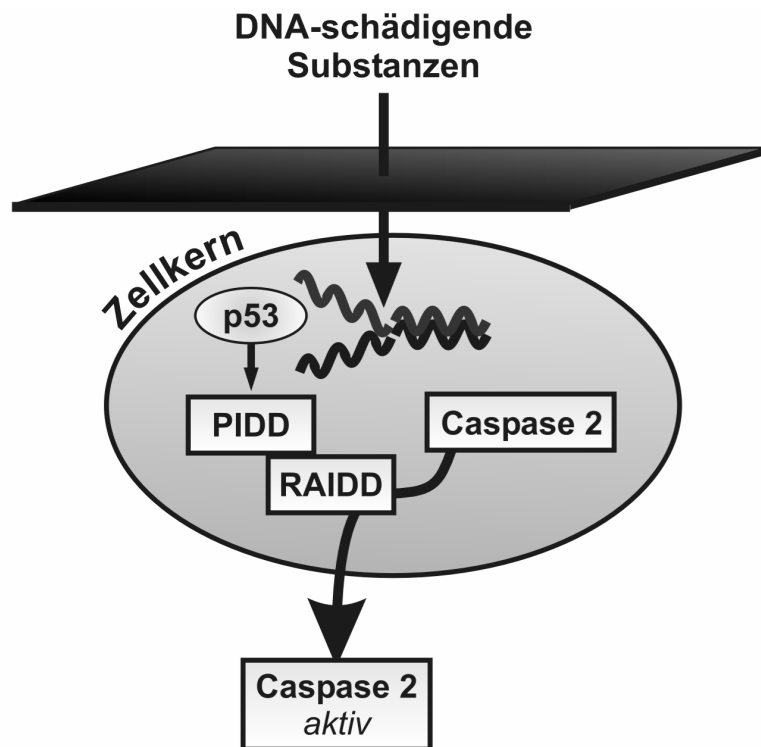


Abbildung 8: PIDDosom

Analog des Apoptosoms ist ein PIDDosom postuliert worden, durch welches die durch DNA-Schädigung ausgelöste Apoptose an das Mitochondrium gekoppelt wird. DNA-Schädigung mit p53-Aktivierung wird durch Überexpression von PIDD und dem Adapterprotein RAIDD beantwortet. Caspase-2 wird zu einem Komplex mit PIDD und RAIDD rekrutiert und dort aktiviert. Aktivierte Caspase-2 kann die apoptotischen Signale von genotoxischem Stress weiter auf das Mitochondrium leiten. Diese Brücke ist die Spaltung von Bid zu tBid.

1.4.4 Der Apaf-1 unabhängige, Bcl-2 inhibierbare Signalweg über Caspase-7.

Wie von Marsden et al. [124] gezeigt, existiert neben den schon erwähnten Signalwegen ein weiterer Apoptosesignalweg. Dieser Weg kommt ohne die Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3 im Apoptosom aus und ist nicht auf den extrinsischen Apoptosesignalweg ange-

wiesen. Postuliert wird eine Aktivierung von Caspase-7 durch die Initiatorcaspasen Caspase-1, -2, -11 oder -12. Die Aktivierung der Initiatorcaspasen wird durch Bcl-2-Überexpression verhindert.

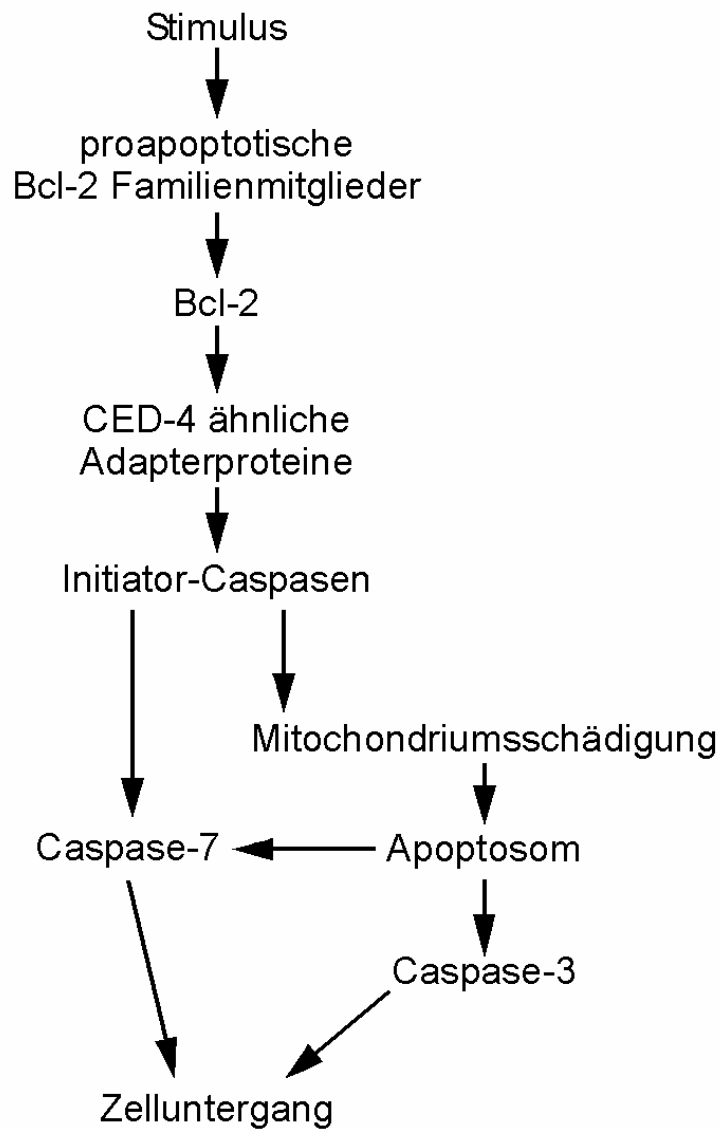


Abbildung 9: Bcl-2 inhibierbarer, Apaf-1-unabhängiger Signalweg

Von Marsden et al. postulierter, Apaf-1 unabhängiger, Bcl-2-hemmbarer Signalweg [124].

1.5 Regulationsmechanismen in der Apoptose

Die Signalwege der Apoptoseauslösung sind in der gesunden Zelle blockiert und werden erst bei Zellschädigung aktiviert. Im Folgenden werden einige wichtige Regulationsmechanismen beschrieben.

1.5.1 Die Bcl-2-Proteinfamilie

Eine wichtige Gruppe von Proteinen zur Steuerung der Signalwege ist in der Bcl-2-Proteinfamilie zusammengefasst. Ihren Namen hat diese Gruppe von einem antiapoptotischen Mitglied der Proteinfamilie – Bcl-2. Es sind pro- und antiapoptotische Subgruppen (Abbildung 10) unterscheidbar:

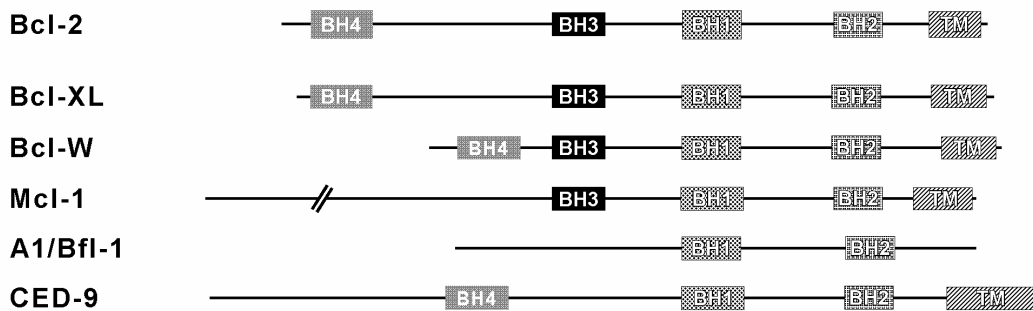
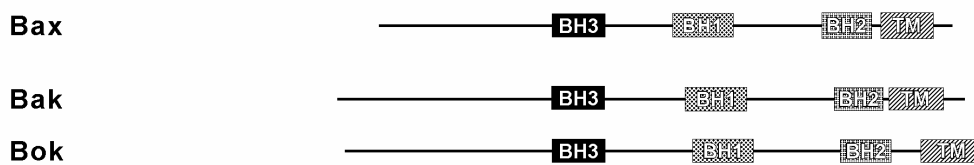
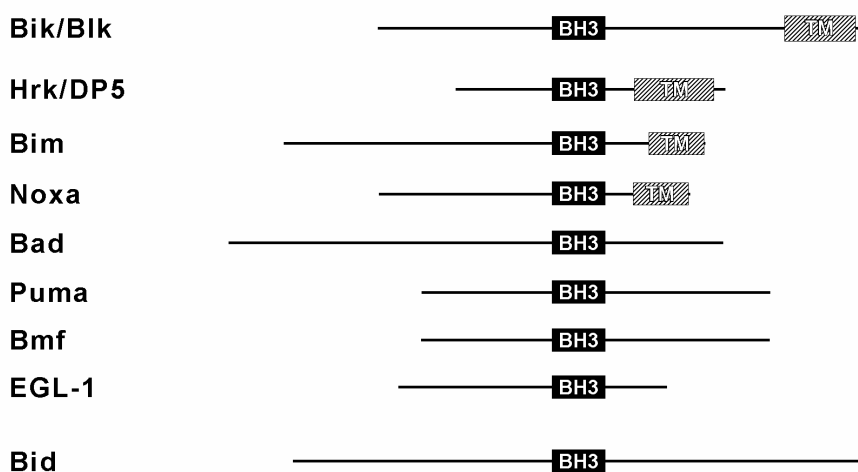
- proapoptotische BH3-only-Familienmitglieder,
- proapoptotische BH1–3-Proteine,
- antiapoptotische BH1–4-Familienmitglieder.

BH ist eine α -helikale Bcl-2-Homologiedomäne in den Proteinen. Die Domäne BH3 ist dabei, wenn als einzige BH-Domäne im Protein auftauchend („BH3-only“-Proteine), für die proapoptotisch wirkenden Familienmitglieder charakteristisch. Die BH3-Subfamilie beinhaltet die Proteine Bid [125], Bik [126], Bim [127], Bad [128], Blk [129], Hrk/DP5 [130], Noxa und Puma [131]. Die „BH3-only“-Mitglieder wirken als allosterische Aktivatoren oder Inhibitoren auf ihre Zielproteine. Bim, Bad und Noxa inhibieren auf diese Weise Bcl-2 oder Bcl-X_L. Bid aktiviert Bax und Bak.

In den proapoptotisch wirkenden, zytosolischen Proteinen der Bax-Subfamilie (Bak [132], Bax [133] und Bok [134]) kommen außer der BH3-Domäne noch die Domänen BH1 und BH2 vor. Durch Aktivierung wird deren Konformation geändert. Sie fügen sich zu Homomultimeren in der äußeren Mitochondrienmembran zusammen und bilden eine Pore, durch die Cytochrom c ins Zytosol freigesetzt wird [72, 135].

In den Proteinen der Bcl-2-Subfamilie (Bcl-2, Mcl-1 [136], Bcl-X_L [137], Bcl-W [138] und A1 [139]) finden sich die Domänen BH1–4. Die Wirkungen der Bcl-2-Subgruppen-Proteine werden durch Komplexbildung zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen (z.B. Bax bzw. Bak binden an Bcl-2 oder Bcl-X_L) aufgehoben [140]. Die Einhaltung der stöchiometrischen Verhältnisse zwischen pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern ist für das Zellüberleben essentiell. Treten proapoptotische Bcl-2-Mitglieder im Überschuss auf, reicht die Neutralisation durch antiapoptotische Bcl-2-Proteine nicht mehr aus und Apoptose findet statt.

Eine Regulierung dieser Proteine geschieht z.B. durch Phosphorylierungen. Proapoptotisches Bad wird durch PKB/Akt phosphoryliert und inaktiviert [141]. Unter dem Einfluss von Apoptosestimuli wird Bad dephosphoryliert und aktiviert [142].

antiapoptotisch**Bcl-2** Sub-Familieproapoptotisch**Bax** Sub-Familie**BH3** Sub-Familie**Abbildung 10: Bcl-2-Familie**

Die Bcl-2-Proteinfamilie besteht aus drei Subfamilien. Die Bax- und die BH3-only-Subfamilien sind proapoptotisch wirksam; die Bcl-2-Subfamilie antiapoptotisch. Die Bcl-2-Homologieregionen (BH 1–4) sind das gemeinsame Merkmal in dieser Familie. Viele Familienmitglieder zeigen eine Transmembrandomäne (TM), welche die Lokalisierung des Proteins in der Zelle bestimmt. CED-9 und EGL-1 sind die analogen Proteine im Fadenwurm *C. elegans*. (nach: S. Cory [143])

1.6 Der PI3K-Akt/PKB-Überlebenssignalweg

Den apoptoseauslösenden Signalwegen stehen funktionell die Überlebenssignalwege gegenüber: Sie haben die Aufgabe, vor Zelltod zu schützen [144]. Dieses System ist fein tariert – damit ein Überleben möglich, aber auch ein Schutz des Gesamtorganismus vor geschädigten Zellen gewährleistet ist.

Ist ein solcher Signalweg aktiviert, ermöglicht das der Zelle das Überleben unter Stressbedingungen. Der PI3K-PKB/Akt-Signalweg ist einer der bekanntesten Überlebenssignalwege. Im ersten Schritt wird Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs), z.B. Rezeptoren der Wachstumsfaktoren (PDGF-R, NGF-R, u.a.), aktiviert. PI3K phosphoryliert PIP₂ (Phosphoinositol-3,4-diphosphat) zu PIP₃ (Phosphoinositol-3,4,5-triphosphat). Das membranständige PIP₃ rekrutiert PKB/Akt an die Zellmembran, wo sie von 3-prime phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) an Tyr³⁰⁸ [145] und vom mTOR·RICTOR/GβL-Komplex (und auch anderen Kinasen) an Ser⁴⁷³ [146] phosphoryliert wird. Die aktivierte PKB/Akt kann proapoptotische Proteine phosphorylieren und damit inaktivieren. Substrate von PKB/Akt sind Bad [141], Caspase-9 [48] und Transkriptionsfaktoren (NF-κB [147], FKHRL1 [148]).

Im PI3K-PKB/Akt-Signalweg antagonisiert die Tyrosinphosphatase PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog) die Kinase PI3K. In vielen Tumoren ist PTEN zu einer inaktiven Form mutiert und über die daraus entstehende dauerhafte Aktivierung des PI3K-PKB/Akt-Überlebenssignalweges für Resistenzen verantwortlich [149].

Phosphoryliert PKB/Akt das Protein Bad an Ser¹⁹⁶, so löst sich dessen Bindung zu Bcl-2 oder Bcl-X_L und die freien antiapoptotischen Proteine können ihre Schutzfunktion ausüben. Cardone et al. haben die Inaktivierung von Caspase-9 durch Phosphorylierung am Ser¹⁹⁶ durch PKB/Akt beschrieben [48]. PKB/Akt reguliert auch den Transkriptionsfaktor FKHRL1 (Fork head transcription factor). Ist dieser phosphoryliert, so wird er an ein cytosolisches 14-3-3-Protein gebunden und ist inaktiv. Eine Dephosphorylierung, z.B. durch Entzug von Wachstumsfaktoren [148], setzt ihn frei. Er transloziert in den Zellkern und löst dort Apoptose aus [150, 151].

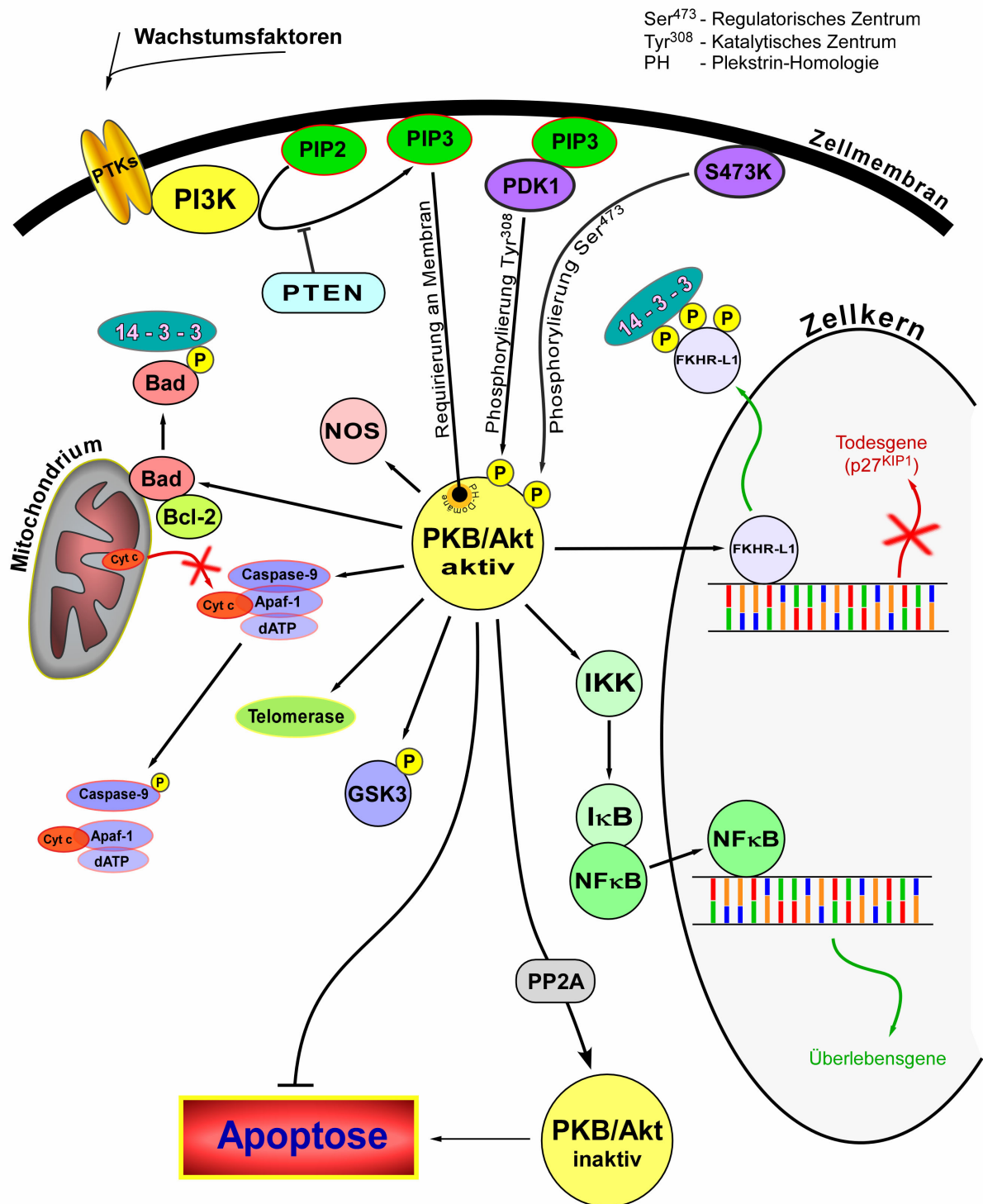


Abbildung 11: PKB/Akt – ein zentrales Protein des Überlebenssignalweges

PKB/Akt agiert in vielfältiger Weise, um proapoptotische Prozesse zu verhindern. Es phosphoryliert dazu proapoptotische Proteine und inaktiviert diese damit. PKB/Akt selbst wird ebenfalls durch Phosphorylierungen gesteuert.

1.6.1 Die IAP-Proteinfamilie

Die Aktivierung von Caspasen kann durch verschiedene Proteine der IAP-(Inhibitors of Apoptosis Proteins)-Proteinfamilie blockiert werden [152]. Weil durch zufällige Proximität [27] auch in der gesunden Zelle immer ein kleiner Teil der Caspasen in aktiver Form vorhanden ist, stellen die IAPs einen Schutzmechanismus vor Apoptose dar [153].

IAPs inhibieren Caspasen [154], indem Caspasesubstraten der Zugang zur aktiven Tasche verwehrt wird. Sie werden unter NF κ B-(nukleärer Faktor kappa B)-Kontrolle transkribiert. Inaktivierung der IAPs erfolgt über eine Spaltung durch aktivierte Caspasen oder über eine Neutralisierung durch Smac/DIABLO [155, 156], bzw. HtrA2 (Htr Serin Peptidase 2) [157], die aus den geschädigten Mitochondrien freigesetzt werden. Der wichtigste Vertreter der IAP-Familie ist XIAP [154], der Caspase-9 inhibiert und in der Apoptosombildung eine Rolle spielt; andere sind cIAP-1 und -2 [152].

1.6.2 Posttranslationale Regulationen - Rolle von Proteinkinasen und Phosphatasen in der Apoptose

Eine weitere Möglichkeit zur Regulation von Signalwegen liegt in der post-translationalen Modifikation von Proteinen, wobei meist die Proteinkonformation geändert wird. Eine solche Regulation ist schneller, als dies z.B. über Proteinbiosynthese und Proteindegradation möglich wäre. Phosphorylierungen spielen in der Apoptose als Proteinmodifikationen eine wichtige Rolle.

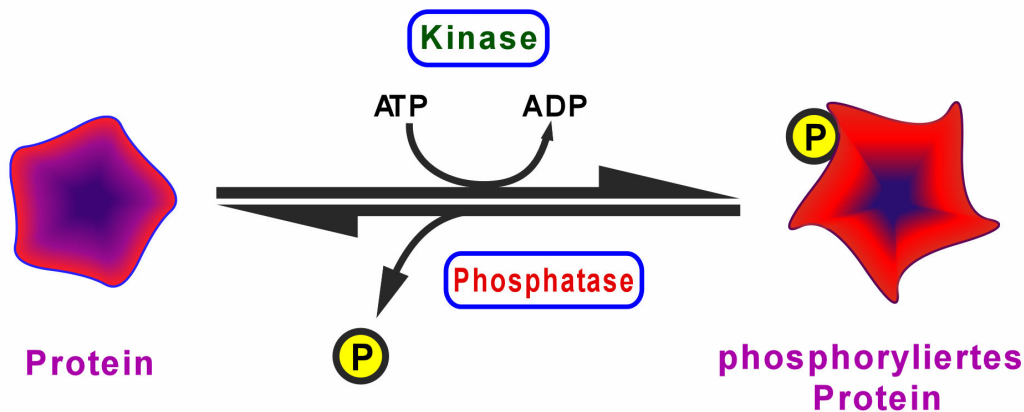


Abbildung 12: Funktion von Kinasen und Phosphatasen

Proteinkinasen phosphorylieren unter ATP-Verbrauch kovalent-reversibel an Aminosäureresten eines Proteins. Phosphatasen dephosphorylieren diese Proteine durch Hydrolyse. Ein Wechsel des Phosphorylierungsstatus verändert die Eigenschaften des Proteins und steuert somit ihre Funktion. Es kommt zu Aktivierungen oder Inaktivierungen durch Konformationsänderungen. Zwei Klassen der Proteinkinasen sind bekannt: Tyrosinkinasen phosphorylieren an der Aminosäure Tyrosin; Serin/Threonin-Kinasen an Serin oder Threonin.

Phosphorylierungen sind in der Apoptose von großer Bedeutung, da sie das schnelle An- und Abschalten von Signalwegen ermöglichen. Auch Transkriptionsfaktoren werden durch Phosphorylierungen in ihrer Aktivität gesteuert (z.B. NF- κ B-Aktivierung mittels Phosphorylierung durch IKK [158]). Die Klasse der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) leitet die Signale extrazellulär angedockter Liganden durch Phosphorylierungen weiter (EGF-R, VEGF-R, NGF-R und Insulinrezeptor).

Neben Protein Kinase B/Akt (PKB/Akt)-gesteuerten Signalwegen (siehe: 1.6) gibt es die Protein Kinase A- und Protein Kinase C- (PKA- und PKC)-Signalwege als Überlebenssignalwege, genauso auch der Ras-Raf-MAPK-Signalweg [159] und der ERK-Signalweg [160-163].

Eine Aktivierung von PKA führt zu Inhibierung von Apoptose: Nach Stimulation mit dem Überlebensfaktor Interleukin-3 (IL-3) wird im PKA-Signalweg Bad durch Phosphorylierung an Ser¹¹² inaktiviert [164]. Eine Mutation der Phosphorylierungsstellen von Bad oder von Bcl-2 führt zur Apoptose [165-167].

Die Protein Kinase C (PKC)-Familie besteht aus einer Gruppe von Serin/Threonin-Kinasen und ist in vielen Regulationsmechanismen involviert (Mitose, Proliferation, Zelldifferenzier-

ung, Modulation von Ionenkanälen, Apoptoseregulationen). Die Steuerung der PKCs erfolgt über Kalzium, Diacylglycerol und Phosphatidylserin [168], sowie durch Phosphorylierungen [169]. Die PKC-Familie spaltet sich in 3 Subgruppen auf:

- Klassische PKCs (PKC α , PKC β , PKC γ)
- Atypische PKCs (PKC ζ , PKC λ , PKC μ , PKC ι)
- Novel PKCs (PKC δ , PKC ϵ , PKC η , PKC θ)

PKC α phosphoryliert Bcl-2 an Ser⁷⁰ [170] und stellt in HL-60 Zellen einen Resistenzmechanismus dar. Aktivierte PKC ϵ inhibiert Apoptose in TNF α -stimulierten U937-Zellen [171], die Hemmung von PKC ϵ und PKC ζ mit Inhibitoren führt zu Apoptose [172]. PKC ζ phosphoryliert Caspase-9 an Ser¹⁴⁴ [53] und schützt vor Apoptose. Phosphorylierungen von Caspase-9 erfolgen auch an Ser¹⁹⁶ durch PKB/Akt [48], an Ser⁹⁹, Ser¹⁸³ und Ser¹⁹⁵ durch PKA [52], an Thr¹⁰⁷ und Thr¹²⁵ durch ERK2 [49], sowie an Tyr¹⁵³ durch c-Abl [47].

Als allgemeines Schema lässt sich festhalten, dass Dephosphorylierung eine Apoptoseauslösung ermöglicht und Phosphorylierung ein Überleben der Zelle begünstigt.

1.6.3 Staurosporin und Staurosporinderivate

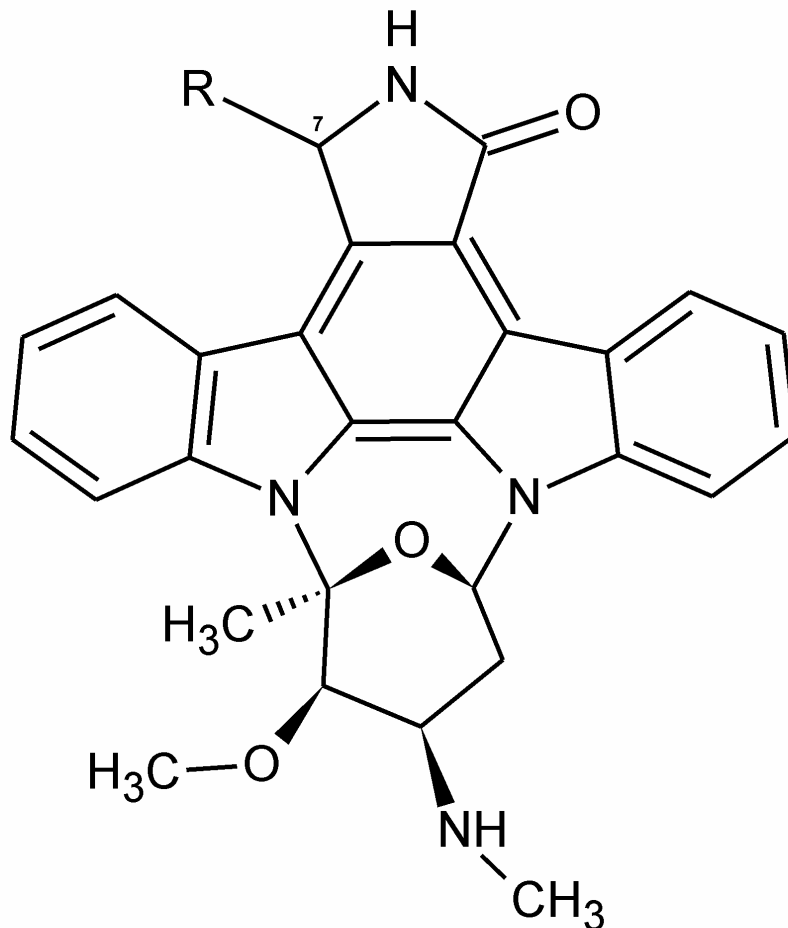
Staurosporin ist ein Alkaloid marinen Ursprunges, das erstmals von Omura et al. 1977 aus *Saccharothrix aerocolonigensis ssp. staurospora* isoliert wurde [173]. Das Indolalkaloid Staurosporin löst in vielen Zellarten Apoptose aus. Es wird als Referenzsubstanz zur Apoptoseauslösung experimentell verwendet, obwohl der genaue Wirkmechanismus undefiniert ist. Staurosporin wirkt unspezifisch ATP-kompetitiv und ist deswegen ein Breitband-Kinaseinhibitor [174]. Zunächst wurde Staurosporin als spezifischer PKC-Inhibitor angesehen [175], diese Eigenschaft ist jedoch nicht für die Apoptoseauslösung verantwortlich. So lösen Staurosporin, 7-Hydroxy-Staurosporin (UCN-01) und Ro 31-8220 als PKC-Inhibitoren konzentrationsabhängig Apoptose aus; PKC412 hingegen als ein spezifischer PKC-Inhibitor, löst keine Apoptose aus [176, 177]. Viele weitere Kinasen werden von Staurosporin gehemmt [178].

Eine Beteiligung des PI3K-PKB/Akt-Überlebens-Signalweges an der Staurosporin-induzierten Apoptose ist ebenfalls unwahrscheinlich. Es wurde zwar gezeigt, dass über ICAM-2 der PI3K-PKB/Akt-Signalweg aktiviert wird und dadurch die Staurosporin-vermittelte Apoptose blockiert ist [179], dieser Effekt wird jedoch durch eine Inhibition der PI3K wieder rückgängig gemacht. Dies legt den Schluss nahe, dass Staurosporin den PI3K/Akt-Signalweg nicht beeinflusst und unterhalb von PI3K und Akt agiert.

Auch der Ras-Signalweg ist nicht direkt beteiligt. Würde Staurosporin direkt PKB/Akt oder PKB/Akt-Aktivatoren, wie z.B. (phosphoinositide-dependent kinase-1) PDK1 [180], inhibieren, so wäre die Aufhebung der Ras-PI3K-PKB/Akt-vermittelten Apoptoseinhibition und Apoptoseinduktion zu erwarten. Dies ist nicht der Fall, da konstitutiv aktives Onkogen Ki-Ras die Staurosporin induzierte Apoptose inhibiert [48].

Dieser unabhängige Weg der Apoptoseauslösung ist noch unbekannt. Zhang et al. [181] konnten einen Caspase-abhängigen, schnell ablaufenden und einen Caspase-unabhängigen, langsam ablaufenden Weg der Staurosporin-induzierten Apoptose zeigen. Sie vermuteten eine Beteiligung von AIF am Caspase-unabhängigen Signalweg. Dieser Weg ist von keiner Relevanz, da die beobachteten Vorgänge sehr schnell nach Staurosporinstimulation auftreten. Einige Untersuchungen mit Staurosporinderivaten weisen auf eine Beteiligung von Protein Kinase C (PKC) an der Apoptose hin, jedoch widersprechen Untersuchungen von Harkin et al. [176] diesem Sachverhalt. Zudem ist Staurosporin ein Breitspektrum-Kinaseinhibitor [178, 182]. Bisher konnte keine Kinase nachgewiesen werden, die für die von Staurosporin ausgelöste Apoptose, verantwortlich ist.

Es wurde in unserer Arbeitsgruppe schon nachgewiesen, dass Staurosporin ähnlich zu Zytostatika in der Lage ist, unabhängig vom Todesrezeptor-Signalweg den mitochondrialen Apoptoseweg zu aktivieren [183]. Genauere Untersuchungen zeigten Unterschiede in den molekularen Wirkungsweisen von Staurosporin und Chemotherapeutika. Staurosporin induziert die Aktivierung von Caspasen in einer schnelleren Kinetik (Staurosporin ~1 h, Etoposid und Mitomycin C 5–8 h), was aufgrund der unterschiedlichen primären Wirkungsweise zu erwarten ist (Kinaseninhibitor, bzw. DNA-Schädigung) [184, 185]. Des Weiteren zeigte sich Staurosporin in der Lage, im Jurkatklon JM319 Apoptose auszulösen, Chemotherapeutika konnten dies nicht [184]. Das lässt einen neuen Signalweg für Staurosporin vermuten, der die Resistenz dieses Jurkatklons durchbrechen kann. Die Überexpression von dominant-negativen Caspase-9-Mutanten blockiert die Chemotherapeutika-induzierte Spaltung von Bid und der Caspasen-3, -8, -9. Im Gegensatz dazu war Staurosporin nach wie vor in der Lage, die in der Zelle vorhandene Wildtyp-Caspase-9 auch in Gegenwart der dominant-negativen Caspase-9-Mutante zu spalten [184]. Untersuchungen mit Überexpression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X_L ergab, dass sich die Chemotherapeutika- und Staurosporin-vermittelte Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien blockieren lässt [59]. Werden jedoch höhere Konzentrationen von Staurosporin eingesetzt, so werden weiterhin Caspasen aktiviert und Apoptose ausgelöst.



Staurosporin (R = H)
7-Hydroxy-Staurosporin (UCN-01) (R = OH)

Abbildung 13: Formeln von Staurosporin und UCN-01.

Verschiedene Staurosporinderivate werden bei Krebserkrankungen in klinischen Studien verwendet und haben gute Chancen in die Therapie aufgenommen zu werden. In der klinischen Überprüfung (Phase II/III) befinden sich zurzeit: UCN-01 – das 7-Hydroxy-Staurosporin – und PKC412 – das N-Benzoyl-Staurosporin (= CGP41251, Midostaurin). Weitere Staurosporinderivate sind Ruboxistaurin (= LY-333531; ArxxantTM, Lilly), das als PKC β -Inhibitor gegen die diabetische periphere Neuropathie vor der Zulassung steht, und Enzastaurin (= LY-317615), welches in klinischen Studien gegen Gliome getestet wird (Phase II).

1.6.4 Rolle von Kinaseinhibitoren in der klinischen Anwendung

Bekannt sind zurzeit 518 Kinasen (mit ca. 2500 Splice-Varianten). Defekte in Kinasen und Phosphatasen sind häufig krankheitsauslösend. So ist bislang zu 244 Krankheiten ein Kinasedefekt nachzuweisen. Beispiele dafür sind:

- bcr-Abl (CML) [186],
- EGF-R (Tumore) [187],
- rsk2 (Coffin-Lowry-Syndrom) [188],
- Ras (Tumore) [189].

In den letzten Jahren wurde die Entwicklung von Arzneistoffen für die Behandlung von kinasebedingten Krankheiten vorangetrieben. 4 Kinaseinhibitoren sind schon als Arzneimittel auf dem Markt verfügbar, weitere 79 werden in klinischen Studien überprüft. Bei der Entwicklung von Kinaseinhibitoren wird prinzipiell auf eine hohe Spezifität Wert gelegt, die häufig jedoch nicht erreicht wird. Begründet liegt dies in deren Angriffsort am hochkonservierten Konsensusmotiv der Kinasen, der ATP-Bindungsstelle. Für die Entwicklung spezifischerer Hemmstoffe sind Kinasesubstrat-Inhibitoren oder Kinaseinhibitoren mit abseits der ATP-Tasche liegenden Motiven zu finden [190-192]. Bei der Krebstherapie kommt neben den bisherigen Therapiekonzepten (Chemo-, Hormon-, Radio- und Immuntherapie) die Verwendung von Kinaseinhibitoren als Option hinzu.

**Tabelle 4: Exemplarische Kinaseinhibitoren,
nach: J. Dancey [190] (Stand der klinischen Prüfung: 04/2003)**

Wachstumsfaktorenrezeptoren Inhibitoren			
<i>EGFR-Inhibitoren</i>			
Cetuximab, Erbix [®]	Merck	Monoklonaler Antikörper	Phase III
Gefitinib, Iressa [®]	AstraZeneca	Niedermol. Kinaseinhibitor	Phase III
Erlotinib, Tarceva [®]	Roche	Niedermol. Kinaseinhibitor	Phase III
<i>HER-2/neu-Inhibitor</i>			
Trastuzumab, Herceptin [®]	Roche	Monoklonaler Antikörper	Zulassung

PDGFR/c-Kit/ BCR-ABL-Inhibitoren

Imatinib, Gleevec [®]	Novartis	Niedermol. Kinaseinhibitor	Zulassung
--------------------------------	----------	----------------------------	-----------

Sunitinib, Sutent [®]	Pfizer		Zulassung
--------------------------------	--------	--	-----------

Raf-Inhibitor

Sorafinib, Nevaxar [®]	Bayer	Niedermol. Kinaseinhibitor	Zulassung
------------------------------------	-------	----------------------------	-----------

MEK Inhibitor

U-0126		Niedermol. Kinaseinhibitor	Phase I
--------	--	----------------------------	---------

mTOR Inhibitoren

Rapamycin, Sirolimus, Rapamune [®]	Wyeth	Inhibiert mTOR Kinase durch Bindung an FKBP12	Zulassung Immunsup- pressivum
---	-------	--	-------------------------------------

PKC-Inhibitoren

CGP41251/PKC41 2	Novartis	Staurosporinanalogen	Phase II
---------------------	----------	----------------------	----------

UCN-01	Kyowa Hakko Kogyo	Staurosporinanalogen	Phase I/II
--------	-------------------	----------------------	------------

PKC- β -Inhibitor

Ruboxistaurin	Eli Lilly	Niedermol. Kinaseinhibitor	Phase I Onkologie
			Phase II/III diabetische Neuropathie

PDK1-Inhibitor

UCN-01	Kyowa Hakko Kogyo	Staurosporinanalogen	Phase I/II
--------	-------------------	----------------------	------------

2 Fragestellung

Ausgangspunkt der vorliegenden Doktorarbeit war die Beobachtung, dass der Proteinkinase-inhibitor Staurosporin in Chemotherapeutika-resistenten Tumorzellen Apoptose auslösen kann. Zudem war bekannt, dass Staurosporin unabhängig vom extrinsischen Todesrezeptor-signalweg den mitochondrialen Apoptosesignalweg in direkter Weise aktiviert. Da Staurosporin jedoch in Zytostatika-resistenten Tumorzellen Apoptose auslösen kann, bedeutet dies, dass Staurosporin und konventionelle Zytostatika sich in der Apoptose-auslösung unterscheiden. Über den genauen Wirkungsmechanismus der Staurosporin-induzierten Apoptose und ob Staurosporin weitere intrinsische Signalwege hierbei aktiviert, war bislang wenig bekannt. Folglich war das Ziel dieser Doktorarbeit, den offensichtlich neuartigen, durch Staurosporin aktivierten, Apoptosesignalweg zu charakterisieren und dabei zu untersuchen welche Signalkomponenten involviert sind. Das Verständnis dieser Signalvorgänge ist vor allem für die Erstellung neuer Therapiekonzepte und die Entwicklung neuartiger Chemotherapeutika von Bedeutung, welche die Eliminierung von Tumoren ermöglichen sollen, die bislang resistent gegenüber konventionellen DNA-schädigenden Zytostatika oder Bestrahlung sind.

Die Wirkweise von Staurosporin sollte durch die Untersuchung von verschiedenen Signalwegen nachgewiesen werden. Die Beteiligung von extrinsischen Todesrezeptorsignalwegen und intrinsischen Signalwegen an der Staurosporin-induzierten Apoptose sollte geklärt werden. Die intrinsischen Signalwege mit Beteiligung von PIDDosom, ER-Stress-Signalweg und mitochondrialer Signalweg sollten auf eine Beteiligung an der Staurosporin-induzierten Apoptose hin untersucht werden. Der Einfluss von pro- und antiapoptotischen Proteinen sollte dabei gesondert untersucht werden. In der Erwartung des Nachweises eines neuen Signalweges sollten die beteiligten Proteine gefunden und deren Interaktionspartner bestimmt werden. Insbesondere sollte der erwartete Einfluss von Staurosporin auf Phosphorylierungen in der Apoptose detektiert und wenn möglich die dabei von Staurosporin gehemmte Kinase bestimmt werden.

Da das Staurosporinanalogue 7-Hydroxy-Staurosporin (UCN-01) dem Staurosporin im Apoptosemuster ähnelt, wurde es mit in diese Arbeit aufgenommen und in gleicher Weise untersucht.

3 Material + Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Reagenzien - Herstellerverzeichnis

Amersham Pharmacia, Freiburg

Molekulargewichtsmarker ("Rainbow Colored Protein"), SDS-PAGE Molekulargewichtsmarker ("LMW"), PVDF-Membranen (Hybond^P-ECL-Membran), Western Blot-ECL-Detection-Kit

Apotheke des Universitätsklinikums Tübingen

Daunorubicin, Mitomycin C

Bachem, Heidelberg

Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketon (zVAD-fmk)

Biomol, Hamburg

fluorogenes Caspase-Substrat (DEVD-AMC)

BioRad, München

Bradford-Reagenz, Coomassie R-250

Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden

Etoposid

Fluka

Daunorubicin, CHAPS

Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe

HEPES, Penicillin-Streptomycin, DMEM-Medium, RPMI-1640-Medium

MoBiTec, Göttingen

SDS-PAGE Molekulargewichtsmarker ("BOA")

PAA Laboratories, Cölbe

Fötale Kälberserum (FCS)

Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, Staurosporin, (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT)

Roth, Karlsruhe

Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30), Ammoniumperoxodisulfat (APS), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure

(EGTA), Ethidiumbromid, Natriumdodecylsulfat (SDS), Rinderserumalbumin (BSA), Tetraethylmethylen-diamin (TEMED), Triton X-100, Milchpulver, Silbernitrat, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), BIS-TRIS, Saccharose (Sucrose), Magnesiumchlorid, Glycin, Calciumchlorid

Sigma, Deisenhofen

Actinomycin D, Ampicillin, 2'-Desoxyadenosin 5'-triphosphat (dATP), Dimethylsulfoxid (DMSO), Dithiothreitol (DTT), Glycerin, Isopropylthiogalactosid (IPTG), Kanamycin, 3-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS), Natriumarsenit, Nonidet P-40, 5-Aza-2'-desoxycytidin, 5-Azacytidin, Propidiumiodid (PI), Tween-20, anti-FLAG-M2-Agarose, Digitonin, Trizma[®] (Tris-HCl), Natriumfluorid

Alle übrigen Reagenzien wurden in reinster Form (p. a.), falls nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

3.1.2 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

Name	Beschreibung	Hersteller
Anti-CD95	monoklonaler Maus-Antikörper (IgM), der den humanen CD95-Rezeptor erkennt und agonistisch Apoptose induziert	Biomol
Anti-PARP	monoklonaler Maus-Antikörper, der die p116-Form und die prozessierte p85-Form von humanem PARP erkennt (Immunogen: aa 216-375)	Qbiogene-Alexis pab-10277
Anti-Caspase-3	monoklonaler Maus-Antikörper, der die Voll-Längen-p32- und die prozessierte p20/p17-Form der humanen Caspase-3 erkennt (Immunogen: aa 25-145)	BD Biosciences #C31720
Anti-Caspase-8	monoklonaler Maus-Antikörper, der die Voll-Längen-p55/p53- und die prozessierten p43/p41-Intermediärfragmente und die p18-Form der humanen Caspase-8 erkennt	BioCHECK
Anti-Caspase-9	polyklonaler Hase-Antikörper, der die Voll-Längen-p46- und die prozessierte p20/p17-Form der humanen Caspase-9 erkennt (Immunogen: aa 25-145)	Eigenproduktion [Charles River (Hase 1)]
Anti-Cytochrom c	monoklonaler Maus-Antikörper, der die Voll-Längen-Form p14 des humanen Cytochrom c erkennt (Immunogen: aa 62)	Pharmingen #556433
Anti-FLAG-M2	monoklonaler Maus-Antikörper, der das FLAG-Tag	Sigma

	von Fusionsproteinen erkennt (Sequenz: MDYKAFDNL)	A2220
anti-Maus-IgG	sekundärer monoklonaler Ziege-Antikörper, der die schwere und leichte Kette von Maus-IgG erkennt, Meerrettichperoxidase-gekoppelt	BioRad #172-1011
anti-Hase-IgG	sekundärer monoklonaler Ziege-Antikörper, der die schwere und leichte Kette von Hase-IgG erkennt, Meerrettichperoxidase-gekoppelt	BioRad #172-1019
anti-Bcl-2	monoklonaler Maus-Antikörper, der die p23-Form von humanem Bcl-2 erkennt	Transduction Labs (610538)
anti-Apaf-1	monoklonaler Maus-Antikörper, der die p130-Form und die prozessierte p85-Form von humanem Apaf-1 erkennt (Immunogen: aa 216-375)	Transduction Labs (92820)
anti-phospho-Tyrosin	verschiedene Antikörper gegen Phospho-Tyrosin-Epitope: <p>pTyr-16F4 IgG1 pTyr-2A5 IgG1 pTyr-2C8 IgG1 pTyr-3B12 IgG1 pTyr-9H8 IgG1</p> 4G10	nanotools R. Lammers, Unikl. Tübingen
anti-phospho-Threonin	verschiedene Antikörper gegen Phospho-Threonin-Epitope: <p>pThr-4D11 IgM pThr-1E11 IgG1 pThr-14B3 IgG1</p>	nanotools
anti-phospho-Serin	verschiedene Antikörper gegen Phospho-Serin-Epitope: <p>pSer-7F12 IgG1 pSer-4H4 IgM pSer-4A9 IgM pSer-4A3 IgM pSer-1C8 IgM pSer-16B4 IgM</p>	nanotools
anti-IgM	sekundärer monoklonaler Ziege-Antikörper, der das F(ab') ₂ -Fragment von Maus-IgM erkennt, Meerrettichperoxidase-gekoppelt	Dianova

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Material

RPMI-1640 Medium (BioWhitacker)	
DMEM-Medium (GIBCO/Invitrogen Life Technologies)	
1x PBS-Lösung (GIBCO/Invitrogen Life Technologies) pH 7,4	10 mM Natriumphosphat 150 mM Natriumchlorid
Penicillin-Streptomycin-Lösung (BioWhitacker)	10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin Die Lösung wurde 1%ig eingesetzt.
HEPES-Lösung (GIBCO/Invitrogen Life Technologies)	1 M HEPES Die Lösung wurde 1%ig eingesetzt.
10x Trypsin/EDTA-Lösung (Sigma)	5 g/l Trypsin 2 g/l EDTA 0,9% Natriumchlorid 1:10 in PBS (Invitrogen) verdünnt.
Fötale Kälberserum (PAA Laboratories)	Vor Gebrauch wurde für 30 min bei 56°C das Komplementsystem inaktiviert.
G418 (Geneticin [®])	Einsatz bis max. 800 µg/ml

Alle Zelllinien wurden, falls nicht anders vermerkt, in Kulturflaschen (50-800 ml, Nalgene Nunc Intl.) oder Mikrotiterplatten (6-, 12-, 24-, oder 96-Well-Format, BD Biosciences) bei 37°C mit 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre gezüchtet. Die Suspensionszelllinien wurden alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:10 verdünnt und passagiert. adhärenente Zelllinien wurden 1-2-mal pro Woche nach Behandlung mit Trypsin/EDTA-Lösung im Verhältnis 1:10 passagiert.

Jurkatzellen vector/Bcl-2-ER/Bcl-2-Mito/Bcl-2-wt stammen aus dem Labor von PD Dr. Claus Belka, Universitätsklinik Tübingen. Jurkat Caspase-9-negativ und Jurkat Caspase-9-positiv stammen aus dem Labor von Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff, Universität Düsseldorf. SK-mel-Zelllinien entstammen dem Labor von Soengass. Prostatazelllinien DU145 mock und DU145 bax kommen aus dem Labor von PD Dr. Peter Daniel, Charité Berlin. Allen möchte ich dafür danken, diese Zelllinien für meine Arbeit zur Verfügung gestellt zu haben.

Tabelle 6: Verwendete Zelllinien.

Name	Beschreibung	Kulturmedium
Jurkat (J16)	Humane T-Zelllinie (Subklon 16), in Suspension	RPMI 1640, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 10 mM HEPES
MCF-7 _{Vektor}	Humane Mamma-Karzinom-Zelllinie, Caspase-3 defizient, stabil mit Kontrollvektor transfiziert, adhärent	
MCF-7 _{Bcl-2}	Humane Mamma-Karzinom-Zelllinie, stabil transfiziert mit Caspase-3, adhärent	
Jurkat A3 wt	Humane T-Zelllinie, in Suspension	
Jurkat A3 FADD ^{-/-}	Humane T-Zelllinie, FADD-defizient, in Suspension	
Jurkat A3 Caspase-8 ^{-/-}	Humane T-Zelllinie, Caspase-8-defizient, in Suspension	
Jurkat vector	Humane T-Zelllinie, stabil mit Kontrollvektor transfiziert, in Suspension	
Jurkat Bcl-2 wt	Humane T-Zelllinie, stabil mit Bcl-2 transfiziert, in Suspension	

Jurkat Bcl-2 ER	Humane T-Zelllinie, stabil mit Bcl-2 (mit ER-Signalsequenz) transfiziert, in Suspension	
Jurkat Bcl-2 Mito	Humane T-Zelllinie, stabil mit Bcl-2 (mit mitochondrialer Signalsequenz) transfiziert, in Suspension	
Jurkat Bcl-X _L	Humane T-Zelllinie, stabil mit Bcl-X _L transfiziert, in Suspension	
JE 6.1	Humane T-Zelllinie, in Suspension	
JM 319	Humane T-Zelllinie, in Suspension	
Jurkat Caspase-9-negativ	Humane T-Zelllinie, Caspase-9-defizient, in Suspension	
Jurkat Caspase-9-positiv	Humane T-Zelllinie, Caspase-9-retransfiziert (FLAG-Signalsequenz, N-terminal), in Suspension	
MEF 3T9 wt	murine embryonale Fibroblasten, adhären	
MEF 3T9 Apaf-1 ^{-/-}	murine embryonale Fibroblasten, Apaf-1-defizient, adhären	
MEF 3T9 Caspase-9 ^{-/-}	murine embryonale Fibroblasten, Caspase-9-defizient, adhären	
DU 145 mock	humane Prostatazelllinie, adhären	
DU 145 bax	humane Prostatazelllinie, stabil mit Bax transfiziert, adhären	
SK-mel-19	humane Melanom-Zelllinien,	Dulbecco's modified Eagle

SK-mel-29	Apaf-1-reich, (SK = Sloane-Kettering Cancer Centre, New York)	Medium, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin
SK-mel-94	humane Melanom-Zelllinie, Apaf-1-defizient	
SK-mel-103	humane Melanom-Zelllinien,	
SK-mel-147	Apaf-1-arm	

3.2.1.2 Kryokonservierung von eukaryontischen Zellen

Die Kryokonservierung eukaryontischer Zellen erfolgt mit DMSO zum Zellschutz. DMSO unterdrückt während des Einfrierens die Entstehung von Wasserkristallen und verhindert damit die Zellwandzerstörung. Die Zellen werden abzentrifugiert und in Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) aufgenommen (ca. $20\text{--}30 \times 10^6$ Zellen/ml) und zu 1 ml aliquotiert. Anschließend ca. 48 h bei -80°C gelagert und weiter in Flüssigstickstoff (-196°C) überführt. Alle Einfrierschritte werden rasch und bei 4°C durchgeführt.

Das Auftauen der Zellen geschieht durch schnelle Erwärmung auf 37°C , sofortiges Aufnehmen in 20 ml Zellkulturmedium. Anschließend Zentrifugation und Aufnahme des Pellets in 20 ml Zellkulturmedium. Es schließt sich eine Regeneration der Zellen von mindestens zwei Tage in der Zellkultur an, bevor Experimente durchgeführt werden.

3.2.1.3 Apoptose-Induktion

In der vorliegenden Arbeit wurde Apoptose durch verschiedene Stimuli induziert. Die Vorratslösungen der verschiedenen Apoptosestimuli/-inhibitoren wurden bei -20°C gelagert.

Tabelle 7: verwendete Stimuli

Etoposid (Sigma-Aldrich)	20 mg/ml in DMSO/Ethanol Finalkonzentration 25–100 $\mu\text{g/ml}$
Mitomycin C (MEDAC Arzneimittel AG)	1 mg/ml in H_2O bidest. Finalkonzentration 25–50 $\mu\text{g/ml}$
Staurosporin (Roche und Biomol)	2,5 mM in DMSO/Ethanol Finalkonzentration 2,5–10 μM
UCN-01	10 mM in DMSO/Ethanol (1:1)

(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)	Finalkonzentration 5–10 μM
agonistischer Anti-CD95-Antikörper (BioCHECK)	330 $\mu\text{g/ml}$ in PBS Finalkonzentration 0,1-1 $\mu\text{g/ml}$
TRAIL (R&D Systems)	20 $\mu\text{g/ml}$ in PBS (-70°C) Finalkonzentration 40 ng/ml
Caspaseinhibitor zVAD-fmk (Bachem)	20 mM in DMSO/Ethanol Finalkonzentration 50-100 μM

Für die Zytostatika-, Staurosporin- oder Todesrezeptor-vermittelten Apoptose wurden die Stimuli aus hochkonzentrierten Vorratslösungen dem Zellkulturmedium zugesetzt und die Zellen für die angegebenen Zeiten in diesen Medien belassen ($37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$). Danach folgte die weitere Verarbeitung. Die Inkubation mit dem Caspaseinhibitor zVAD-fmk erfolgte jeweils 30 min vor Zugabe der Stimuli in gleicher Weise; anschließend folgt die Stimulationszeit mit den Apoptosestimuli in ungewechseltem Medium.

3.2.2 Zellbiologische Nachweismethoden des Zelltods

3.2.2.1 zytofluorimetrischer Nachweis von hypodiploiden Zellkernen

Während der Apoptose wird die zelluläre DNA durch DNasen internukleosomal gespalten [37]. Die entstehenden DNA-Fragmente können durch die Kernporen den Zellkern verlassen, so dass dieser sukzessive DNA verliert. Der Verlust an DNA kann durch Anfärbung der im Kern verbliebenen DNA mit Propidiumiodid sichtbar gemacht werden und dient als quantitatives Maß zur Apoptosemessung (Methode nach Nicoletti et al. [193]). Die Nuklei werden durch hypotone Zellyse präpariert und die nukleäre DNA mit Propidiumiodid angefärbt. Die Quantifizierung erfolgt durchflusszytometrisch und alle Zellkerne mit weniger als dem diploiden DNA-Gehalt (G_0/G_1 -DNA-Gehalt) werden als apoptotisch betrachtet.

Material

hypotoner Lysepuffer	1% (w/v) Natriumcitrat 0,1% (v/v) Triton X-100 50 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid in H_2O bidest.
----------------------	--

Jeweils $2\text{--}5 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung wurden in 96-well-Platten (bzw. 1×10^5 Zellen in 24-well-Platten) für 24–36 h mit den angegebenen Apoptosestimuli behandelt. Das Zellkulturmedium wurde durch Zentrifugation entfernt und die Zellen in hypotonem Lysepuffer für 5 min lysiert (100 μl /well). Weitere Lagerung der Proben auf Eis. Anschließend Analyse der roten Fluoreszenz der Zellkerne (585 nm) im Durchflusszytometer (FACSCalibur, BD Biosciences) analysiert. Die apoptotischen, hypodiploiden Zellkerne mit reduzierter roter Fluoreszenz ließen sich im FL2-Histogramm als sub-diploide G_0/G_1 -Population prozentual erfassen.

3.2.2.2 zytofluorimetrischer Nachweis Propidiumiodid-positiver Zellen

Der Nachweis der Integrität der Zellmembran kann mittels Propidiumiodid-Färbung der Zellen erfolgen. Gesunde Zellen mit intakter Zellmembran zeigen keine DNA-Färbung. Tote Zellen weisen eine permeable Zellmembran auf, durch die Propidiumiodid in die Zelle eindringen und in die nukleäre DNA interkalieren kann. Die resultierende rote Fluoreszenz lässt sich durchflusszytometrisch nachweisen. Bei dieser Methode kann nicht zwischen Nekrose und der im Rahmen der Apoptose spät auftretenden sekundären Nekrose unterschieden werden. Dieses Messsystem ist daher nicht geeignet Apoptose nachzuweisen.

Material

1x Trypsin/EDTA-Lösung	(Invitrogen)
Propidiumiodid-Färbelösung	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Propidiumiodid in 1x PBS

Jeweils $3\text{--}5 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung wurden in 96-well-Platten (bzw. 1×10^5 Zellen pro Vertiefung in 24-well-Platten) für die angegebenen Zeiten mit den verschiedenen Apoptosestimuli behandelt. Bei adhären Zellen wird das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung von der Zellkulturplatte abgelöst. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt (5 min/200g), in der Propidiumiodid-Färbelösung aufgenommen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die weitere Lagerung erfolgte auf Eis. Anschließend wurde die rote Fluoreszenz im Durchflusszytometer (FACSCalibur, BD Biosciences) bei 585 nm analysiert. Die Zellen mit gestörter Membranintegrität lassen sich im FL2-Kanal als Population mit erhöhter roter Fluoreszenz oberhalb der gesunden Kontrollpopulation prozentual erfassen.

3.2.2.3 Annexin-V-Färbung mit Propidiumiodid-Gegenfärbung

Um den Nachteil der fehlenden Spezifität für apoptotische Zellen der vorstehenden Nachweismethode zu beheben, wird eine Kombination mit der Anfärbung von Phosphatidylserin mit Annexin-V-FITC-gekoppelt angewandt. Phosphatidylserin befindet sich in der gesunden Zelle am inneren Blatt der Zellmembran. Bei apoptotischen Zellen klappt es auf die Außenseite und kann dort von Annexin-V gebunden werden. In sekundär-nekrotischen und nekrotischen Zellen ist die Zellmembran für Annexin-V durchlässig und es kommt zur falsch-positiven Färbung mit Annexin-V. Diese Zellen lassen sich gut durch die Gegenfärbung mit Propidiumiodid erkennen und durchflusszytometrisch separieren. [194]

Material

Annexin-V-Färbepuffer	10 mM HEPES-NaOH pH7,4 140 mM Natriumchlorid 5 mM Kalziumchlorid 2 µg/ml Propidiumiodid (PI)
Annexin-V-FITC	Stammlösung: 2,2 mg/ml in: 40 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM Natriumchlorid, 1 mM DTT, 0,05 % NaN ₃ Endkonzentration: 44 µg/ml

Jeweils $3-5 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung wurden in 96-well-Platten (bzw. 1×10^5 Zellen pro Vertiefung in 24-well-Platten) für die angegebenen Zeiten mit den verschiedenen Apoptosestimuli behandelt. Bei adhärennten Zellen wird das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung von der Zellkulturplatte abgelöst. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt (5 min/200g), in der Propidiumiodid-Annexin-V-Färbelösung (Annexin-V-Färbepuffer + 44 µg/ml Annexin-V-FITC) aufgenommen und für 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die rote PI-Fluoreszenz bei 585 nm und die grüne FITC-Fluoreszenz bei 615 nm im Durchflusszytometer (FACSCalibur, BD Biosciences) analysiert. Apoptotische Zellen sind Annexin-V-positiv und Propidiumiodid-negativ und im rechten unteren Quadranten des Messdiagramms zu finden. Die nekrotischen Zellen mit gestörter Membranintegrität lassen sich im FL2-Kanal als Population mit erhöhter roter Fluoreszenz oberhalb der gesunden Kontrollpopulation erfassen.

3.2.2.4 Nachweis der Zellvitalität im MTT-Test

Die Grundlage dieses Zellvitalitätstests ist die in vitalen Zellen erfolgende Dehydrogenase-vermittelte NADH/NADPH-abhängigen Reduktion des gelben 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) zum blauen Formazansalz, welches bei $\lambda_{550\text{nm}}$ gegen $\lambda_{690\text{nm}}$ (Referenzwellenlänge) photometrisch gemessen wird. Diese Reaktion findet statt, wenn die Mitochondrien der Zelle intakt sind und die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH produzieren. Die Menge an produziertem NADH/NADPH ist der Vitalität der Zellen proportional. Die Menge des entstehenden blauen Formazans ist ein relatives Maß für die Zellvitalität. In der vorliegenden Arbeit wurde der MTT-Test modifiziert nach Heeg et al. [195] durchgeführt.

Material

MTT-Lösung	5 mg/ml MTT in PBS
SDS-Lösung	10% (w/v) SDS in H ₂ O bidest.

5–10x10⁴ Zellen pro Vertiefung (96-well-Format) wurden in einem finalen Volumen von 150 µl mit verschiedenen Stimuli behandelt und für die angegebenen Zeiten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 10 µl MTT-Lösung zugegeben und der Ansatz für weitere 5 h im Brutschrank kultiviert. Das entstandene blaue Formazan wurde durch Zugabe von 100 µl 10% SDS und weiteren 3 h Inkubation in Lösung gebracht. Danach erfolgte die spektrophotometrische Auswertung bei der Wellenlänge von 550 nm (Referenzwellenlänge 690 nm).

3.2.2.5 Messung des mitochondrialen Membranpotentials

TMRE ist ein Farbstoff, der sich in die Membran von Mitochondrien einlagert. Die Anregung durch Laserlicht (488 nm) ergibt eine Fluoreszenz im roten Bereich. Durch die Ladungsverhältnisse im intakten Mitochondrium wird diese Fluoreszenz verstärkt. Die Verstärkung ist ein direktes Maß für das herrschende Membranpotential an der inneren mitochondrialen Membran und kann mit dem Durchflusszytometer gemessen werden. Durch membranschädigende Agenzien nimmt Membranpotential und damit die Fluoreszenz von TMRE ab.

Material

TMRE-Lösung	25µg/ml TMRE in PBS (Endkonzentration 25 nM)
-------------	---

5–10x10⁴ Zellen pro Vertiefung (96-well-Format) wurden in einem finalen Volumen von 200 µl mit verschiedenen Stimuli behandelt und für die angegebenen Zeiten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde TMRE-Lösung zugegeben und der Ansatz für weitere 20 min im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde die rote Fluoreszenz ($\lambda_{585 \text{ nm}}$) im Durchflusszytometer (FACSCalibur, BD Biosciences) analysiert. Zellen mit gestörtem Membranpotential sind im FL2-Histogramm mit geringerer Fluoreszenz prozentual erfassbar.

3.2.2.6 Präparation von Zelllysaten

Die behandelten Zellen werden durch Zentrifugation (300g, 5 min) gesammelt. Die Pellets werden in PBS gewaschen. Das trockene Zellpellet wird bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die Aufarbeitung erfolgt mit einem Lysepuffer, der die Zellen aufschließt. Die Lyse wird 10 min auf Eis unter „vortexen“ durchgeführt. Der Zelldebris wird durch Zentrifugation (16000g, 10 min, 4°C) entfernt. Ein Teil des Überstands wird zur Bestimmung des Proteingehaltes verwendet. Die Hauptmenge wird nach Einstellung auf einen gewünschten Proteingehalt mit 4x SDS-Auftragepuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Die so erhaltenen Proben verwendet man für SDS-PAGE-Gelelektrophorese.

Material

PBS-Lösung pH 7,4

Zellysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,6 150 mM Natriumchlorid 3 µg/ml Pepstatin A 3 µg/ml Leupeptin 3 µg/ml Aprotinin 1% (v/v) Triton X-100 2 mM PMSF
4x SDS-Auftragepuffer	250 mM Tris-Hydrochlorid 25,8% (v/v) Glycerin 8,2% (w/v) SDS (Roth) 0,04% (w/v) Bromphenolblau

4% (v/v) β -Mercapto-Ethanol

3.2.3 Biochemische Methoden

3.2.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford durchgeführt [196]. Das Prinzip dieses Tests ist die Anlagerung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 an Proteine, die eine Veränderung im Absorptionsverhalten des Farbstoffs bewirkt.

Material

5x Bradford-Lösung (BioRad)	Vor Gebrauch 1:5 in H ₂ O bidest. verdünnt.
BSA-Eichgerade	50-400 μ g/ml BSA (Roth) in PBS

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde im Mikromaßstab in 96-well-Platten durchgeführt. 1–10 μ l der zu untersuchenden Proteinlösung wurden mit 200 μ l 1xBradford Reagenz versetzt. Bei jeder Messung wurde eine Verdünnungsreihe von BSA (50 μ g/ml bis 400 μ g/ml) als interner Standard mitgeführt. Der Abgleich erfolgte gegen einen Reagenzienleerwert. Die Absorptionsmessung wurde im ELISA Reader (Dynatech MR5000) bei 630 nm (Referenzwellenlänge 405 nm) durchgeführt. Mit Hilfe der geräteeigenen Software wurden die Daten der BSA-Verdünnungsreihe ausgewertet und die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt.

3.2.3.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von Proteingemischen wurde die diskontinuierliche SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli verwendet [197]. Die Proteine werden mit Hilfe von SDS bei 95°C denaturiert und Disulfidbrücken mit β -Mercapto-Ethanol reduziert und gespalten. Die Anlagerung des anionischen Detergenz SDS an die linearisierte Polypeptidkette erfolgt proportional zur Länge des Polypeptids. Da jedes angelagerte SDS-Molekül einer negativen Ladung entspricht, ergibt sich für alle Proteine ein nahezu konstantes Ladungs-Masse-Verhältnis der SDS-Polypeptid-Aggregate. Die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel hängt damit allein von der Größe des Polypeptids ab. Mit Hilfe von mit aufgetragenen Molekulargewichts-Markern ist die Größe eines Proteins im direkten Vergleich bestimmbar. Durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Gel- und Puffersystems mit Sammel- und Trenngel wird das Auflösungsvermögen der SDS-PAGE wesentlich erhöht.

Material

Acrylamid-Lösung (Roth)	29,2% (w/v) Acrylamid 0,8% (w/v) Bisacrylamid in H ₂ O bidest.
APS-Lösung	10% (w/v) APS in H ₂ O bidest.
TEMED	(Roth)
Sammelgel-Puffer	0,74% (w/v) SDS 1 M Tris-Hydrochlorid pH 6,8
Trenngel-Puffer	0,384% (w/v) SDS 1,5 M Tris-Hydrochlorid pH 8,8
4x SDS-Auftragspuffer	250 mM Tris-Hydrochlorid 25,8% (v/v) Glycerin 8,2% (w/v) SDS (Roth) 0,04% (w/v) Bromphenolblau 4% (v/v) β -Mercapto-Ethanol
1x Elektrodenpuffer	0,1% (w/v) SDS 1,9 M Glycin 250 mM Tris-Hydrochlorid

Für eine Trennung mit nachfolgendem Western-Blot wurde eine Schichtdicke von 1,5 mm gewählt. Für die Anwendung als Gel für die Coomassie- oder Silberfärbung werden 1,0 mm Schichtdicke gewählt. Standardgele haben das Format 16x18 cm (Höfer-Kammer, Amersham Biosciences), Mini-Gele das Format von 8x10 cm (BioRad). Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,1% (v/v) TEMED gestartet und die polymerisierende Lösung sofort verwendet. Das Trenngel wurde unmittelbar nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 60 min wurde der Alkohol durch Spülen mit H₂O bidest. entfernt und das Sammelgel gegossen. Aus den Vorratslösungen wurden die Gelmischungen hergestellt. Sie enthielten:

Komponente	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid/Bisacrylamid	5% (w/v)	6–15% (w/v)
Tris-Hydrochlorid pH 6,8	135 mM	-
Tris-Hydrochlorid pH 8,8	-	390 mM
SDS	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)
APS	0,1% (w/v)	0,05% (w/v)

Die Trennschärfe der Gele ist durch Anwendung der Gradienten-Gießtechnik erhöht worden. Dabei sind die Gewichtsprozent der Acrylamidmischung im unteren Bereich der Gele höher als im oberen Bereich.

Die zu testenden Proteinlösungen wurden mit SDS-Auftragspuffer (2-8x) versetzt, für 5 min bei 95°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in Elektrodenspuffer solange durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront die untere Gelkante erreicht hatte.

3.2.3.3 Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen

Für die Darstellung der Proteinbanden im Gel stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. Die einfachste Methode ist die Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R250. Das Prinzip dieser Färbung ist identisch mit dem der Proteinbestimmung nach Bradford [196]. Die Nachweisgrenze dieser Färbung liegt bei ca. 100 ng Protein pro Bande.

Material

Coomassie-Färbelösung	0,5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 (BioRad) 50% (v/v) Methanol (Merck) 7% (v/v) Essigsäure (Merck) in H ₂ O bidest.
Entfärbelösung	20% (v/v) Methanol (Merck) 7% (v/v) Essigsäure (Merck) in H ₂ O bidest.

Nach dem Lauf der SDS-PAGE wurde das Trenngel für 20–30 min in Coomassie-Färbelösung schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde das Gel in H₂O bidest. gespült und solange in der Entfärbelösung inkubiert, bis der Gelhintergrund farblos war. Danach wurde das Gel für 2 h mit 50% (v/v) Methanol-Lösung behandelt und zwischen zwei Cellophanfolien (Roth) getrocknet.

3.2.3.4 Silberfärbung von Proteingelen

Die Silberfärbung von SDS-PAGE-Gelen wurde nach der Methode von Rabilloud et al. [198] durchgeführt. Sie zeichnet sich durch eine 100–1000-fach größere Sensitivität im Vergleich zur Coomassie-Färbung aus (Nachweisgrenze 0,1–1 ng Protein pro Bande).

Material

Fixier-Lösung	50% (v/v) Methanol (Merck) 12% (v/v) Essigsäure (Merck) 0,0185% (v/v) Formaldehyd (Merck)
Thiosulfat-Lösung	0,8 mM Natriumthiosulfat (Merck) in H ₂ O bidest.
Imprägnier-Lösung	0,2% (w/v) Silbernitrat (Roth) 0,0278% (v/v) Formaldehyd (Merck)
Entwickler-Lösung	6%(w/v) Natriumcarbonat (Roth) 16 µM Natriumthiosulfat (Merck) 0,0185% (v/v) Formaldehyd (Merck)
Stopp-Lösung	50% (v/v) Methanol (Merck) 12% (v/v) Essigsäure (Merck)

Nach der SDS-PAGE wurde das Trenngel für die in der nachfolgenden Tabelle angegebenen Zeiten mit den verschiedenen Lösungen in einer Schwenkapparatur inkubiert:

Lösung	Zeit
Fixier-Lösung	60 min
mit 50% (v/v) Methanol in H ₂ O bidest. waschen	3x 20 min

Thiosulfat-Lösung	1 min
mit H ₂ O bidest. waschen	3x 20 s
Imprägnier-Lösung	20 min
mit H ₂ O bidest. waschen, jeweils	2x 30 s
Entwickler-Lösung	bis zur gewünschten Bandenintensität
Stopp-Lösung	10 min
50% (v/v) Methanol in H ₂ O bidest.	2 h

Anschließend wurde das Gel zwischen zwei Cellophanfolien (Roth) getrocknet.

3.2.3.5 Western Blot

Der Western Blot dient dem selektiven Nachweis eines Proteins mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Dazu müssen die im SDS-PAGE-Gel aufgetrennten Proteine aus dem Gel zunächst auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert werden. Der Nachweis erfolgt auf der Membran mit Hilfe von spezifischen Primärantikörpern und einem geeigneten Detektionssystem auf der Basis eines enzymmarkierten Sekundärantikörpers.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran im Nass-Tank-Verfahren durchgeführt und das auf Meerrettich-Peroxidase basierte "Enhanced-Chemiluminescence" (ECL)-Detektionssystem verwendet.

Material

PVDF-Membran "Hybond-P-ECL"	(Amersham-Pharmacia)
Filter-Papier	(Roth)
Transfer-Apparatur	(BioRad, Amersham)
Transfer-Puffer	2,93 g/l Glycin 5,28 g/l Tris Base 20% (v/v) Methanol
5% Milchpulver-Lösung	5% (v/v) fettarmes Milchpulver

	1x TBS + 0,02% (v/v) Triton X-100
1x TBS + 0,02% (v/v) Triton X-100	10 mM Tris-Hydrochlorid 150 mM Natriumchlorid 0,02% (v/v) Triton X-100 pH 8,0
Primärantikörper-Lösung	0,5-2 µg/ml in TBS 0,02%-Triton X-100
Sekundärantikörper-Lösung	Sekundärantikörper-Vorratslösung, Peroxidase-markiert (BioRad) 1:4000 verdünnt in 5% Milchpulver
Western Blot-ECL-Detection Kit	(Amersham-Pharmacia)
Hyperfilm-ECL	(Amersham-Pharmacia)

Der Zusammenbau des Blots erfolgte in kaltem Transfer-Puffer. Der Zusammenbau erfolgt mit der Ausrichtung: (Anodenseite) - Transferschwamm - Filterpapier - PVDF-Membran – Gel - zwei Lagen Filterpapier - Transferschwamm - (Kathodenseite). Die Kassette wurde geschlossen, in den Transfertank überführt und dieser mit kaltem Transfer-Puffer aufgefüllt. Der Transfer wurde für 90-120 min bei 0,5 A und 4°C durchgeführt. Im Anschluss wurden die unspezifischen Bindungsstellen der PVDF-Membran durch einstündige Inkubation mit 5% Milchpulver-Lösung bei Raumtemperatur blockiert und der Blot 2x mit TBS 0,02% (v/v) Triton X-100 gewaschen. Die Inkubation mit der entsprechenden Primärantikörper-Lösung wurde über Nacht bei 4°C (1 h bei Raumtemperatur) durchgeführt. Danach wurde die Membran 5x für 3 min mit TBS 0,02% (v/v) Triton X-100 gewaschen und für 1 h mit der entsprechenden Sekundärantikörper-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde der Blot weitere 6x für 10 min mit TBS 0,02% (v/v) Triton X-100 gewaschen.

Zur Detektion wurden gleiche Volumina der Detektionsreagenzien A und B (Western Blot-ECL-Detection-Kit, Amersham-Pharmacia) gemischt, die Membran darin für 1 min inkubiert, in der Dunkelkammer ECL-Filme (Hyperfilm-ECL, Amersham-Pharmacia) für verschiedene Expositionszeiten aufgelegt und anschließend maschinell entwickelt (AGFA, Classic E.O.S.).

3.2.4 Biochemische Nachweismethoden der Apoptose

Die im Rahmen der Apoptose stattfindende Caspase-Aktivierung durch proteolytische Prozessierung und die anschließende Spaltung von Caspase-Substraten kann man als biochemische Messparameter der Apoptose heranziehen.

3.2.4.1 Western Blot-Analyse der Caspase- und Caspase-Substrat-Prozessierung

Die proteolytische Prozessierung der Caspasen und Caspase-Substrate (z.B. Poly(ADP-Ribose)-Polymerase, PARP) sowie die weiteren Proteinnachweise wurden in der vorliegenden Arbeit durch Western Blot-Analyse nachgewiesen.

Material

PBS	10 mM Natriumphosphat 150 mM Natriumchlorid pH 7,4
Lysepuffer	50 mM Tris-Hydrochlorid 150 mM Natriumchlorid 20 mM Natriumpyrophosphat 10 mM Natriumfluorid 1 mM Natriumvanadat 3 µg/ml Pepstatin A 3 µg/ml Aprotinin 3 µg/ml Leupeptin 2 mM PMSF 1% (v/v) Triton X-100
4x SDS-Auftragspuffer	250 mM Tris-Hydrochlorid 25,8% (v/v) Glycerin 8,2% (w/v) SDS 0,04% (w/v) Bromphenolblau 4% (v/v) β-Mercapto-Ethanol

2×10^6 Zellen pro Vertiefung wurden mit den verschiedenen Apoptosestimuli behandelt und für die angegebenen Zeiten im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt (8000g, 1 min), in kaltem PBS gewaschen und auf Eis für 10 min in

50–80 µl Lysepuffer lysiert. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (10.000g, 10 min) sedimentiert und der klare Überstand mit 1x SDS-Auftragspuffer versetzt. Die so präparierten Zell-Extrakte wurden für 5 min auf 95°C erhitzt und auf ein 6-15%iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Die Western Blot-Analyse erfolgte mit den zuvor angegebenen Primärantikörpern.

3.2.4.2 Fluorometrische Bestimmung der Caspase-Aktivität

Die im Verlauf der Apoptose auftretende Caspase-Aktivität wurde fluorometrisch bestimmt. Die Grundlage dieses Tests sind fluorogene Tetrapeptid-Substrate, aus denen durch caspase-vermittelte Spaltung das Fluorophor Aminomethylcumarin (AMC) freigesetzt wird. Nur in seiner freien Form weist AMC die typischen Fluoreszenz-Eigenschaften auf. Über eine Aufzeichnung der Fluoreszenz-Zunahme während der Reaktion lässt sich die relative Caspase-aktivität aus der Anfangssteigung der Fluoreszenzkurve ermitteln. Der Einsatz verschiedener Tetrapeptid-Substrate ermöglicht eine bedingte Spezifizierung der Caspase-Aktivität. Die durch Caspase-9 oder -8 aktivierte Caspase-3 ist hauptverantwortlich für die Spaltung von Ac-DEVD-fmk zu DEVD und dem Fluorophor Fluoromethylketon, dem im DEVDase-Assay genutzten Messparameter.

Material

Lysepuffer	20 mM HEPES
	84 mM Kaliumchlorid
	10 mM Magnesiumchlorid
	200 µM EDTA
	200 µM EGTA
	0,5% (v/v) NP-40
	1 mM PMSF
	1 mM DTT
	1 µg/ml Leupeptin
	1 µg/ml Pepstatin
5 µg/ml Aprotinin	
1x Reaktionspuffer	37,5 mM HEPES
	75 mM Natriumchlorid
	7,5% (w/v) D(+)-Sucrose

0,075% (w/v) CHAPS
 ,5 mM Calciumchlorid
 10 mM DTT
 50 μ M Ac-DEVD-AMC (Biomol)
 pH 7,4

1×10^5 Zellen pro Vertiefung wurden in 96-well-Platten mit den verschiedenen Apoptosestimuli für die angegebenen Zeiten behandelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt (200g, 5 min) und das trockene Zellsediment für 10 min auf Eis in 50 μ l Lysepuffer lysiert. Die Caspase-Aktivität wurde in einem finalen Volumen von 200 μ l 1x Reaktionspuffer bestimmt. Dazu wurde der Ansatz für 4 h bei 37°C inkubiert und währenddessen die Freisetzung von AMC fluorometrisch (λ_{ex} 360 nm, λ_{em} 450 nm) mit Hilfe des Micro Tek FLI-Fluorometers (Bio-Tek Kontron Instruments) alle 2 min gemessen. Mit der geräteeigenen Software (KC4) wurde die Anfangssteigung der kinetischen Kurve als relatives Maß der Caspase-Aktivität bestimmt.

3.2.4.3 Präparation von Zytosolextrakten

Zum Nachweis der intrazellulären Lokalisation von mitochondrialen Proteinen kann man Zytosol- und Mitochondriumextrakte getrennt präparieren und einer Western Blot-Analyse unterziehen. Die Methode beruht auf der unterschiedlichen Angreifbarkeit von Membranen durch Digitonin [199]. Durch Digitonin wird die Integrität der cholesterolreichen Zellmembran stärker gestört als die der cholesterolarme Mitochondrienmembran. Durch Wahl der richtigen Parameter kann man die Zellwand zerstören, während die Mitochondrienmembran noch intakt bleibt. Die Abtrennung der Mitochondrien erfolgt durch Zentrifugation.

Material

PBS	10 mM Natriumphosphat 150 mM Natriumchlorid pH 7,4
-----	--

1x mt-Puffer	70 mM Tris Base 0,25 M Saccharose mM EDTA pH 7,4
--------------	---

1x MES-Puffer	19,8 mM EGTA 19,8 mM EDTA 0,25 M D-Manitol 19,8 mM MES pH 7,4
1x MES/Digitonin-Puffer	163,1 μ M Digitonin (= 20 μ l von Digitonin - Stammlösung [10 mg/ml]/ml MES-Puffer) in MES-Puffer
4x SDS-Auftragspuffer	250 mM Tris-Hydrochlorid 25,8% (v/v) Glycerin 8,2% (w/v) SDS 0,04% (w/v) Bromphenolblau 4% (v/v) β -Mercapto-Ethanol

2×10^6 Zellen pro Vertiefung (6-well-Format) wurden, wie unter 3.2.1.3 beschrieben, mit den verschiedenen Stimuli für die angegebenen Zeiten behandelt und anschließend durch Zentrifugation gesammelt (8000g, 1 min). Die folgenden Schritte wurden strikt unter Kühlung auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden in kaltem PBS gewaschen und erneut sedimentiert (8000g, 1 min). Das Pellet wurde in 100 μ l mt-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Zur Suspension wurde gleiches Volumen MES/Digitonin-Puffer zugesetzt. In kurzen Zeitabständen wurden Proben (2–5 μ l) gezogen und eine mikroskopische Kontrolle der Zellen mit Trypanblau auf Permeabilisierung durchgeführt. Waren >90 % der Zellen angefärbt, wurden die Zellen sedimentiert (900g, 2 min), der Überstand abgenommen und abzentrifugieren (20000g, 5 min). Der Überstand stellt die cytosolische Fraktion dar. Die mitochondriale Fraktion findet sich im Pellet und wurde in 50 μ l mt-Puffer aufgenommen.

3.2.4.4 Präzipitation von FLAG-Sequenz tragenden Proteinen

Zur Aufreinigung von einzelnen Proteinen aus einem Proteingemisch bedient man sich der Technik der Präzipitation. Dafür benötigt man ein am gesuchten Protein angebrachten Marker und dem an einer Trägermatrix immobilisierten, diesen Marker erkennenden Gegenpart. Hier wurde eine an der Caspase-9 angebrachte FLAG-Sequenz verwendet, die vom anti-FLAG-M2-Antikörper erkannt wird. Der anti-FLAG-M2-Antikörper ist an Agarose ge-

koppelt. Durch saure Elution kann man die Antigen-Antikörper-Bindung lösen und das Protein gewinnen.

Material

anti-FLAG-M2-Agarose (Sigma)	FLAG-M2-Sequenz: MDYKAFDNL
Lysepuffer	50 mM Tris Hydrochlorid, pH 7.4 150 mM Natriumchlorid 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 3 µg/ml Aprotinin, 3 µg/ml Leupeptin, 3 µg/ml Pepstatin A, 20 mM Natriumpyrophosphat, 10 mM Natriumfluorid, 2 mM PMSF,
Waschpuffer	50 mM Tris HCl, pH 7.4 150 mM Natriumchlorid 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 20 mM Natriumpyrophosphat, 10 mM Natriumfluorid,
Elutionspuffer	0,1-M-Glycin-HCl, pH 2,93
Neutralisationspuffer	Tris, pH 8,0

2–3x10⁹ Zellen wurden in 30 Flaschen á 200 ml Kulturmedium gehalten und durch Zentrifugation (400–600g, 5 min) gesammelt. Die Staurosporin-behandelten Proben wurden in 4 Flaschen á 50 ml Medium für 30 min mit 2,5 µM Staurosporin versetzt. Die Zellen wurden in PBS gewaschen. Die Proben wurden in 35 ml Lysepuffer (Zugabe der Inhibitoren kurz vor Verwendung) unter wiederholtem Mischen über 10 min bei 4°C lysiert und anschließend die zellulären Proteine durch Zentrifugation (20.000g, 40 min, 4°C) vom Zelldebris abgetrennt. Der Lysatüberstand wurde zu 500 µl anti-FLAG-M2-Agarose pipettiert und für 1 h auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Agarose viermal mit Waschpuffer

gewaschen. Danach wurde die Agarose mit 500 µl Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde in 25 µl Neutralisationspuffer neutralisiert. Bestimmung des Proteingehaltes der Probe und Verwendung zur SDS-PAGE-Trennung mit anschließender Silberfärbung.

3.2.4.5 FPLC-Gelfiltration

Um Komplexe von Proteinen nachzuweisen, werden diese per Größenausschlusschromatographie von kleineren Proteinen getrennt. Die Chromatographie erfolgt aus dem zytosolischen Lysat der behandelten Zellen. Zur Kontrolle der Funktionalität des Versuches wird eine Positivkontrolle mit erzwungener Apoptosombildung durchgeführt. Die Komplexe lassen sich durch die Detektion ihrer Bestandteile per SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot nachweisen.

Material

Puffer A	20 mM HEPES, pH 7,5 1,5 mM MgCl ₂ 10 mM KCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 10 µg/ml Leupeptin 10 µg/ml Aprotinin 10 µg/ml Pepstatin 1 mM DTT 35 µM Natriumfluorid 3,3 mM Natriumpyrophosphat 0,1 mM PMSF
Stimulationsmix für Positivkontrolle (als 5-fach-Konzentrat angesetzt)	1 mM DTT 1,5 mM MgCl ₂ 2 mM dATP (Zugabe unmittelbar vor Verwendung!) 10 µM Cytochrom c 5% Endkonzentration Saccharose
FPLC-Anlage	BioLogic (BioRad)

Sepharose 6HR	(Amersham)
---------------	------------

Kalibrierungsreagenz	HMW-Standardmarker (Amersham)
----------------------	-------------------------------

6×10^9 Bcl-2-überexprimierende Zellen wurden in 30–40 Flaschen á 200 ml Kulturmedium gehalten und durch Zentrifugation (400-600g, 5 min) gesammelt. Die Staurosporin-behandelten Proben wurden in 4 Flaschen á 50 ml Medium für 30 min mit 2,5 μ M Staurosporin versetzt. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und in gleicher Menge Puffer A resuspendiert. 20 min auf Eis stehen gelassen und dann mit dem Dounce-Homogenisator (Spaltmaß: „THIGHT“) mit 35 Zyklen homogenisiert. Per Zentrifugation (50000g, 2 h, 4°C) wurde das Zelllysate in zytosolischen Überstand und Zelldebris getrennt (S100-Extrakt). Der Überstand wurde für weitere Verwendung abgenommen. Die Einstellung des Proteingehaltes erfolgte auf 25 mg/ml und wurde wenn nötig bei -70°C gelagert. Die Inkubation der Positivkontrolle wurde mit Stimulationsmix bei einer Protein-Endkonzentration von 25 mg/ml durchgeführt (30 min/37°C). Im Anschluss wurde das Inkubate direkt auf die Säule gegeben. 500 μ l des S100-Extraktes wurden auf eine Sepharose 6HR (10/30)-Säule aufgetragen und mit Puffer A (ohne Inhibitoren) per FPLC-Anlage aufgetrennt. Der Lauf wurde in Fraktionen von 500 μ l aufgefangen und per Western Blot sowie Caspase-Aktivitäts-Assay (MgCl₂-Konzentration angepasst) ausgewertet.

3.2.4.6 Massenspektroskopie

Die massenspektroskopischen Untersuchungen wurden von Alexander Beck, Uniklinik Tübingen durchgeführt.

Probenaufbereitung

Die aus dem Silbergel ausgeschnittenen Banden werden zerkleinert und 2x mit 200 μ l 50% CH₃CN in H₂O und 1x mit CH₃CN für 10, bzw. 5 min unter Umschütteln gewaschen. Darauf folgend wird nacheinander mit 100 μ l H₂O, 100 μ l 50% CH₃CN und 50 μ l CH₃CN gewaschen und mit einem Speedvac Konzentrator SC1100 (Savant, Farmingdale, NY, USA) getrocknet. Die Rehydrierung erfolgte auf Eis in 75 μ l Verdau-Puffer für 30 min. Überschüssiger Puffer wurde entfernt, der Verdau erfolgte 16 Stunden lang bei 37°C. Nach der Inkubation wurden die Peptide durch Zugabe von 1x 100 μ l NH₄HCO₃ sowie 2x 100 μ l 50% CH₃CN/5% Ameisensäure eluiert. Die Eluate wurden vereinigt und per Speedvac Konzentrator getrocknet.

Automatisierte LC-ESI-MS/MS Analyse

Die getrockneten Proben wurden in 10 µl 0,1% Essigsäure aufgenommen. 8 µl der Probe wurden in eine 1100 Series CapLC (Agilent, USA) injiziert. Nach der initialen Waschphase der Vorsäule (5 min, 6 µl/min, 0% Puffer B) wurde die analytische Säule zugeschalten. Es erfolgte eine Gradientenelution (200 nl/min), bei welcher das Eluat direkt mittels einer on-line Nano-Elektro-Spray-Quelle, bei Verwendung eines 10 µm PicoTip Emitters (New Objective, USA), in das Esquire3000plus Ionenfallen Massenspektrometer (Bruker-Daltonics, Bremen) infundiert wurde. Die MS/MS-Daten wurden per Matrix Science (Mascot Server) ausgewertet [200].

Einstellungen der Geräte

Gradient der HPLC-Anlage:

Puffer A: 0.1% Ameisensäure in Wasser (v/v)

Puffer B: 0.1% Ameisensäure, 80% ACN in Wasser (v/v/v)

Zeit	Anteil Puffer B
0 – 5 min	0 %
5 – 7 min	10 %
7 – 60 min	1 – 60 %

Massenspektrometer:

Die Ionisierung erfolgte im positiven Ionisierungsmodus. Die Elektrospray-Spannung betrug 1450 V. Der Trockengasfluss betrug 5 l/min bei einer Temperatur von 155 °C. Die maximale Akkumulationszeit (Beladung der Ionenfalle) betrug 200 msec. Die Beladung der Falle wurde automatisch über die Software kontrolliert (ICC 25000). Es wurde über einen Bereich von 200-2000 m/z gescannt. Bei der Fragmentierung wurden die Mutter-Ionen mit einer Breite von 2 amu (atomare Masseneinheiten) isoliert und bei einer Amplitude von 1.0 Volt zur Fragmentierung angeregt.

Material

Verdauungspuffer	50 nM NH ₄ HCO ₃ 1 mM CaCl ₂ 12,5 ng/µl Trypsin (hochrein) in H ₂ O
ACN	Acetonitril (CH ₃ CN)
Puffer A	0,1 % Ameisensäure in H ₂ O

Puffer B	80 % CH ₃ CN 0,1 % Ameisensäure in H ₂ O
Vorsäule	20 mm x 100 µm Zorbax-Extend RP (Agilent, Waldbronn)
Hauptsäule	100 mm x 75 µm Grom-SIL 120 ODS-3 CP Grom, Hailfingen-Rottenburg

3.2.4.7 Messung der MDR-Pumpenaktivität

Daunorubicin interkaliert in die DNA und ist dort fluorimetrisch messbar. Die Multi-Drug-Resistance-Pumpe (MDR-Pumpe) pumpt viele Giftstoffe aus der Zelle, unter anderem Daunorubicin. Bei aktivierter MDR-Pumpe kann die Interkalation nicht mehr stattfinden und nicht mehr detektiert werden [201].

Material

Daunorubicin (Sigma)

Die Zellen wurden mit Daunorubicin für 30 min inkubiert (37°C/5 % CO₂), anschließend mit Kulturmedium ausgewaschen. Nach weiteren 30 min wurden die Zellen fluorimetrisch per FACSCalibur gemessen (FL2). Die prozentuale Auswertung ungefärbter Zellen erfolgte per Software CellQuest.

4 Ergebnisse

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Beobachtung, dass der Kinaseinhibitor Staurosporin in der Lage ist, in chemotherapieresistenten Tumorzellen Apoptose zu induzieren [184]. Über den genauen Wirkmechanismus über den Staurosporin das endogene Selbstmordprogramm aktiviert, war bisher wenig bekannt. Folglich sollte zunächst untersucht werden, ob, und wenn ja, über welche der bekannten Signalwege von Staurosporin Apoptose induziert wird.

4.1 JM319-Jurkatzellen sind Chemotherapeutika-resistent und Staurosporin-sensitiv

In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der Jurkatklon JM319 im Gegensatz zur parentalen Jurkatzelllinie resistent gegenüber zytostatika-induzierter Apoptose ist [184]. Staurosporin ist jedoch in der Lage – wenngleich auch in höheren Konzentrationen – in den zytostatikaresistenten JM319-Zellen Apoptose auszulösen. Der zugrunde liegende Resistenzmechanismus ist bislang unbekannt.

Um herauszufinden, ob andere Stimuli ebenfalls keine Apoptose auslösen können, wurden die JM319-Jurkatlinie und Jurkatkontrollzellen (Jurkat vector) mit dem extrinsischen Stimulus TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Factor, statt anti-CD95) und den mitochondrialen Stimuli Etoposid und Mitomycin C (statt Daunorubicin), sowie Staurosporin in einer ansteigenden Konzentrationsreihe inkubiert. Die JM319-Zellen zeigten sich auch nach Stimulation mit Etoposid, Mitomycin C und TRAIL vor Apoptose geschützt, im Gegensatz zu den als Kontrolle eingesetzten Jurkatzellen. Diese zeigten deutlich Apoptose auf diese drei Stimuli. Staurosporin konnte Apoptose in Jurkatkontrollzellen und darüber hinaus in höheren Konzentrationen auch in JM319-Zellen auslösen. Staurosporin durchbricht demnach die Resistenz in den JM319-Zellen und löst Apoptose aus.

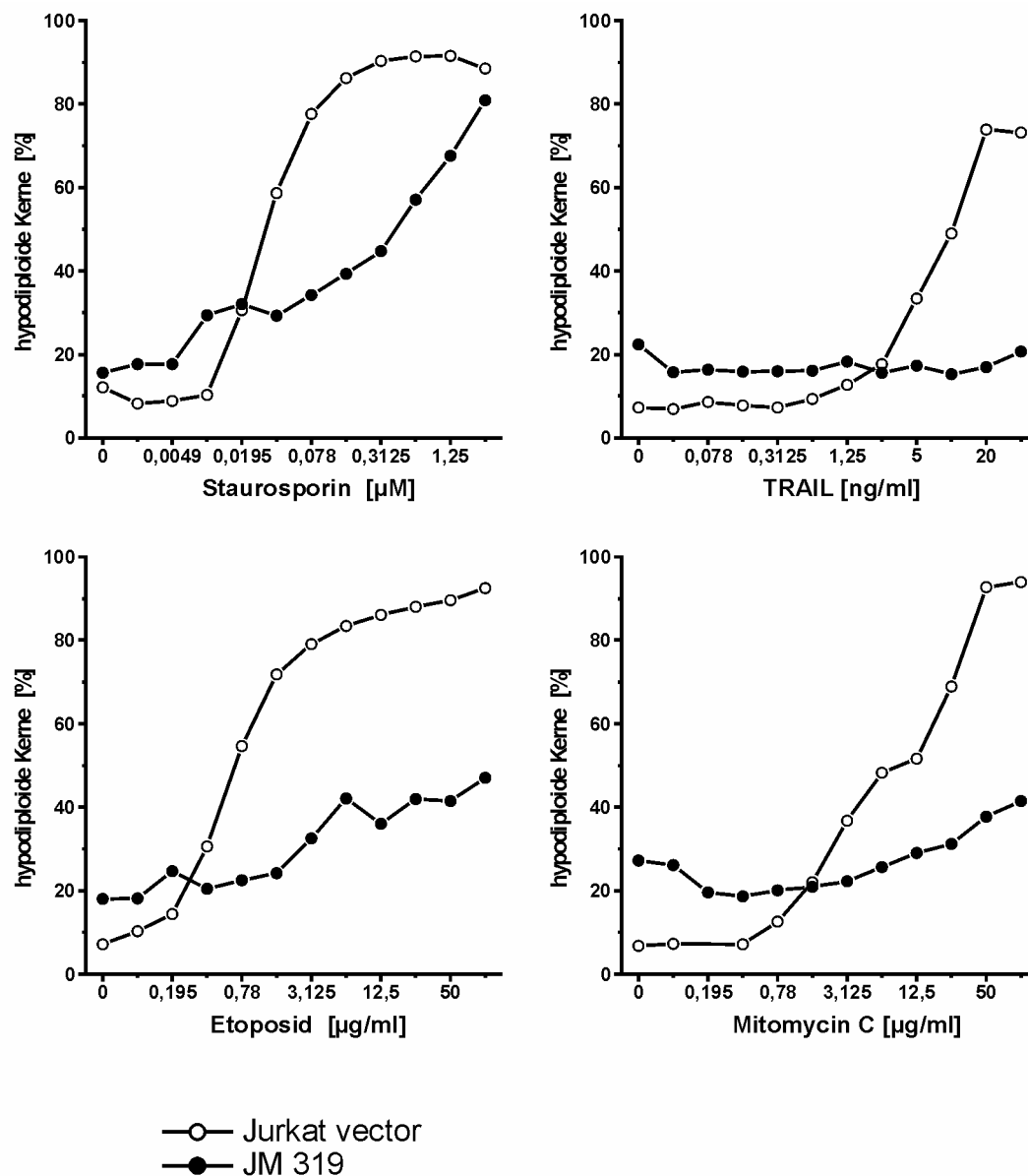


Abbildung 14: Kinetik und Titration von Staurosporin auf JM 319-Zellen und Jurkatzellen.

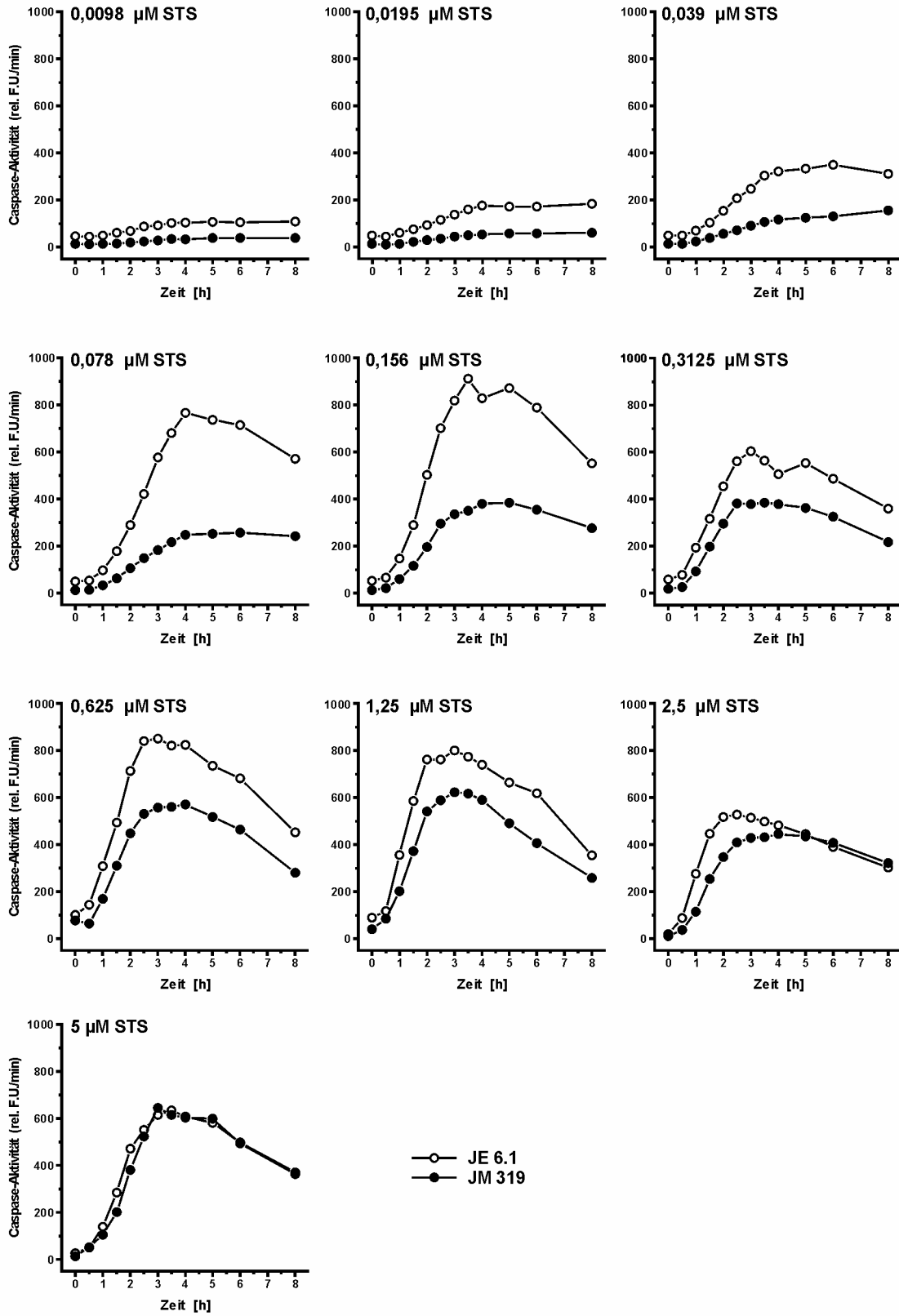
2×10^4 JM319-Zellen (●), bzw. Jurkatzellen (○) wurden mit den Stimuli Staurosporin, Etoposid, Mitomycin C und TRAIL in der jeweils angegebenen Konzentrationsreihe stimuliert. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden in einer 96-well-Gewebekulturplatte. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung der hypodiploiden Kerne als Maß der Apoptose mit der Methode nach Nicoletti et al. [193]. Auswertung der subdiploiden Zellkernfraktion als apoptotische Kerne (%) mit der Software CellQuest. Gezeigt sind die Mittelwerte von Duplikaten.

In Ergänzung der Ergebnisse von Abbildung 14 wurde eine Messung der Caspaseaktivität nach Titration mit Staurosporin durchgeführt. In JM319-Zellen zeigte sich eine deutliche Verzögerung der Auslösung von Caspaseaktivität im Gegensatz zu JE6.1-Jurkatkontrollzellen. In den JM319-Zellen war die Aktivität von Caspasen zunächst gering und erst bei hohen Staurosporinkonzentrationen wurde die Resistenz durchbrochen.

Abbildung nächste Seite:

Abbildung 15: Kinetik und Titration von Staurosporin auf JM 319-Zellen und Jurkat JE 6.1-Zellen.

5×10^4 JM319-Zellen (●), bzw. JE6.1-Jurkatzellen (○) wurden 0–8 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen an Staurosporin inkubiert (96-well-Gewebekulturplatte). Nach der Stimulation erfolgt die fluorimetrische Messung der DEVD-AMC-Spaltung durch aktive Caspasen im ELISA-Reader (37°C). Gezeigt sind die Mittelwerte von Duplikaten, bzw. Triplikaten.



Um auszuschließen, dass die Resistenz gegen Chemotherapeutika durch eine mögliche Aktivierung der Multi-Drug-Resistance-(MDR)-Pumpe verursacht ist, wurden die zytostatikaresistenten JM319-Zellen einer Behandlung mit Daunorubicin unterzogen. Daunorubicin interkaliert in die Zell-DNA und ist fluorimetrisch ($\lambda_{\text{ex}}488\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}580\text{nm}$) detektierbar. Ist in Zellen die MDR-Pumpe aktiviert, wird Daunorubicin sofort nach Eindringen wieder aus der Zelle entfernt [201] und interkaliert nicht in die DNA: Die Zelle ist resistent gegenüber Daunorubicin.

Wird Daunorubicin der Zellkultur von JM319-Zellen zugesetzt, so kann im Durchflusszytometer erkannt werden, ob in JM319-Zellen dieser Resistenzmechanismus aktiviert ist. Insgesamt konnte bei 90 % der JM319-Zellen eine Kernfärbung nachgewiesen werden. Die Zytostatikaresistenz in JM319-Zellen war folglich nicht durch eine Aktivierung der MDR-Pumpe bedingt.

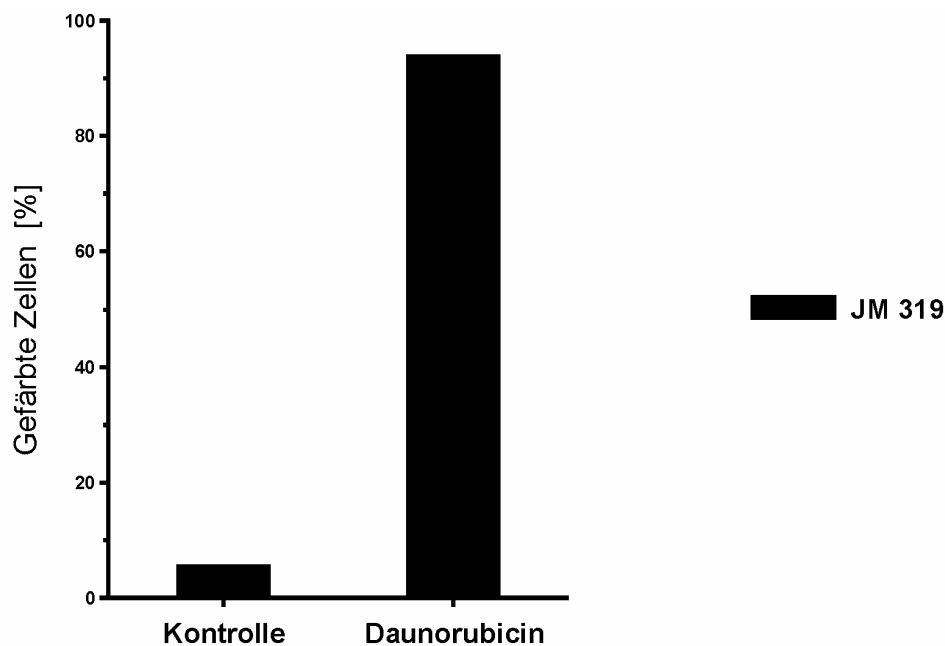


Abbildung 16: Resistenz der JM 319 Zellen liegt nicht in aktivierter Multi-Drug-Resistance-Pumpe begründet.

5×10^4 Jurkat-JM319-Zellen wurden mit Daunorubicin ($1 \mu\text{g/ml}$ in Kulturmedium) für 30 min und danach 30 min nur mit Kulturmedium inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung der Daunorubicin-gefärbten Zellen im FACSCalibur und Auswertung per Software CellQuest. Die Kontrollzellen wurden nur mit Kulturmedium behandelt.

Eine weitere Untersuchungsmethode zum Nachweis von Apoptose ist die Detektion von Proteinspaltungen per Western Blot. Eine Spaltung des Caspasesubstrats Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) oder der Caspasen-3, -8 und -9 weist Apoptose nach. In einer Inkubationskinetik mit Staurosporin wurden Unterschiede in den Zelllinien JE6.1 und JM319 deutlich. So war in JE6.1-Jurkatzellen bereits nach 3 Stunden eine vollständige Spaltung der PARP-p116-Volllängenform erkennbar. Bei JM319-Zellen hingegen zeigte sich die PARP-Spaltung deutlich verzögert und die p116-Form war selbst noch nach 4 Stunden nachweisbar. Ähnliche Resultate waren bei den Spaltmustern der Caspasen erkennbar. Die Effektorcaspase Caspase-3 zeigte eine rasche und vollständige Spaltung in JE6.1-Zellen, die in JM319-Zellen nicht auftritt. Caspase-8 wurde in JE6.1-Zellen deutlich schneller als in JM319-Zellen gespalten. Caspase-9 wurde in beiden Zellen nach dem gleichen Muster gespalten. Eine Spaltung von Caspase-9 an der Staurosporin-induzierten Apoptose ist demnach unabhängig von der Resistenz in JM319-Zellen. Die Aktivierung von Caspase-3 war in JM319-Zellen geringer und erklärt das verzögerte Auftreten der von Caspase-3 abhängigen Apoptosemerkmale in diesen Zellen.

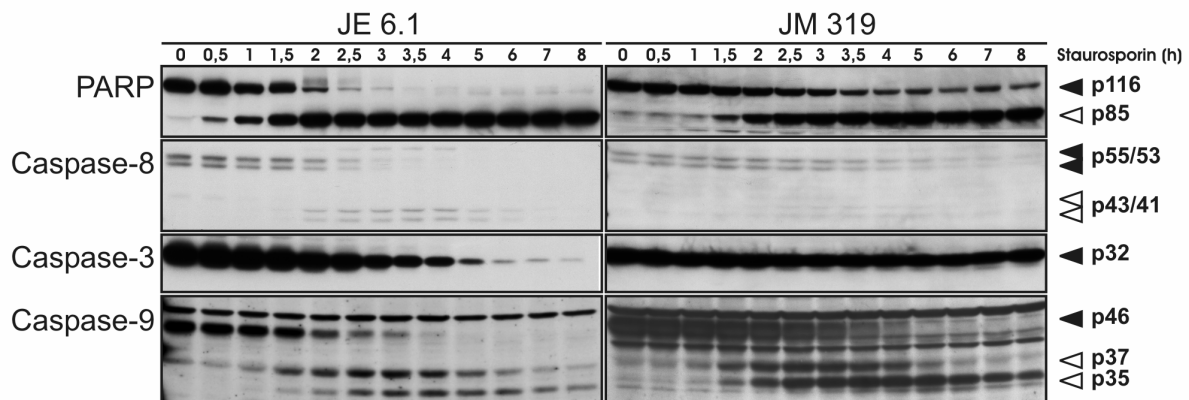


Abbildung 17: JM 319-Zellen sind in der Apoptosesignalfolge verzögert

2×10^6 JM319-Zellen, bzw. JE6.1-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit Staurosporin ($2,5 \mu\text{M}$) in 6-well-Gewebekulturplatten inkubiert. Nach der Inkubation wurden Zelllysate hergestellt, die elektrophoretisch mittels SDS-PAGE (6–15 %) aufgetrennt wurden. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Western Blot. Schwarz gefüllte Dreiecke markieren die Volllängenform, weiße Dreiecke zeigen die Spaltform der entsprechenden Proteine an.

4.2 Untersuchungen zur Beteiligung der verschieden bekannten Apoptose-Signalwege an der Staurosporin-induzierten Apoptose

4.2.1 Extrinsischer Todesrezeptorsignalweg

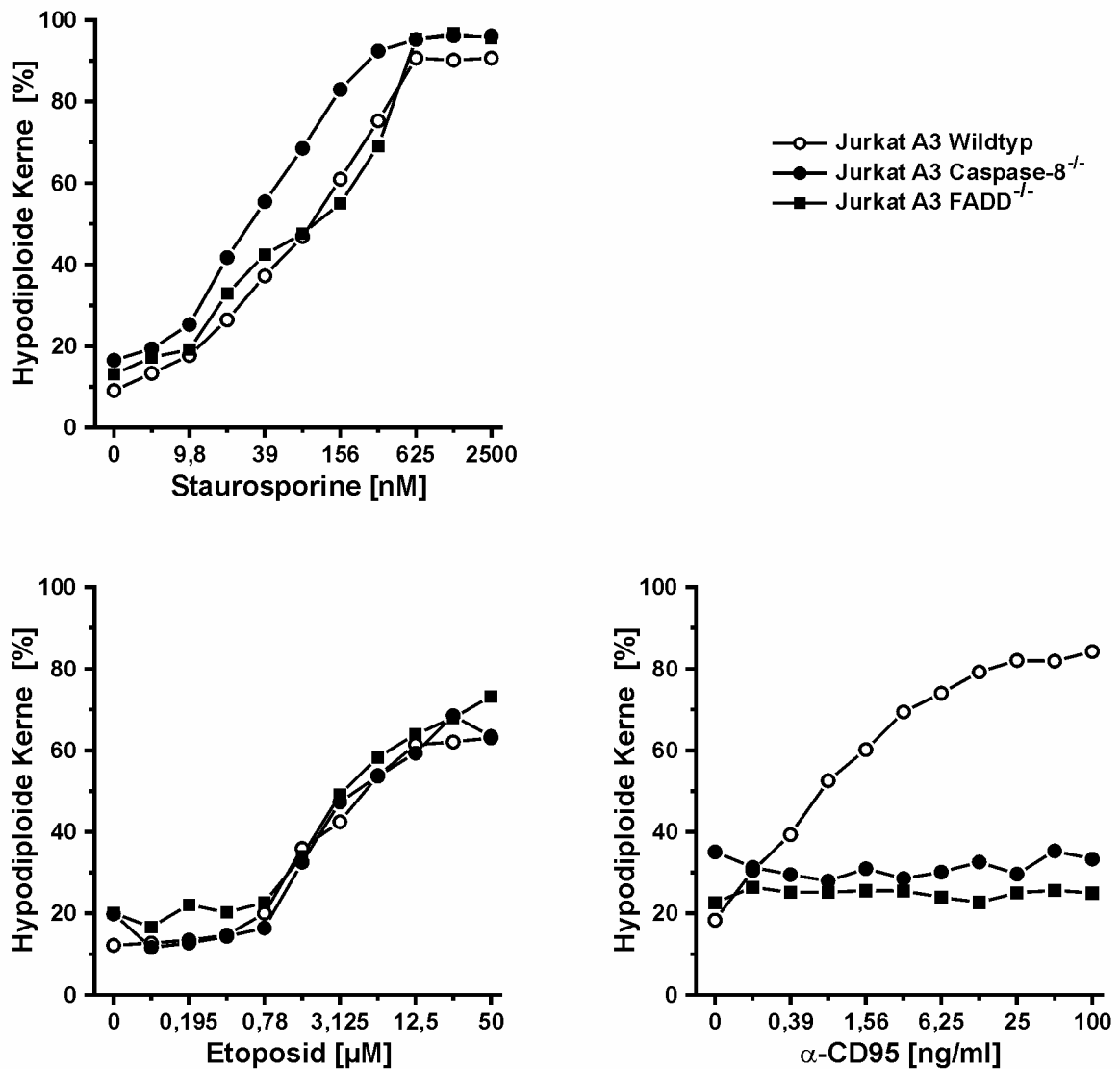
Der extrinsische Signalweg vermittelt nach Stimulation von Todesrezeptoren durch deren Rezeptorliganden (z.B. TNF α , TRAIL, anti-CD 95, etc.) die Apoptoseauslösung in der Zelle. Dabei sind zwei Proteine von besonderer Bedeutung für diesen Signalweg: das Adapterprotein FADD und die Initiatorcaspase Caspase-8. Fehlt eines der beiden Proteine, kann der Todesrezeptorsignalweg nicht ablaufen.

Die Überprüfung der Funktion beider Proteine in der Staurosporin-induzierten Apoptose wurde mit den jeweiligen defizienten Zelllinien Jurkat A3 Caspase-8^{-/-}, bzw. Jurkat A3 FADD^{-/-} durchgeführt.

Abbildung nächste Seite:

Abbildung 18: Der Todesrezeptor-Signalweg ist in der Staurosporin-vermittelten Apoptose ohne Bedeutung.

5x10⁴ Jurkat-A3-Wildtyp-Zellen (○), Jurkat-A3-Caspase-8^{-/-}-Zellen (●), bzw. Jurkat-A3-FADD^{-/-}-Zellen (■) wurden mit den Stimuli Staurosporin, Etoposid und anti-CD95 in der jeweils angegebenen Konzentrationsreihe stimuliert. Die Inkubation mit den Apoptosestimuli erfolgt für 24 Stunden in einer 96-well-Gewebekulturplatte. Anschließend wurde eine durchflusszytometrische Messung der subdiploiden Zellkernfraktion durchgeführt und als „hypodiploide Kerne (%)“ abgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte von Duplikaten.



Wie in Abbildung 18 ersichtlich, war in Caspase-8- und FADD-defizienten Jurkatzellen die anti-CD95-vermittelte Apoptoseauslösung im Gegensatz zu den Wildtypzellen blockiert. Somit war nachgewiesen, dass beide Proteine für die Apoptoseauslösung über den extrinsischen Signalweg essentiell sind. Der mitochondriale Stimulus Etoposid konnte in den Wildtyp-Jurkatzellen, sowie in den beiden defizienten Jurkatzelllinien ohne Unterschied Apoptose auslösen. Dies lässt schließen, dass die mitochondrialen Stimuli Apoptose vollkommen unabhängig vom extrinsischen Signalweg auslösen. Dieselbe Beobachtung wurde bei Inkubation mit Staurosporin gemacht. Daraus folgt, dass weder FADD noch Caspase-8 in

der Staurosporin-induzierten Apoptose eine entscheidende Rolle spielen. Eine Beteiligung des extrinsischen Weges an der Staurosporin-induzierten Apoptose kann damit ausgeschlossen werden.

4.2.2 Untersuchungen zur Beteiligung der verschiedenen bekannten intrinsischen Signalwege an Staurosporin-induzierter Apoptose

4.2.2.1 ER-Stress und mitochondrialer Apoptoseweg

Das antiapoptotische Signalprotein Bcl-2 ist zur Abgrenzung der Beteiligung der beiden bekannten Apoptose-Signalwege über das Endoplasmatische Retikulum (ER) und die Mitochondrien geeignet [202]. Es ist möglich, durch Lokalisationssequenzen die Schutzfunktion von Bcl-2 auf jeweils eine der beiden Zellorganelle zu begrenzen [203].

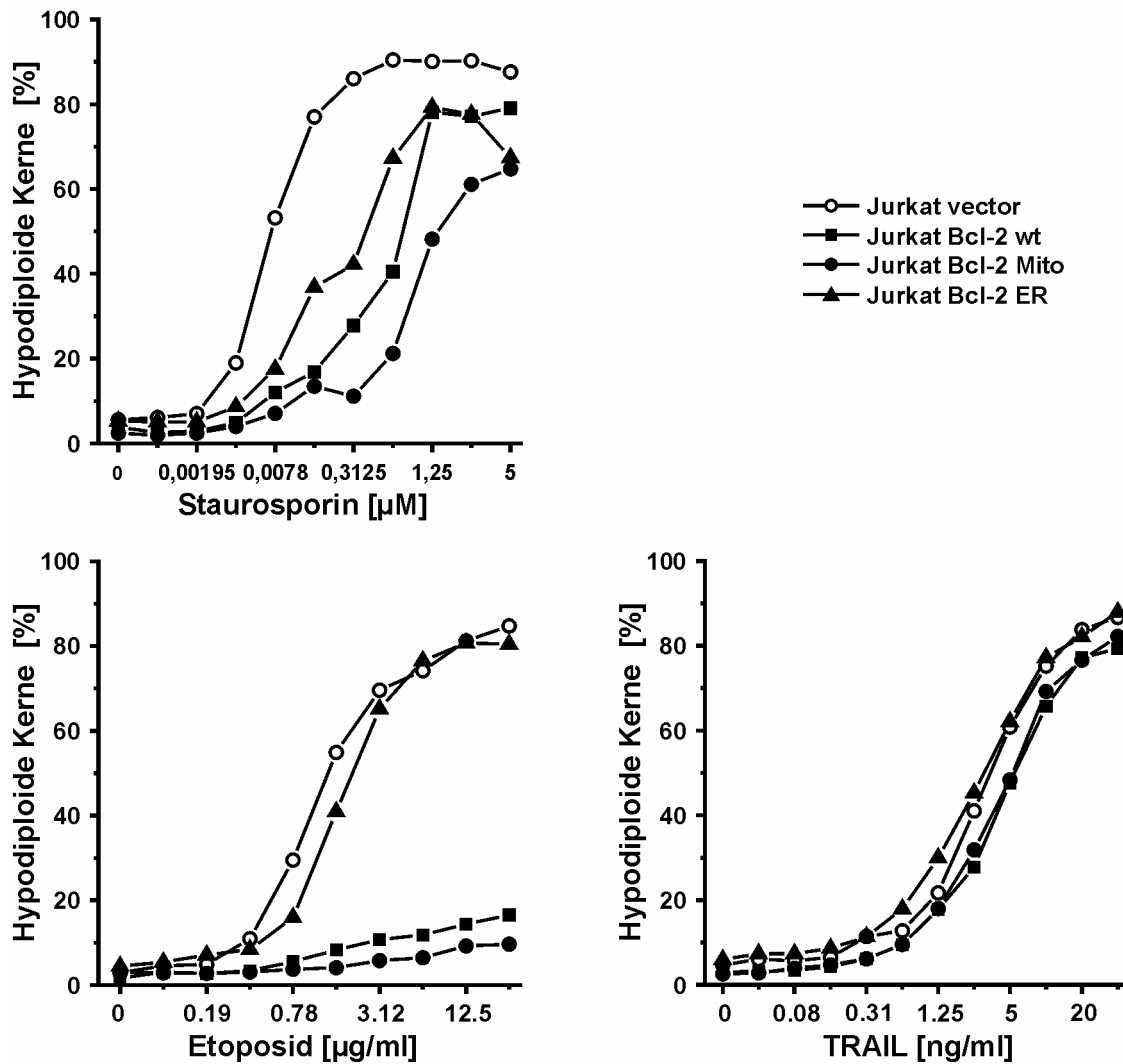


Abbildung 19: Staurosporin-induzierte Apoptose ist in Bcl-2-überexprimierenden Jurkatzellen partiell blockiert.

5×10^4 Jurkat-Bcl-2-Vektor-Zellen (○), Jurkat-Bcl-2-Wildtyp-Zellen (■), Jurkat-Bcl-2-Mitochondrium-Zellen (●), bzw. Jurkat-Bcl-2-ER-Zellen (▲) wurden mit den Stimuli Staurosporin, Etoposid und TRAIL in der jeweils angegebenen Konzentrationsreihe stimuliert. Nach 24h erfolgte die Messung der hypodiploiden Kerne als Maß der Apoptose mit der Methode nach Nicoletti et al. [193] im Durchflusszytometer FACSCalibur. Gezeigt sind die Mittelwerte von Duplikaten.

Wie in Abbildung 19 ersichtlich, war die Schutzwirkung des am ER lokalisierten Bcl-2 in den Jurkat-Bcl-2-ER-Zellen im Falle des mitochondrialen Stimulus Etoposid wirkungslos. Mitochondrial lokalisiertes Bcl-2 in den Jurkat-Bcl-2-Mito-Zellen und Wildtyp-Bcl-2 wirkte dagegen bei Etoposid antiapoptotisch. Die Aktivierung des extrinsischen Weges durch TRAIL war in den Bcl-2-überexprimierenden Zellen nicht gehemmt, womit gezeigt ist, dass Bcl-2 ohne Effekt in der extrinsischen Apoptose der Jurkatzellen ist.

Die Apoptoseinduktion durch Staurosporin wurde in den verschiedenen Bcl-2-Zellklonen unterschiedlich stark gehemmt. In Jurkat-Bcl-2-ER war die Hemmung nur schwach. Die gegenüber den Jurkat-Vektor-Kontrollzellen geringere Apoptose nach Staurosporininkubation zeigt, dass in geringem Umfang eine Apoptoseauslösung über den ER-Stressweg vorhanden ist, dieser aber nicht den Hauptweg darstellt.

Der Signalweg der ER-vermittelten Apoptose mündet letztlich in den mitochondrialen Signalweg. Eine Apoptoseaktivierung über den ER-Signalweg ist daher nur bei intakter Signalweiterleitung im Mitochondrium möglich [110, 204]. Ein Schutz des Mitochondriums durch Bcl-2 verhindert sowohl die mitochondriale als auch die ER-vermittelte Apoptose. Das mitochondrial lokalisierte Bcl-2 hemmte die Staurosporin-induzierte Apoptose, konnte sie aber bei höheren Staurosporin-Konzentrationen nicht vollständig blockieren. Dies bedeutet, dass nur ein Teil des Apoptosesignalweges von Staurosporin über das Mitochondrium vermittelt ist und durch Überexpression von Bcl-2 gehemmt werden kann. Es wurde also ein Anteil an Staurosporin-induzierter Apoptose beobachtet, der nicht durch Bcl-2 blockierbar ist. Staurosporin besitzt demnach zwei Apoptosesignalwege: einen, mit den mitochondrialen Stimuli gemeinsamen genutzten Signalweg, der Bcl-2-hemmbar ist, und einen Bcl-2-unabhängigen Signalweg.

Staurosporin-induzierte Apoptose wurde mit abnehmender Stärke von Mitochondrium-Bcl-2 > Wildtyp-Bcl-2 > ER-Bcl-2 gehemmt. Daher steht zu vermuten, dass die verstärkte Bcl-2-Lokalisierung an das Mitochondrium die Schutzwirkung gegenüber Wildtyp-Bcl-2 erhöht.

Die in Abbildung 19 gezeigten Erkenntnisse konnten per Western Blot (Abbildung 20) auf Proteinebene bestätigt werden. In der Vektorkontrollzelllinie wurde unter Staurosporinstimulation die Spaltung von Caspase-9 und Caspase-8 innerhalb von 2–4 Stunden beobachtet. In Bcl-2-Wildtyp-überexprimierenden Jurkatzellen war diese Spaltung erst verzögert nach 4–8 Stunden durchlaufen. Bcl-2-Mito-Jurkatzellen zeigten eine in etwa gleich verzögerte Spaltung. Die Verzögerung von Caspase-9-Spaltung in Bcl-2-ER-Jurkatzellen war sichtbar und liegt auf dem Niveau von Bcl-2-Wildtyp-Zellen. Dies war nicht zu erwarten, da der schwächere Bcl-2-ER-Schutz keine solch starke Verzögerung der Apoptose haben kann. In der Spaltung von Caspase-8 zeigte sich das gleiche Muster, was aber daran liegt, dass Caspase-8 von einer durch Caspase-9 aktivierten Caspase-3 gespalten wird. Obwohl der extrinsische Signalweg hier nicht aktiviert war, agierte Caspase-8 als Initiator-Caspase und verstärkt die Apoptose in zwei Richtungen: Erstens wird durch Spaltung von Bid in tBid der

mitochondriale Weg verstärkt und zweitens kommt es zur Aktivierung der Effektorcaspase Caspase-7 (vgl. Abbildung 4) und nachfolgend zum Ablauf der Apoptosekaskade.

Die Spaltung von Caspase-9 und -8 nach Etoposidstimulation zeigte das erwartete Bild. In Leervektor-Zellen hatte die Spaltung nach 6 Stunden schon eingesetzt; die Jurkat Bcl-2-ER-Jurkatzellen zeigten eine ähnliche Spaltungskinetik, während in den Zelllinien Jurkat Bcl-2-Mito und Jurkat Bcl-2-Wildtyp die Spaltung inhibiert war.

Unter dem ebenfalls mitochondrialen Stimuli Mitomycin C waren dem Etoposid entsprechende Spaltungsmuster zu erkennen, die Geschwindigkeit der Apoptoseauslösung war dabei aber etwas schneller.

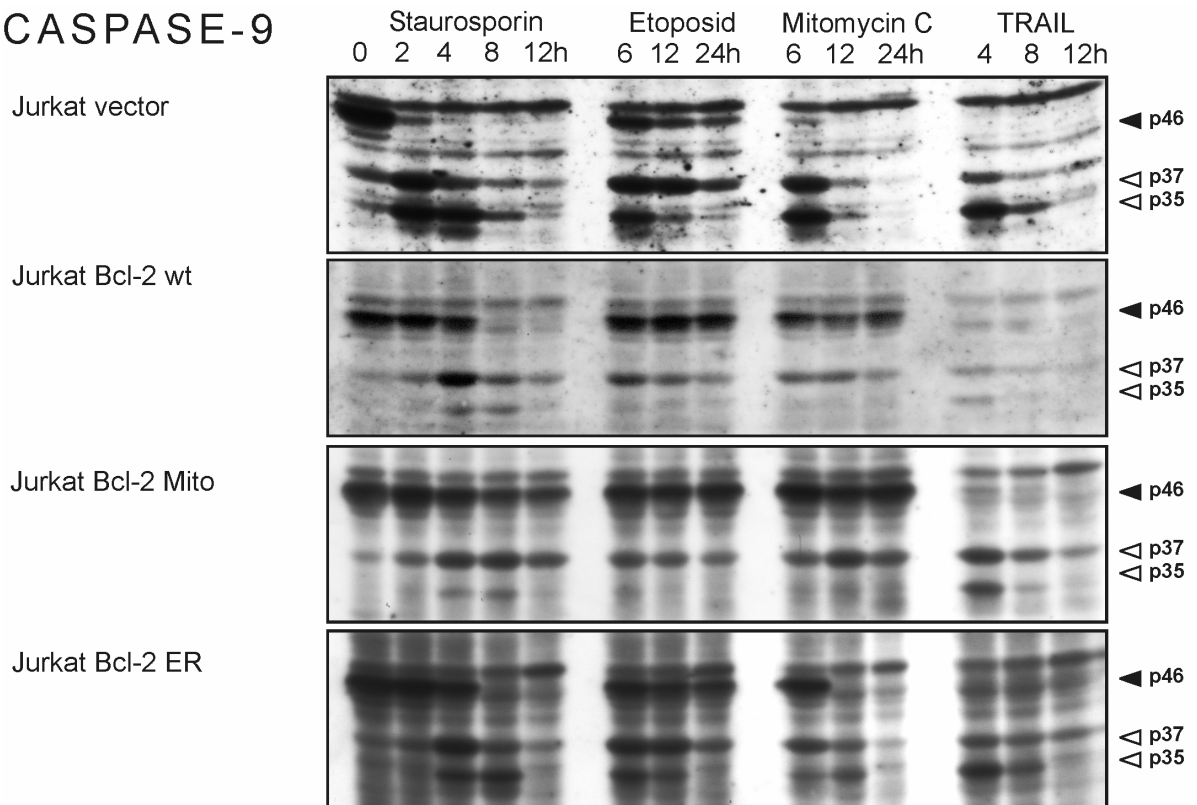
Wurde TRAIL als Stimulus eingesetzt, so wurden die Caspasen in allen Zellklonen in ähnlicher Geschwindigkeit gespalten. Bei Jurkat Bcl-2-Wildtyp-Zellen war nach TRAIL-Inkubation die Detektion von Caspase-9-Vollängenform und Spaltfragmenten schwierig. Es sind zwei Erklärungen denkbar: Zum einem war die Spaltung und Degradation der Spaltprodukte unter TRAIL sehr schnell, so dass sich die Degradationsprodukte der Detektion mit dem verwendeten Antikörper entzogen. Dies erklärt aber nicht den Unterschied zu den anderen Klonen, zumal der Zellklon mit Leervektor die Apoptose langsamer durchlief. Wahrscheinlich lag die Fehlerquelle in der Belichtungszeit der Western Blots. So war im Falle der Jurkat Bcl-2-wt das Hintergrundrauschen in der Filmbelichtung recht hoch. Da die zu detektierenden Banden bei längerer Exposition von der Hintergrundbelichtung überstrahlt worden wären, war eine Belichtungszeit vergleichbar den anderen Blots nicht erreichbar gewesen. Und damit war auch die Stärke der dortigen Banden nicht erreichbar. Eine Kombination der beiden Fehlerquellen als Auslöser der beschriebenen Wahrnehmung war anzunehmen.

Abbildung nächste Seite:

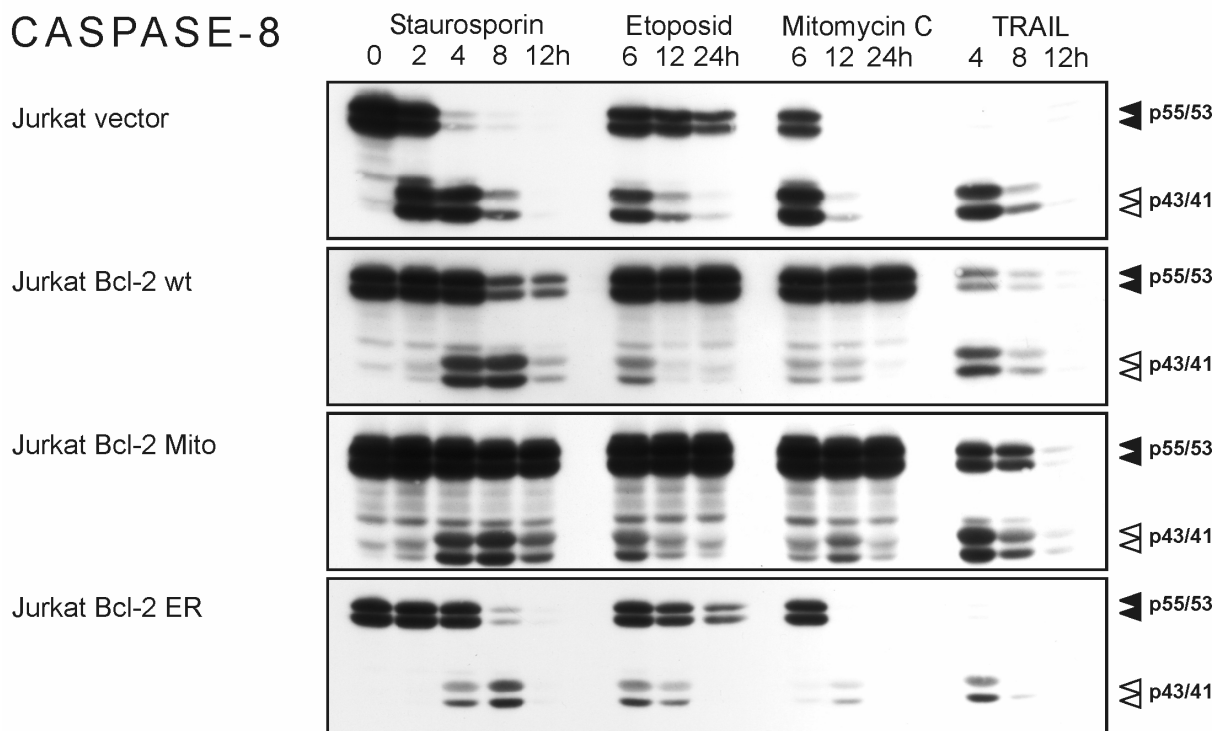
Abbildung 20: Western Blot-Analyse Staurosporin-induzierter Apoptose in Jurkatzellen mit Bcl-2-geschütztem Mitochondrium, bzw. ER.

2×10^6 Jurkatzellen wurden für die angegebenen Zeiten mit Staurosporin (2,5 μM), Etoposid (100 $\mu\text{g/ml}$), Mitomycin C (25 $\mu\text{g/ml}$) und TRAIL (40 ng/ml) in 6-well-Gewebekulturplatten inkubiert. Nach der Inkubation wurden Zellysate hergestellt und der Proteingehalt bestimmt. Es wurden pro Spur 100 μg (Caspase-8), bzw., 200 μg (Caspase-9) aufgetragen und elektrophoretisch mittels SDS-PAGE (8–15 %) aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Western Blot. Schwarz gefüllte Dreiecke markieren die Vollängenform, weiße Dreiecke zeigen die Spaltform der entsprechenden Proteine an.

CASPASE-9



CASPASE-8



4.2.2.2 Die Beteiligung des PIDDosoms

Apoptose über intrinsische Signalwege kann neben dem ER-Stressweg auch über das so genannte PIDDosom ausgelöst werden. Das durch DNA-Schäden aktivierte p53 induziert das Protein PIDD (p53-induced Protein with Death Domain). Dieses bildet zusammen mit dem Adapterprotein RAIDD (RIP-associated ICH1/CED3-homologous Protein with DD) und Caspase-2 einen Komplex in dem Caspase-2 aktiviert wird. Die PIDDosom-abhängige Apoptose wird eingeleitet (vgl. 1.4.3). Um die Beteiligung dieses Caspase-2-abhängigen Weges in der Staurosporin-induzierten Apoptose zu untersuchen, wurden Caspase-2-defiziente murine embryonale Fibroblasten verwendet. In diesen kann das PIDDosom nicht mehr entstehen und DNA-schädigende Substanzen können keine Apoptose mehr auslösen.

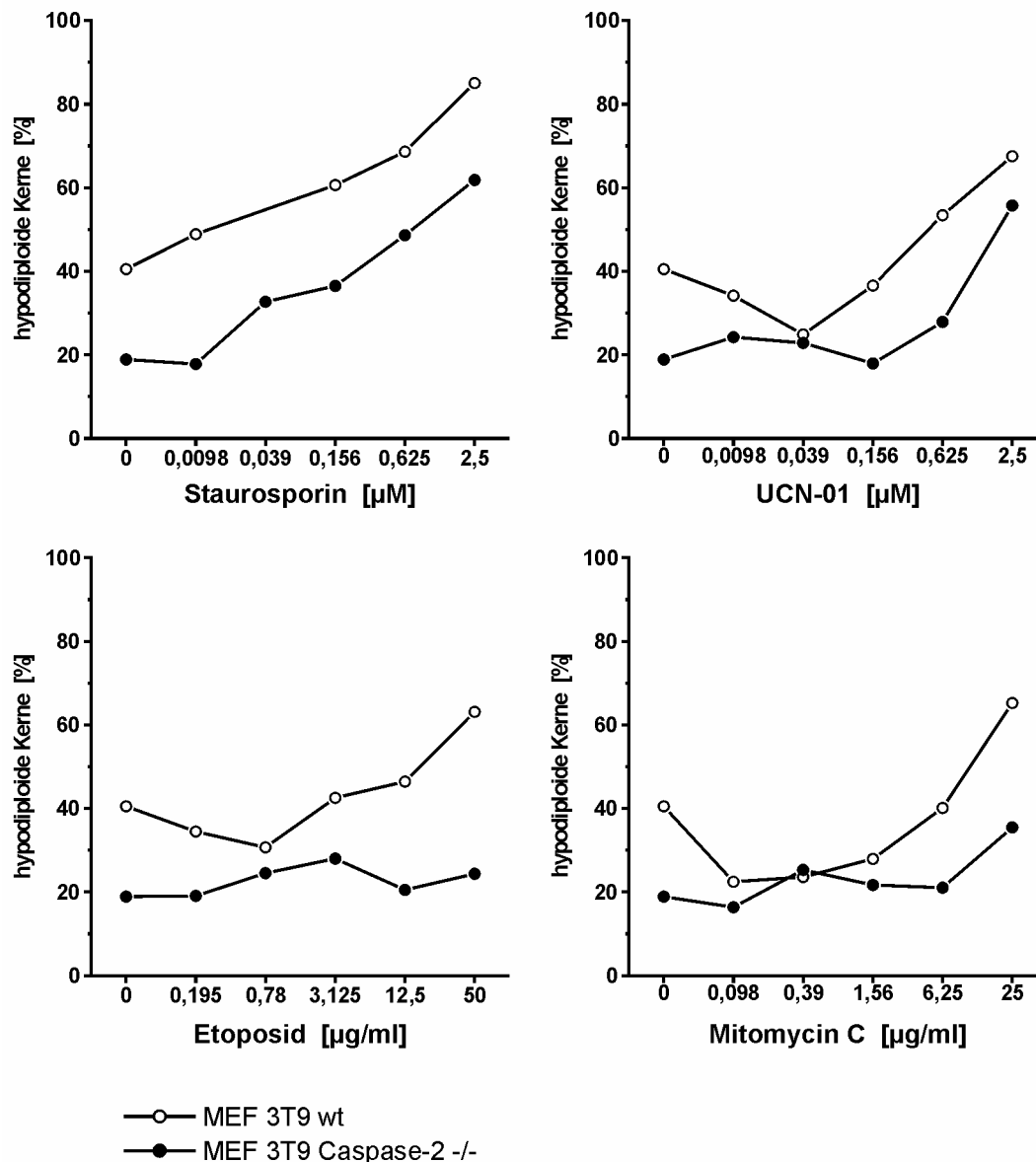


Abbildung 21: Staurosporin-vermittelte Apoptose erfolgt ohne Beteiligung von Caspase-2.

4×10^4 murine embryonale Fibroblasten-(MEF)-3T9-Wildtyp-Zellen (○), bzw. MEF-3T9-Caspase-2^{-/-}-Zellen (●) wurden mit den Stimuli Staurosporin, 7-Hydroxy-Staurosporin (UCN-01), Etoposid und Mitomycin C in der jeweils angegebenen Konzentrationsreihe stimuliert. Die Inkubation mit den Apoptosestimuli erfolgte für 24 Stunden in einer 96-well-Gewebekulturplatte. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung der subdiploiden Zellkernfraktion als apoptotische Kerne (%). Gezeigt sind die Mittelwerte von Duplikaten.

Wie in Abbildung 21 gezeigt, führte eine Stimulation von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) mit Staurosporin in Caspase-2-negativen Zellen zur Apoptoseauslösung, ebenso wie die Stimulation mit 7-Hydroxy-Staurosporin (UCN-01).

Die DNA-schädigenden Chemotherapeutika Etoposid und Mitomycin C konnten nur in Wildtyp-Kontrollzellen Apoptose auslösen. In den Caspase-2-defizienten MEF-Zellen kam es zu keiner Apoptose, da keine PIDDosom-Bildung möglich ist.

Mitomycin C zeigte in hohen Dosierungen einen schwachen apoptotischen Effekt. Das lässt schließen, dass ein weiterer Signalweg von Mitomycin C aktiviert wird. Dieser Signalweg wurde als ein p53-induzierter Signalweg beschrieben [205], in welchem durch die „BH3-only“-Proteine Puma oder Noxa der mitochondriale Apoptosesignalweg aktiviert wird.

Festzuhalten bleibt, dass Staurosporin ebenso wie UCN-01 den Caspase-2-abhängigen Apoptoseweg nicht zur Auslösung des programmierten Zelltodes benötigt.

4.3 Wirkung der Bcl-2-Familienmitglieder auf die Staurosporin-induzierte Apoptose

Die Bcl-2-Proteinfamilie besteht aus sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirkenden Mitgliedern [206-208]. Die wichtigsten antiapoptotischen Mitglieder sind Bcl-2 und Bcl-X_L; proapoptotisch wirken z.B. die Proteine Bax [209], Bak [210], Bid [211, 71] und Bim [212]. Die einzelnen Familienmitglieder sind an der Steuerung von Apoptose und Zellüberleben beteiligt.

4.3.1 Untersuchungen zur Rolle von Bcl-2 in der Staurosporin-induzierten Apoptose

Bcl-2 gehört, wie Bcl-X_L, zu den antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Proteinfamilie. Am Mitochondrium und am Endoplasmatischen Retikulum (ER) wirkt es antiapoptotisch (siehe 1.5.1). Im vorhergehenden Kapitel 4.2.2 konnte gezeigt werden, dass ein Teil der Staurosporin-induzierten Apoptose nicht über ER-Stress oder das PIDDosom, sondern über den mitochondrialen Apoptosesignalweg erfolgt. Folglich soll nun dieser durch die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine Bcl-2 und Bcl-X_L blockierbare Signalweg eingehend untersucht werden. Hierzu wurden zunächst Jurkatzellen eingesetzt, die Bcl-2 überexprimieren. Das Bcl-2 entspricht dem nativen Bcl-2 der Zelle und schützt das Endoplasmatische Retikulum ebenso wie das Mitochondrium.

Wie in Abbildung 22 gezeigt, schützt eine Bcl-2-Überexpression vor Apoptose durch den mitochondrialen Stimulus Etoposid: die Zelllinien mit Bcl-2-Schutz zeigten sich resistent. Die Jurkatzellen mit Leervektor waren hingegen apoptotisch. TRAIL-induzierte Apoptose wurde dagegen durch Bcl-2 nur wenig gehemmt, was zeigt, dass Bcl-2 kaum gegen Apoptosestimulation an Todesrezeptoren schützt. Dieser Schutz betrifft in diesem Falle

ausschließlich den Verstärkungsweg über Caspase-8 und Bid/tBid, der den mitochondrialen Signalweg in die extrinsische Apoptosereaktion einbindet. In der Jurkatzelllinie mit Bcl-2-Überexpression war die Apoptoseauslösung nur bei niedrigkonzentrierter Staurosporinstimulation gehemmt, in höherem Konzentrationsbereich war der Schutz nicht mehr vorhanden. Der Signalweg der Apoptoseauslösung von Staurosporin ist demnach in einen durch Bcl-2-Überexpression geschützten und einen durch Bcl-2-unbeeinflussbaren Signalweg zu trennen.

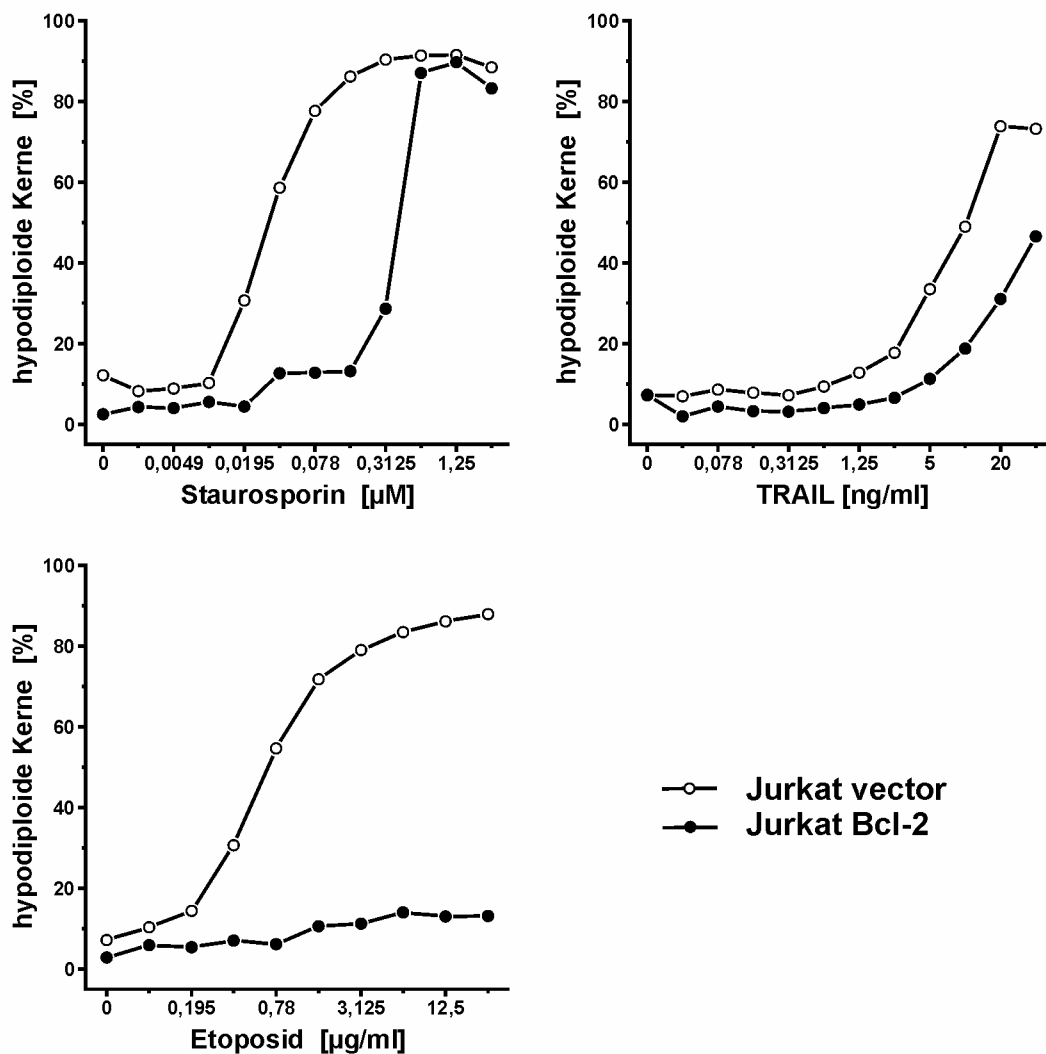


Abbildung 22: Bcl-2-überexprimierenden Zellen sind nicht vor Staurosporin-induzierter Apoptose geschützt.

2×10^4 Jurkat-Vektor-Kontrollzellen (○), bzw. Jurkat-Bcl-2-Wildtyp-Zellen (●) wurden mit den Stimuli Staurosporin, Etoposid und TRAIL in der jeweils angegebenen Konzentrationsreihe stimuliert. Die Inkubation mit den Apoptosestimuli erfolgte für 24 Stunden in einer 96-well-Gewebekulturplatte. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung der hypodiploiden Kerne und subdiploiden Zellkernfraktion (%) als Maß der Apoptose. Gezeigt sind die Mittelwerte von Duplikaten.

Zur besseren Charakterisierung dieser Beeinflussung wurden im Weiteren verschiedene Methoden zur Messung des Zelltods angewandt, die ihre Messwerte an unterschiedlichen Stellen des Staurosporin-induzierten Apoptosesignalweges erheben.

Die Messmethode des MTT-Vitalitäts-Assays zur Bestimmung der Vitalität von Zellen beruht auf der Messung von Redoxaktivität in der Zelle. Der Vorteil dieser Methode ist die einfache Handhabung mit schnell vorliegenden Ergebnissen. Von Nachteil ist, dass mit diesem Test nicht der nekrotische vom apoptotischen Zelltod unterschieden werden kann. Denn in beiden Zelltodformen kommt es zu einer Reduzierung der Redoxaktivität, deren Bestimmung das Testprinzip darstellt. Die photometrische Detektion erfolgt durch die Umsetzung vom gelben MTT zum blauen Formazansalz durch die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH. In Abbildung 23 wird gezeigt, dass bei Bcl-2-überexprimierenden Jurkatzellen, im Vergleich zur Leervektorzelllinie, ein Schutz vor Staurosporin-induziertem Zelltod vorliegt.

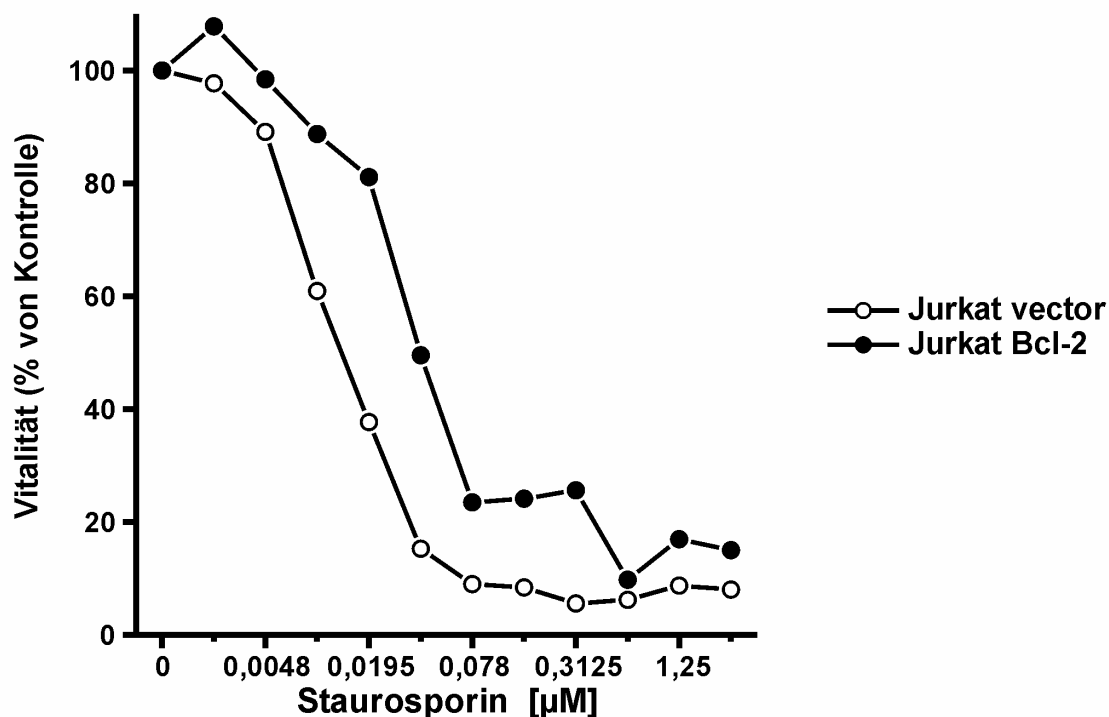


Abbildung 23: Bcl-2 verzögert den Staurosporin-induzierten Vitalitätszusammenbruch in Jurkatzellen.

3×10^4 Jurkat-Vektor-Kontrollzellen (\circ), bzw. Jurkat-Bcl-2-Wildtyp-Zellen (\bullet) wurden mit Staurosporin in der angegebenen Konzentrationsreihe stimuliert. Die Inkubation mit den Apoptosestimuli erfolgte für 24 Stunden in einer 96-well-Gewebekulturplatte. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 μ l MTT-Lösung (10 mg/ml) und weitere Inkubation für 5 Stunden. Danach Zugabe von 100 μ l SDS-Lösung (10 %) zum Auflösen der Formazankristalle. Messung der Absorption als Maß der Redoxaktivität mit dem ELISA-Plattenlesegerät. Gezeigt sind die Mittelwerte von Duplikaten. (Kontrolle = 100%)

Als nächstes wurde der Zusammenbruch der mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) mittels des Fluoreszenzfarbstoffes TMRE (Tetramethylrhodamin-ethylester) gemessen. Durch mitochondrienmembranschädigende Agenzien verliert das Mitochondrium seine

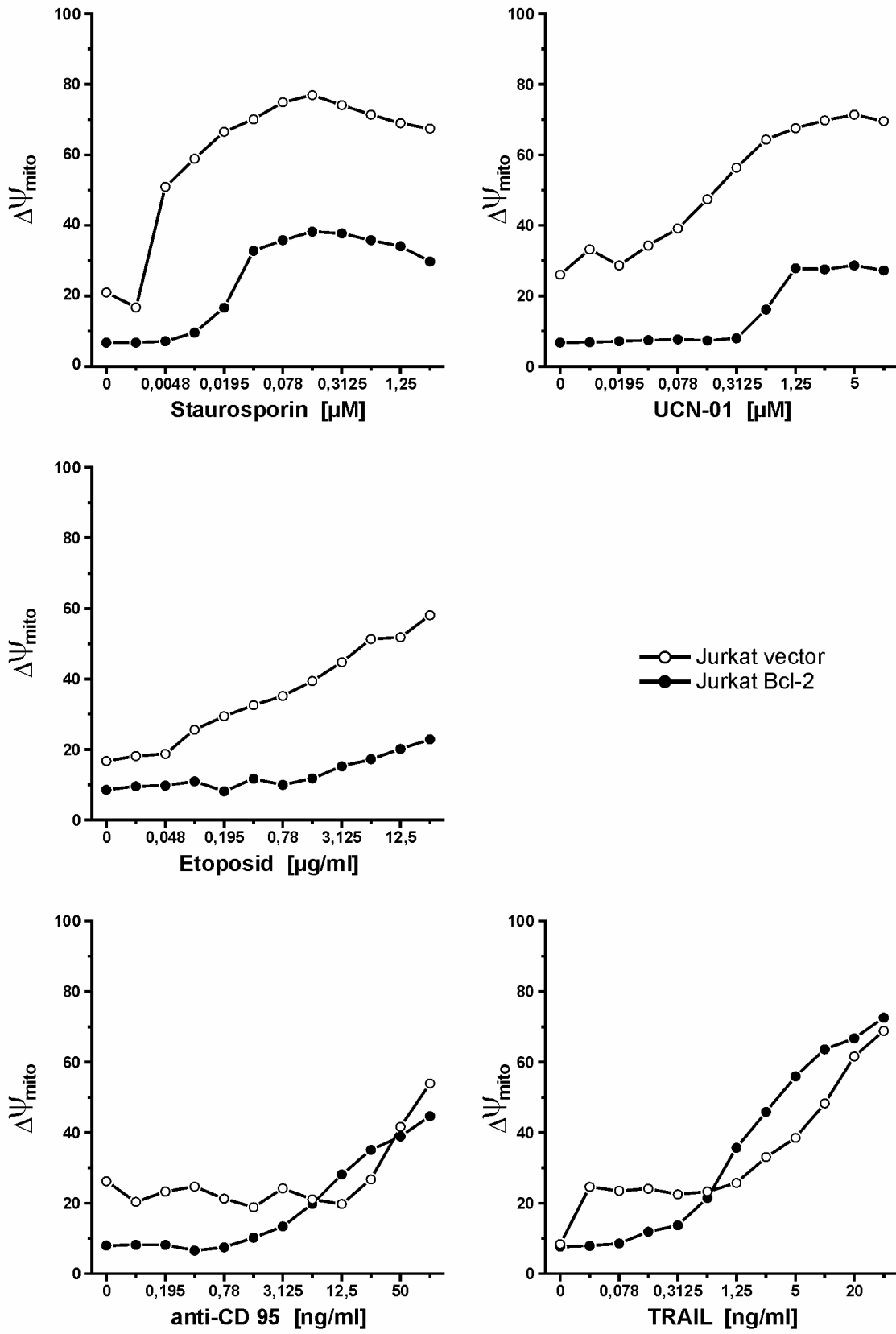
Membranstabilität. Das an der inneren Mitochondrienmembran herrschende Membranpotential nimmt nach der Membranschädigung durch Ladungsausgleich zwischen Zytosol und Mitochondrium ab. Mit dem Fluoreszenzfarbstoff TMRE können nur Mitochondrien mit hohem Membranpotential angefärbt werden; so wird es möglich, die Abnahme der Integrität im Durchflusszytometer quantitativ zu bestimmen [213]. Die Integrität der Mitochondrienmembran zeigte sich durch Bcl-2 geschützt [203].

Abbildung 24 zeigt in den Jurkat-Vektor-Kontrollzellen, dass der mitochondriale Stimulus Etoposid einen Zusammenbruch des Membranpotentials auslöste. In Jurkat-Bcl-2-Zellen hingegen war die Apoptose durch Etoposid durch den Bcl-2-Membranschutz blockiert. Bei Stimulation mit extrinsischen Apoptoseauslösern (TRAIL, anti-CD95) zeigte sich in beiden Zelllinien unabhängig vom Bcl-2-Schutz ein ähnlich starker Zusammenbruch des Membranpotentials zum gleichen Zeitpunkt. Unter Stimulation mit Staurosporin oder UCN-01 brach das mitochondriale Membranpotential in beiden Zelllinien zusammen, in Bcl-2-überexprimierenden Jurkatzellen jedoch nicht ganz so stark wie bei Jurkat-Vektor-Kontrollzellen. Die Bcl-2-abhängigen Teile der Apoptose waren blockiert und schützten das Mitochondrienpotential zum Teil. Der Bcl-2-unabhängige Teil des Potentialverlustes ist vermutlich einer direkten Aktivierung von Caspasen durch Staurosporin zuzuschreiben.

Abbildung nächste Seite:

Abbildung 24: Verzögerter Mitochondrienpotentialzusammenbruch nach Staurosporinstimulation in Bcl-2-überexprimierenden Jurkatzellen.

1×10^5 Jurkat-Vektor-Kontrollzellen (\circ), bzw. Jurkat-Bcl-2-Zellen (\bullet) wurden mit den angegebenen Konzentrationsreihen der Stimuli inkubiert. Zeiträume der Stimulation waren 3 Stunden für Staurosporin und UCN-01, 4 Stunden für TRAIL und anti-CD95, sowie 10 Stunden für Etoposid in 48-well-Gewebekulturplatten. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit TMRE-Lösung (25 nM in Zellkulturmedium) gefärbt (37°C). Die Messung erfolgte im Durchflusszytometer (FACSCalibur). (Kontrolle = 100%)



In Bcl-2-überexprimierenden Jurkatzellen konnte Etoposid in höheren Dosierungen das Mitochondrienpotential beeinflussen, was auf unphysiologische Störungen des Mitochondriums schließen lässt. Denn diese Störungen sind anscheinend nicht für eine Apoptoseauslösung ausreichend (Abbildung 22)

Die Western Blot-Analyse in Abbildung 25 zeigte in Jurkat-Vektor-Kontrollzellen und Jurkat-Bcl-2-Zellen, dass unter Stimulation mit Staurosporin oder UCN-01 in Jurkat-Vektor-Kontrollzellen die Volllängenform von Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) (p116) vollständig in das p85-Spaltprodukt gespalten wird. In den Bcl-2-überexprimierenden Jurkatzellen war die Spaltung teilweise inhibiert. Bcl-2 verlieh den Zellen demnach einen Teilschutz vor staurosporinbedingter Apoptose. Zusätzliche Inkubation vor der Staurosporinstimulation mit dem Caspaseinhibitor zVAD-fmk verhinderte in der Jurkat Bcl-2-Zelllinie die PARP-Spaltung vollständig, in den Jurkat-Vektor-Zellen war hingegen kaum Spaltungshemmung erkennbar. Widersprüchlich war dabei, dass die Spaltung von PARP Caspase-abhängig ist und trotz einer Caspasehemmung durch den Inhibitor zVAD-fmk eine PARP-Spaltung stattfand. Trotz Inhibition durch zVAD-fmk schien eine gewisse Caspaseaktivität vorhanden zu sein. Daher ist könnte eine Nachführung der Konzentration von zVAD-fmk wegen Abbaus des Inhibitors während der Inkubationszeit in diesen Zellen nötig sein.

In Jurkat-Bcl-2-Zellen sind wiederum zwei Wege der Staurosporin-induzierten Apoptose unterscheidbar: ein Teilweg der von Bcl-2 blockiert wird und einer der mit Bcl-2 nicht inhibierbar ist, der aber mit dem Caspaseinhibitor zVAD-fmk gehemmt wird.

Die Spaltung der Volllängenformen der Caspase-8 (p55/53) und -9 (p46) in ihre Spaltprodukte (p43/41, bzw. p37/35) war in der Bcl-2-überexprimierenden Jurkatzelllinie deutlich schwächer als in Jurkat-Vektor-Kontrollzellen. Eine Überexpression von Bcl-2 schützte offensichtlich nur teilweise vor Staurosporin-, bzw. UCN-01-induzierter Apoptose.

Die von den mitochondrialen Stimuli Etoposid und Mitomycin C ausgelöste Apoptose spaltete PARP in Jurkat-Vektor-Kontrollzellen; die Spaltprodukte von Caspasen-8 und -9 waren ebenfalls detektierbar. Ein Schutz durch überexprimiertes Bcl-2 verhinderte diese Spaltungen.

Bei Stimulation mit TRAIL schützte Bcl-2 hingegen nicht. Es war in beiden verwendeten Zelllinien Apoptose nachweisbar, wenn auch die Spaltung der Proteine PARP und Caspase-9 in Jurkat Bcl-2-Zellen leicht verzögert war – eine Folge der Hemmung der Verstärkungsschleife von Caspase-8 über Bid/tBid zum Mitochondrium durch Bcl-2.

7-Hydroxy-Staurosporin (UCN-01) hatte eine ähnliche Wirkung wie Staurosporin auf Jurkatzellen, jedoch verringert in der Stärke, sowie zeitlich etwas verzögert. Nach Caspasehemmung durch zVAD-fmk war die UCN-01-bedingte PARP-Spaltung in Jurkat vector-Zellen nicht vollständig. Dies war dem etwas zu früh gewählten Messzeitpunkt von 12 Stunden zuzuordnen. Eine Spaltung von Caspase-8 zeigte sich Bcl-2-unabhängig in beiden Zelllinien, da Caspase-3 diese direkt spaltet.

Jurkatzellen mit Bcl-2-Überexpression zeigten unter den mitochondrialen Stimuli Etoposid und Mitomycin C nur eine minimale PARP-Spaltung. Die Spaltung von Caspase-8 war in Jurkat-Vektor-Kontrollzellen nur schwach ausgeprägt und war durch Bcl-2-Überexpression blockierbar. In ähnlicher Weise wurde Caspase-9 nur in Jurkat vector-Zellen gespalten; in Bcl-2-überexprimierenden Zellen war eine Spaltung nicht detektierbar. Die Spaltung der PARP-Volllängenform in Bcl-2-überexprimierenden Jurkatzellen nach Inkubation mit Mitomycin C kann nur Caspase-unabhängig erfolgt sein, da die Caspasen-8 und -9 ungespalten bleiben.

Wurden Jurkatzellen mit TRAIL behandelt, war die Spaltung der PARP-Volllängenform (p116) zur p85-Spaltform innerhalb von 2 Stunden erfolgt. Bcl-2 schützte davor nur in geringem Umfang. Caspase-8 wurde in beiden Zelllinien nur in geringem Umfang gespalten. Dennoch reichte diese Spaltung von Caspase-8 aus, die PARP-Spaltung zu induzieren. Caspase-9 wurde nur in Jurkat vector-Zellen merklich gespalten.

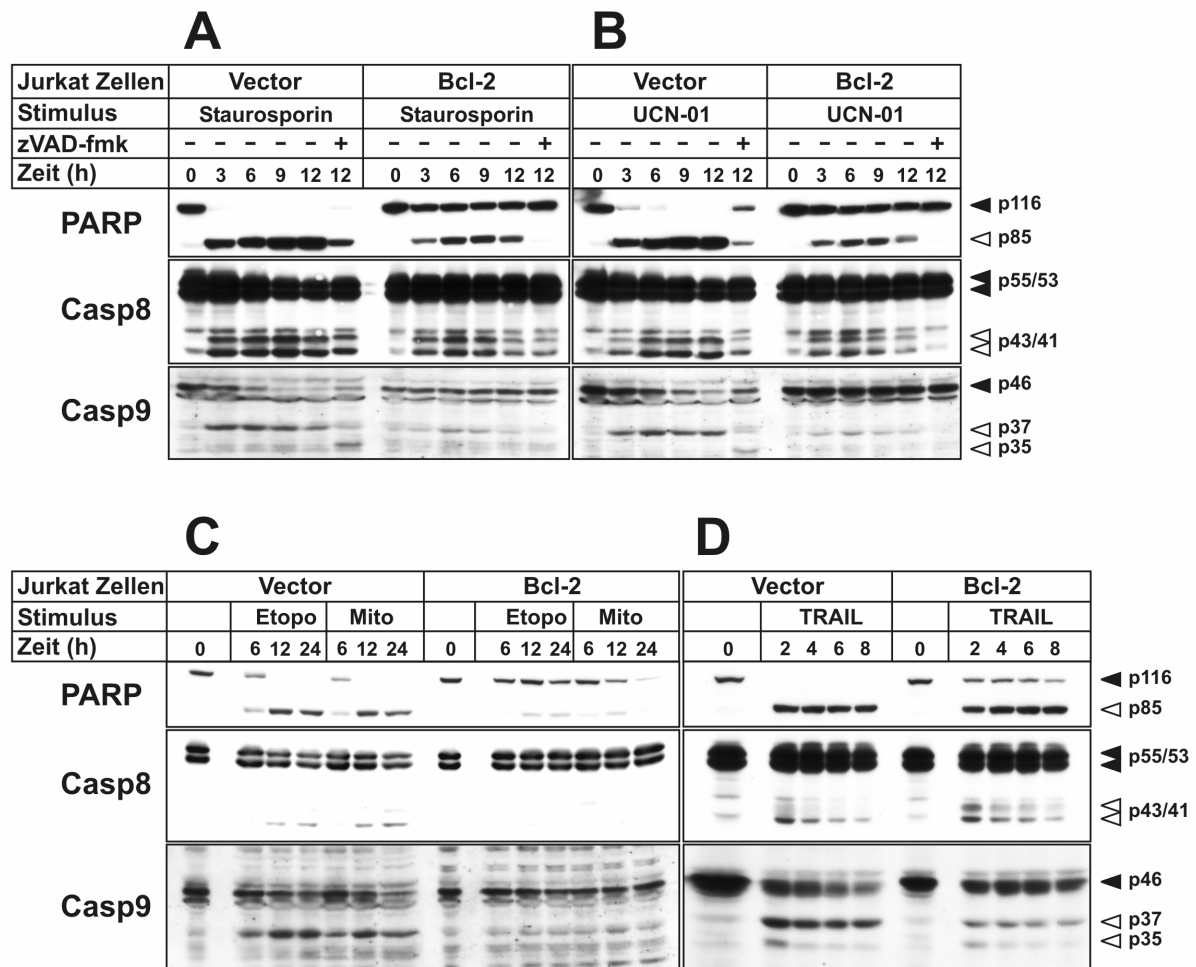


Abbildung 25: Western Blot-Vergleich von Apoptose in Jurkat-Vektor-Kontrollzellen und Jurkat Bcl-2-überexprimierenden Zellen.

2×10^6 Jurkat-Vektor-Kontrollzellen, bzw. Bcl-2-überexprimierende Jurkatzellen wurden mit den Stimuli Staurosporin ($2,5 \mu\text{M}$) (A), UCN-01 ($10 \mu\text{M}$) (B), Etoposid ($25 \mu\text{g/ml}$), Mitomycin C ($25 \mu\text{g/ml}$) (C) oder TRAIL (40 ng/ml) (D) für die angegebenen Zeiten in 6-well-Gewebekulturplatten inkubiert. Vorinkubation erfolgte mit $100 \mu\text{M}$ zVAD-fmk (30 min) in den markierten Spuren (+). Anschließend wurden Zelllysaten hergestellt und der Proteingehalt gemessen. Es wurden pro Spur $150 \mu\text{g}$ (PARP, Caspase-8), bzw. $250 \mu\text{g}$ (Caspase-9) Protein aufgetragen und elektrophoretisch mittels SDS-PAGE (8–15 %) aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Western Blot. Schwarz gefüllte Dreiecke markieren die Volllängenform, weiße Dreiecke zeigen die Spaltform der entsprechenden Proteine an.

Eine Western Blot-Untersuchung der Cytochrom c-Freisetzung bei mit Apoptosestimuli inkubierten Zellen wird in Abbildung 26 gezeigt. Damit wurde der Einfluss von Bcl-2 auf die Cytochrom c-Freisetzung als zentralem Schritt der mitochondrialen Apoptose untersucht.

Cytochrom c ist in gesunden Zellen ausschließlich an der inneren Mitochondrienmembran in der Atmungskette des Mitochondriums zu finden und dient dort dem Elektronentransport

durch die Mitochondrienmembran. Die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium ins Zytosol ist ein Marker für den Integritätsverlust von Mitochondrienmembranen [75, 214]. Das freigesetzte Cytochrom c bildet mit Apaf-1, dATP und Caspase-9 das Apoptosom [215, 88, 90, 84, 216]. Die Effektorcaspase Caspase-3 wird ans Apoptosom rekrutiert und von Caspase-9 aktiviert. Mit einer speziellen Präparationstechnik zur Separation von Zytosol und Mitochondrium [199], gelingt der Nachweis einer Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol per Western Blot. Überexpression von Bcl-2 schützt vor Cytochrom c-Freisetzung in apoptosestimulierten Zellen [217, 218].

Die Apoptosestimuli Staurosporin, Etoposid und Mitomycin C konnten in Jurkat-Vektor-Kontrollzellen Cytochrom c aus dem Mitochondrium freisetzen. Wurde das Mitochondrium hingegen durch Bcl-2-Überexpression geschützt, so war nur noch eine sehr schwache Cytochrom c-Freisetzung bei Stimulation mit Staurosporin und Mitomycin C im Zytosol nachweisbar. Bei einer Caspaseninhibition durch zVAD-fmk-Vorinkubation war die Staurosporin-bedingte Cytochrom c-Freisetzung leicht verringert, jedoch nicht blockiert. Offensichtlich induzierte Staurosporin in direkter, Caspase-unabhängiger Weise die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien [219]. In Bcl-2-überexprimierenden Jurkatzellen war unter Staurosporinstimulation ein Membranpotentialverlust sichtbar (Abbildung 24). Dieser Potentialverlust ist nicht mit einer Cytochrom c Freisetzung gleichzusetzen [82], da je nach verwendetem Stimulus Cytochrom c-Freisetzung und Potentialverlust auch unabhängig voneinander stattfinden können. Mitomycin C war offensichtlich ebenfalls in der Lage Cytochrom c in Bcl-2-geschützten Zellen auf einem nicht weiter untersuchten Weg freizusetzen. Die Freisetzung ist vermutlich unabhängig von Caspasen (vgl. Abbildung 25-C).

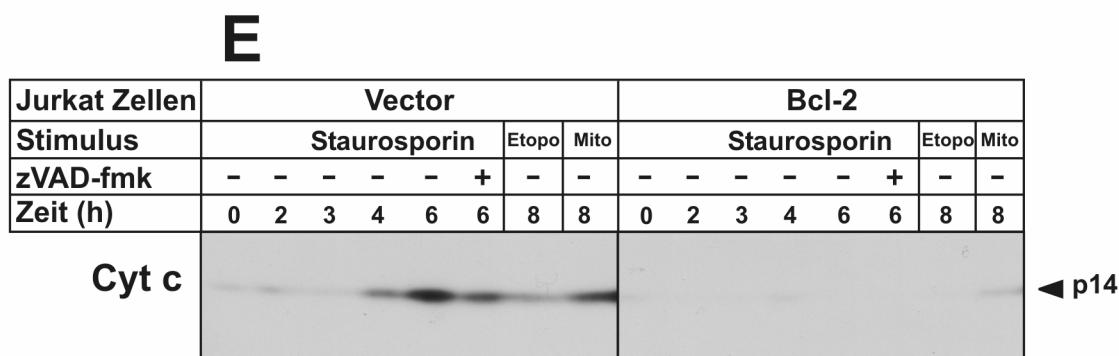


Abbildung 26: Western Blot-Analyse auf Cytochrom c-Freisetzung durch Staurosporin-vermittelte Apoptose in Jurkatzellen.

6×10^6 Jurkat-Vektor-Kontrollzellen, bzw. Bcl-2-überexprimierende Jurkatzellen wurden mit den Stimuli Staurosporin ($2,5 \mu\text{M}$), Etoposid ($100 \mu\text{g/ml}$) oder Mitomycin C ($25 \mu\text{g/ml}$) für die angegebenen Zeiten in 6-well-Gewebekulturplatten inkubiert. Vorinkubation erfolgte mit $100 \mu\text{M}$ zVAD-fmk (30 min) in den markierten Spuren (+). Es wurden Zytosolextrakte nach der Methode von Samali et al. [199] hergestellt und der Proteingehalt gemessen. Es wurden pro Spur $150 \mu\text{g}$ Protein aufgetragen und elektrophoretisch mittels SDS-PAGE (8–15 %) aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Western Blot. Das schwarze Dreieck markiert die Volllängenform von Cytochrom c (p14).

17 E

In den bisherigen Versuchen zur Rolle von Bcl-2 in der Staurosporin-induzierten Apoptose wurden Jurkatzellen verwandt. Um die Ergebnisse in einem anderen Zellsystem zu reproduzieren, wurde hierzu ein Western Blot mit MCF-7-Leervektor-Kontrollzellen und Bcl-2-überexprimierenden MCF-7-Brustkrebszellen durchgeführt (Abbildung 27).

In MCF-7-Wildtyp-Zellen war nach Inkubation mit Mitomycin C eine Spaltung von PARP detektierbar. In Bcl-2-überexprimierenden MCF-7-Zellen kann Mitomycin C keine PARP-Spaltung auslösen. In MCF-7-Zellen findet sich keine Effektorcaspase Caspase-3. Dies machte sich aber in dem Versuch nicht bemerkbar. Caspase-3 war für die PARP-Spaltung nicht essentiell und ist ersetzbar durch Caspase-7, -6 und -8 (vgl. Abbildung 4).

TRAIL konnte als extrinsischer Stimulus eine PARP-Spaltung in beiden Zelllinien induzieren.

Die Inkubation mit Staurosporin spaltete in MCF-7-Wildtyp-Zellen die p116-Volllängenform von PARP. Diese Spaltung von PARP war in Bcl-2-überexprimierenden MCF-7-Zellen nur teilweise blockiert. So war auch in diesen Zellen ein durch Bcl-2 nicht inhibierbarer Anteil der Staurosporin-induzierten Apoptose nachgewiesen.

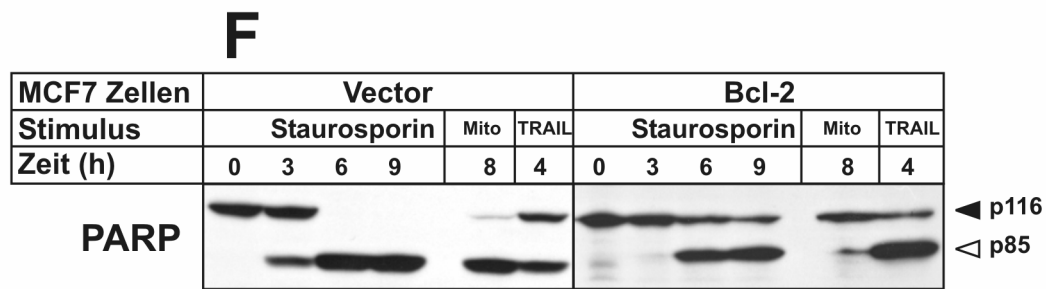


Abbildung 27: Western Blot-Analyse von PARP-Spaltung durch Staurosporin-vermittelte Apoptose in MCF-7-Zellen.

2×10^6 MCF-7-Vektor-Kontrollzellen, bzw. Bcl-2-überexprimierende MCF-7-Zellen wurden mit den Stimuli Staurosporin ($2,5 \mu\text{M}$), Mitomycin C ($25 \mu\text{g/ml}$) oder TRAIL (40 ng/ml) für die angegebenen Zeiten in 6-well-Gewebekulturplatten inkubiert. Vorinkubation erfolgte mit $100 \mu\text{M}$ zVAD-fmk (30 min) in den markierten Spuren (+). Anschließend folgt die Herstellung von Zelllysaten und Messung des Proteingehalts. Es wurden pro Spur $150 \mu\text{g}$ (PARP, Caspase-8), bzw. $250 \mu\text{g}$ (Caspase-9) Protein aufgetragen und elektrophoretisch mittels SDS-PAGE (8–15 %) aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Western Blot. Schwarz gefüllte Dreiecke markieren die Volllängenform (p116), weiße Dreiecke zeigen die Spaltform (p85) von PARP.

Wurden MCF-7-Zellen mit Staurosporin inkubiert, zeigte sich in Vektor-Zellen ein stärkerer Verlust an Zellvitalität als in Bcl-2-überexprimierenden Zellen (Abbildung 28). Bcl-2-überexprimierende MCF-7-Zellen waren nach Staurosporininkubation teilweise vor Vitalitätsverlust geschützt. Wieder fand sich der Bcl-2-unabhängige Mechanismus des Staurosporin-abhängigen Zelltods.

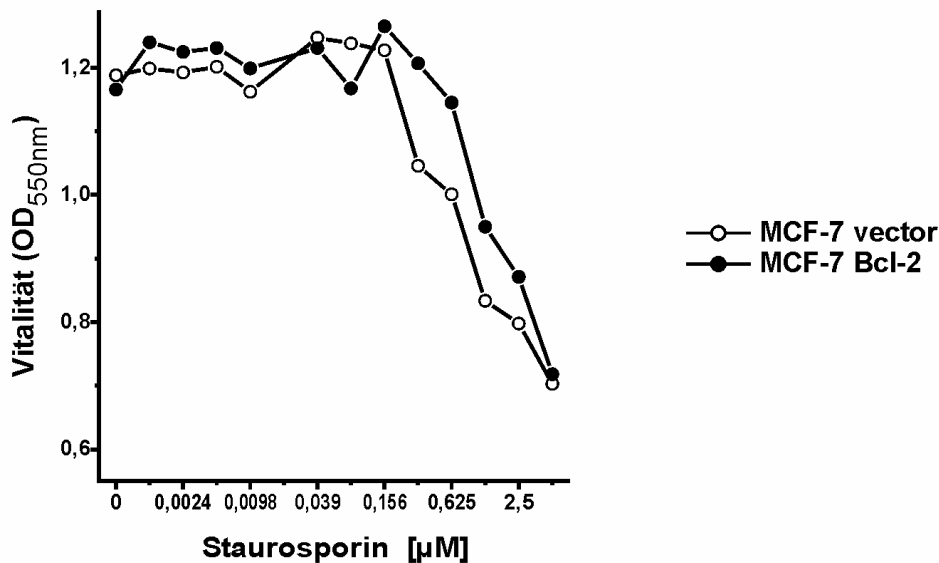


Abbildung 28: Die Vitalität von MCF-7-Zellen wird Bcl-2-abhängig durch Staurosporin reduziert

2×10^4 Jurkat-Vektor-Kontrollzellen (\circ), bzw. Jurkat-Bcl-2-Wildtyp-Zellen (\bullet) werden mit Staurosporin in der angegebenen Konzentrationsreihe in $150 \mu\text{l}$ Zellkulturmedium stimuliert. Die Inkubation mit den Apoptosestimuli erfolgt für 24 Stunden in einer 96-well-Gewebekulturplatte. Anschließend Zugabe von $10 \mu\text{l}$ MTT-Lösung (10 mg/ml) und weitere Inkubation für 5 Stunden. Danach erfolgt die Zugabe von $100 \mu\text{l}$ SDS-Lösung (10%) zum Auflösen der Formazankristalle. Die photometrische Messung der Absorption diente als Maß der Zellvitalität. Gezeigt sind die Mittelwerte von Duplikaten.

4.3.2 Untersuchungen zur Rolle von Bcl-X_L in der Staurosporin-induzierten Apoptose

In den bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Bcl-2 nur teilweise vor Staurosporin-induzierten Apoptose schützt. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob andere antiapoptotische Proteine ebenfalls zu einer Reduktion der Staurosporin-induzierten Apoptose führen. Untersucht wird die antiapoptotische Wirkung von Bcl-X_L, von dem bekannt ist, dass es ähnlich wie Bcl-2 an die proapoptotischen Proteine Bax und Bak bindet [128], und so deren membranschädigende Wirkung am Mitochondrium aufhebt.

In Abbildung 29 wird gezeigt, dass Etoposid sehr wohl in Leervektor-Kontrollzellen, nicht jedoch in Bcl-X_L-überexprimierenden Jurkatzellen Apoptose auslösen konnte. TRAIL konnte dagegen in beiden Zelllinien Apoptose auslösen; der extrinsische Weg wurde durch Bcl-X_L nicht blockiert. Bei Stimulation mit Staurosporin oder UCN-01 waren Bcl-X_L-überexprimierende Jurkatzellen gegenüber den Leervektor-Kontroll-Jurkatzellen in der Apoptose verzögert, aber wiederum nicht vollständig geschützt.

Staurosporin und das Staurosporinanalogue UCN-01 lösen demnach Apoptose über einen durch Bcl-X_L-schützbaren und einen Bcl-X_L-unbeeinflussten Weg aus. Dies gleicht den vorherigen Ergebnissen zu Bcl-2.

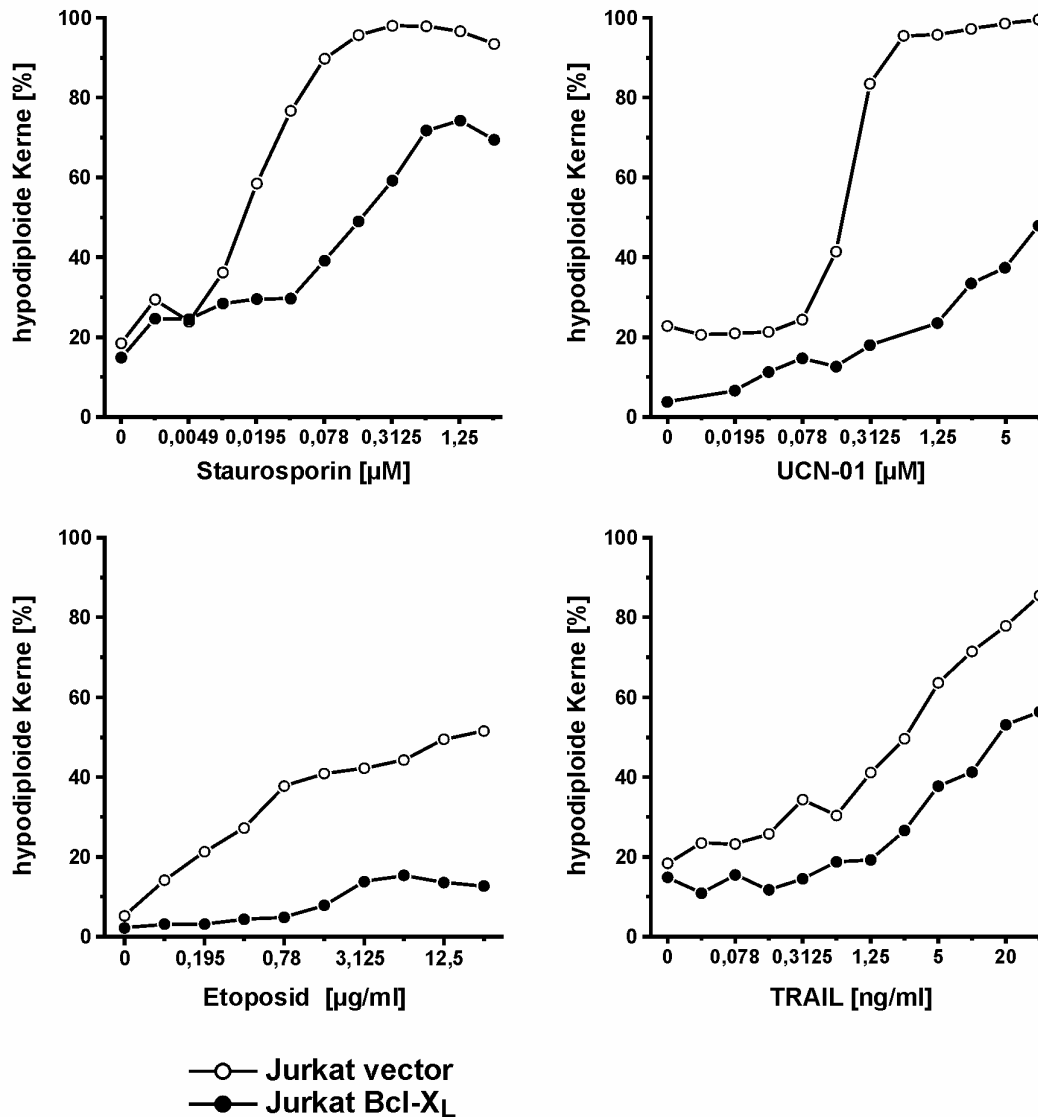


Abbildung 29: Staurosporin löst in durch Bcl-X_L-Überexpression geschützten Jurkatzellen Apoptose aus.

2×10^4 Jurkat-Vektor-Kontrollzellen (○), bzw. Jurkat-Bcl-X_L-Wildtyp-Zellen (●) wurden mit den Stimuli Staurosporin, UCN-01, Etoposid und TRAIL in der jeweils angegebenen Konzentrationsreihe stimuliert. Die Inkubation mit den Apoptosestimuli erfolgte für 24 Stunden in einer 96-well-Gewebekulturplatte. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung und die Auswertung der subdiploiden Zellkernfraktion als apoptotische Kerne (%). Gezeigt sind die Mittelwerte von Duplikaten.

Die Untersuchung der Zellvitalität von Bcl-X_L-überexprimierenden Jurkatzellen nach Staurosporinbehandlung zeigte im MTT-Vitalitätstest (Abbildung 30), dass Bcl-X_L vor Vitalitäts-

verlust schützt. Staurosporin induzierte jedoch in höheren Konzentrationen Zelltod über einen durch Bcl-X_L-Überexpression nicht schützbaeren Signalweg.

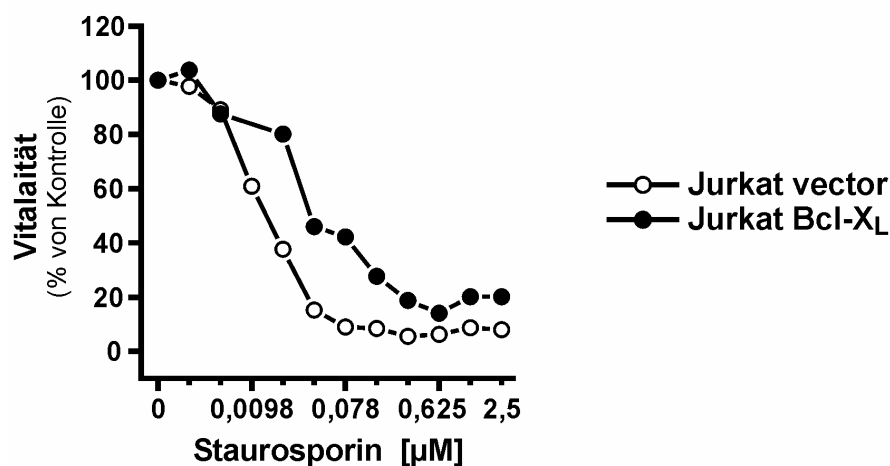


Abbildung 30: Staurosporin senkt die Vitalität in Bcl-X_L-überexprimierenden Zellen.

3x10⁴ Jurkat-Vektor-Kontrollzellen (○), bzw. Jurkat-Bcl-X_L-Wildtyp-Zellen (●) wurden mit Staurosporin in der angegebenen Konzentrationsreihe stimuliert. Die Inkubation mit den Apoptosestimuli erfolgte für 24 Stunden in einer 96-well-Gewebekulturplatte. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl MTT-Lösung (10 mg/ml) und eine weitere Inkubation für 4 Stunden. Zugabe von 100 µl SDS-Lösung (10 %) zum Auflösen der Formazankristalle (8 h). Die photometrische Messung der Absorption diente als Maß der Zellvitalität. Gezeigt sind die Mittelwerte von Duplikaten. (Kontrolle = 100%)

Die Schutzwirkung von Bcl-X_L bei Staurosporinstimulation konnte auch in MCF-7-Zellen belegt werden (Abbildung 31). Per Western Blot-Analyse konnte eine Spaltung der PARP-Volllängenform (p116) zum p85-Spaltprodukt nachgewiesen werden. Diese Spaltung war in Bcl-X_L-überexprimierenden Zellen verringert und nach 9 Stunden Staurosporininkubation war die p116-Volllängenform noch immer vorhanden. In MCF-7-Kontrollzellen war die PARP-Spaltung nach Staurosporininkubation von 6–9 Stunden hingegen vollständig.

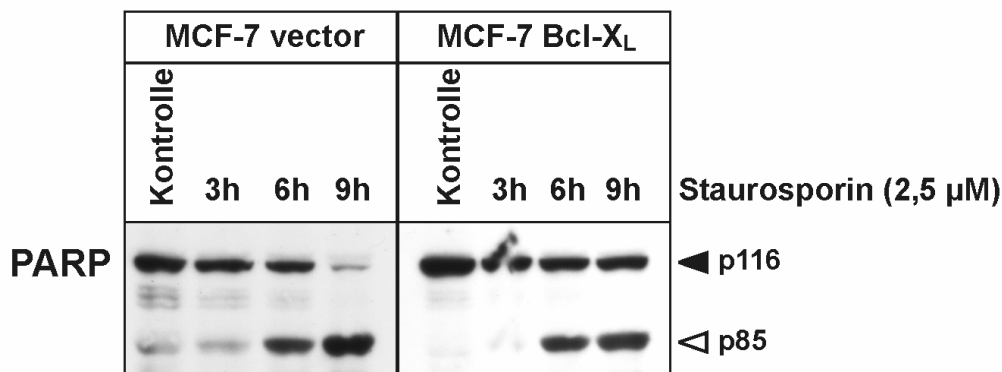


Abbildung 31: Staurosporin-vermittelte Apoptose spaltet PARP in MCF-7 Zellen

2×10^6 MCF-7-Vektor-Kontrollzellen, bzw. Bcl-X_L-überexprimierende MCF-7-Zellen werden mit Staurosporin (2,5 μM) für die angegebenen Zeiten in 2 ml Zellkulturmedium in 6-well-Gewebekulturplatten inkubiert (37°C/5 % CO₂). Anschließend Herstellung von Zelllysaten und Messung des Proteingehalts. Es wurden pro Spur 100 μg Protein aufgetragen und elektrophoretisch mittels SDS-PAGE (6–15 %) aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Western Blot. Schwarz gefüllte Dreiecke markieren die Volllängenform (p116); weiße zeigen die Spaltform (p85) von PARP.

4.3.3 Untersuchungen zur Rolle von Bax in der Staurosporin-induzierten Apoptose

Das Protein Bax gehört zur proapoptotischen Subgruppe der Bcl-2-Proteinfamilie [209]. Bax bindet am Mitochondrium und bildet Membranporen, durch die Cytochrom c freigesetzt und Apoptose ausgelöst wird.

Zur Untersuchung des Einflusses von Bax auf die Staurosporin-induzierten Apoptose wurden die Prostatakrebszellen DU145 verwendet. Die parentalen DU145-mock-Zellen sind Bax-defizient und zeigten eine verzögerte Apoptosereaktion auf Staurosporin. Wurde Bax in diese Zellen transfiziert (DU145-bax-Zellen), so war hingegen Apoptose wieder bei geringen Staurosporin-Konzentrationen möglich. Hierbei wurde offensichtlich der mitochondriale Weg über Bax durch Staurosporin aktiviert. In beiden DU145-Zelllinien war letztlich Apoptose zu beobachten.

Zusammen mit den vorangegangenen Versuchen zeigt dies, dass für Staurosporin neben einem mitochondrialen Signalweg ein zweiter Weg vorliegt, der in Abwesenheit von Bax oder bei Überexpression von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen (wie Bcl-2 und Bcl-X_L) das endogene Selbstmordprogramm aktiviert.

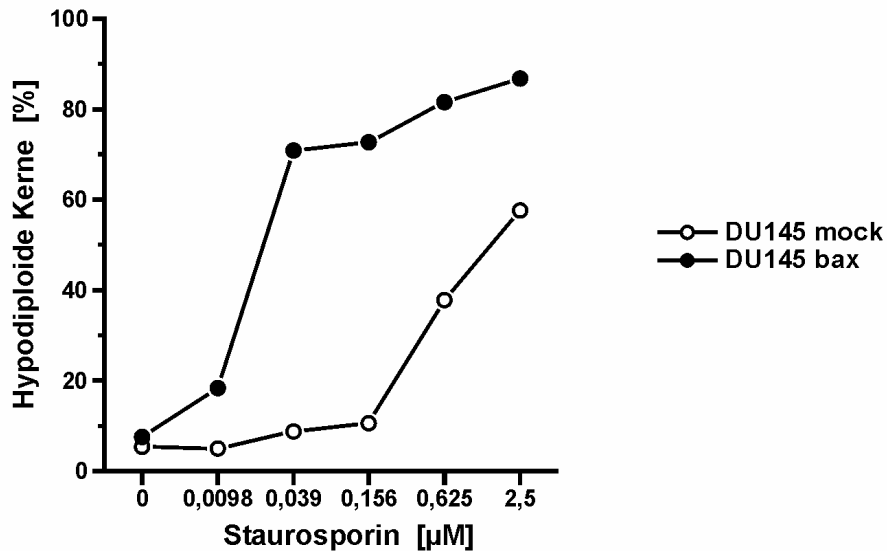


Abbildung 32: Staurosporin-vermittelte Apoptose wird in Bax defizienten DU145-Zellen teilweise blockiert.

5×10^4 DU145-mock-Kontrollzellen (\circ), bzw. DU145-bax-retransfizierte-Zellen (\bullet) werden mit Staurosporin in der angegebenen Konzentrationsreihe in 500 μl Zellkulturmedium stimuliert. Die Inkubation erfolgt für 24 Stunden in einer 24-well-Gewebekulturplatte. Die Zellen werden durch Trypsinbehandlung vom Boden der Kulturplatten gelöst und in Kulturmedium aufgenommen. Anschließende durchflusszytometrische Messung der subdiploiden Zellkernfraktion als apoptotische Kerne (%).

Damit war die Untersuchung der Rolle des Mitochondriums in der Staurosporin-induzierten Apoptose abgeschlossen. Im Folgenden sollte nun dieser neuartige durch Staurosporin induzierbare und Bcl-2-unabhängige Apoptosesignalweg der Apoptose erforscht werden. Hierbei sollten insbesondere die Rolle der dem mitochondrialen Apoptoseweg nachgeschalteten Signalelemente Apaf-1 und Caspase-9 näher überprüft werden.

4.4 Beteiligung von Proteinen mit Apoptosombezug in der Staurosporin-induzierten Apoptose.

Der im postmitochondrialen Teil entscheidende Schritt in der Apoptosesignalkaskade ist die Ausbildung des Apoptosoms. Diese hochmolekulare Struktur besteht aus den vier Komponenten: Cytochrom c, Apaf-1, dATP, und Caspase-9. Durch Cytochrom c und dATP konformativ verändertes Apaf-1 heptamerisiert und rekrutiert Caspase-9 über homophile Bindung beider Caspase-Rekrutierungs-Domänen (CARD) [220]. Caspase-9 wird nach Bindung in diesem Komplex durch induzierte Proximität aktiviert. Dann wird Caspase-3 ans Apoptosom rekrutiert und durch Caspase-9 aktiviert. Aktivierte Caspase-3 kann viele in die Apoptose involvierte Proteine spalten und den Zelltod herbeiführen [90, 221, 88, 215].

Die folgenden Untersuchungen wurden in Apaf-1-defizienten und Caspase-9-defizienten Zellen gemacht, um den Einfluss postmitochondrialer Proteine auf die Staurosporin-induzierte Apoptose herauszufinden.

4.4.1 Apaf-1

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Apaf-1-defiziente Zelllinien eingesetzt: Zum einen die humane Melanomzelllinie SK-mel-94 und zum anderen die MEF 3T9-Apaf-1^{-/-}-Zelllinie. MEF 3T9-Zellen sind nach dem 3T9-Protokoll immortalisierte murine embryonale Fibroblasten [222]. In der Zellkultur dieser Zellen zeigte sich eine starke Tendenz zur Ablösung vom Gewebekulturflaschenboden, was eine Verwendung für zellzahlintensive Versuche ausschloss.

Die SK-mel-Melanomzellen wurden in einer Publikation von Soengas et al. [223] beschrieben. Die Apaf-1-Produktion in diesen Melanomzellen wird epigenetisch durch Methylierung der DNA gesteuert. Eine Methylierung von CpG-Inseln der Promoterregion von *Apaf-1* führt dort zur Bindung von Histonacetylasen, die eine Ablesung des Gens unmöglich machen. Die Transkription kommt zum Erliegen und die Zelle ist Apaf-1-negativ. Die von Soengass beschriebenen Melanomzelllinien unterschieden sich im Gehalt an Apaf-1 und schienen für unsere Experimente geeignet. In unseren Händen zeigte sich nun, dass die Apaf-1-Expression in den verschiedenen Zelllinien nicht denen in der Publikation angegebenen entsprach. Die Bestimmung des Apaf-1-Proteingehalts per Western Blot (Abbildung 33) oder aber des mRNA-Expressionslevels per Real-Time-PCR (Abbildung 34) ergaben für die Zelllinie SK-mel-94 schließlich den geringsten Apaf-1-Gehalt. SK-mel-Melanomzellen sind einfach in der Handhabung und für die meisten Experimente gut geeignet. Die Apaf-1 Retransfektion in diese Zelllinie schlug bisher fehl, so dass keine direkte Vergleichszelllinie generiert werden konnte. Zur MEF-3T9-Zelllinie steht hingegen die entsprechende Kontrollzelllinie zur Verfügung.

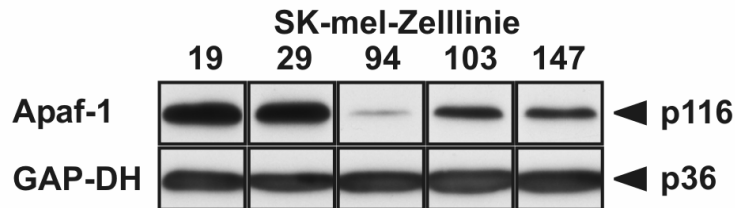


Abbildung 33: Untersuchung der Apaf-1-Expression verschiedener SK-mel-Zelllinien im Western Blot.

Von je 2×10^6 Zellen pro Zelllinie wurden Zelllysate hergestellt und elektrophoretisch mittels SDS-PAGE (6–15 %) aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Western Blot. Zur Proteinladungskontrolle diente die Detektion von GAP-DH.

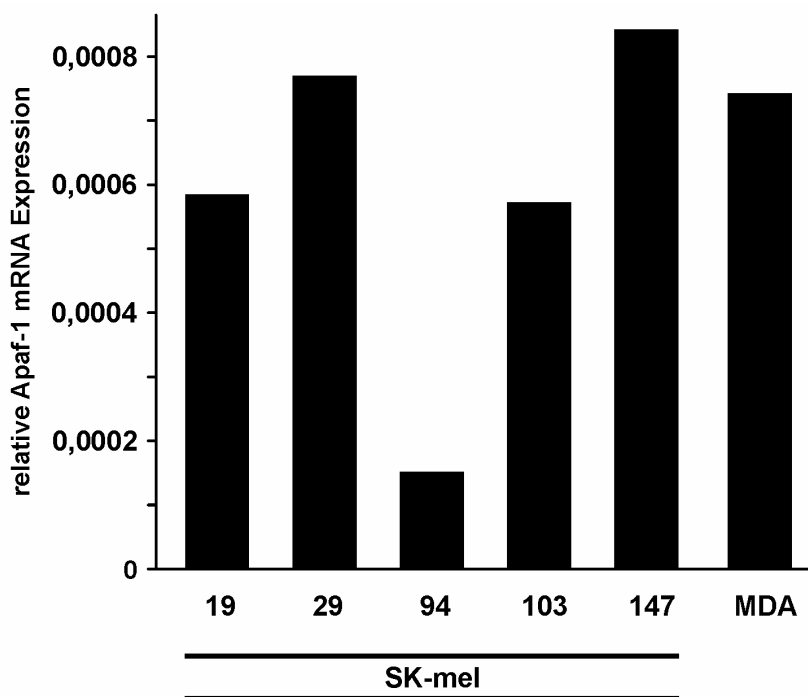


Abbildung 34: Analyse der Apaf-1-mRNA-Expression in verschiedenen Zelllinien mittels quantitativer Echtzeit-PCR.

Präparation der mRNA erfolgte aus je $0,5-1,0 \times 10^6$ Zellen über Standardprotokoll mit dem Macherey&Nagel RNA-Isolations-Kit. Die Amplifikation der RNA via PCR schloss sich an. Nach reverser Transkription zu cDNA erfolgte die Bestimmung der Expression in SK-mel-Zelllinien und MDA-MB-231 als Vergleichszelllinie per quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (Real-Time-Quantitative (RTQ)-PCR, Taqman; SYBR-Green-Technik). Eingesetzte cDNA-Menge 20 ng.

Wurden murine, embryonale Fibroblasten (MEF) mit Staurosporin inkubiert (Abbildung 35), so zeigte sich der Vitalitätsverlust in der Apaf-1-defizienten Zelllinie später als in der Kontrollzelllinie; aber einen vollkommenen Schutz besaßen die Apaf-1-defizienten Zellen auch

nicht. Bei hohen Staurosporin-Konzentrationen bricht die Vitalität in den Apaf-1-defizienten Zellen ebenfalls zusammen.

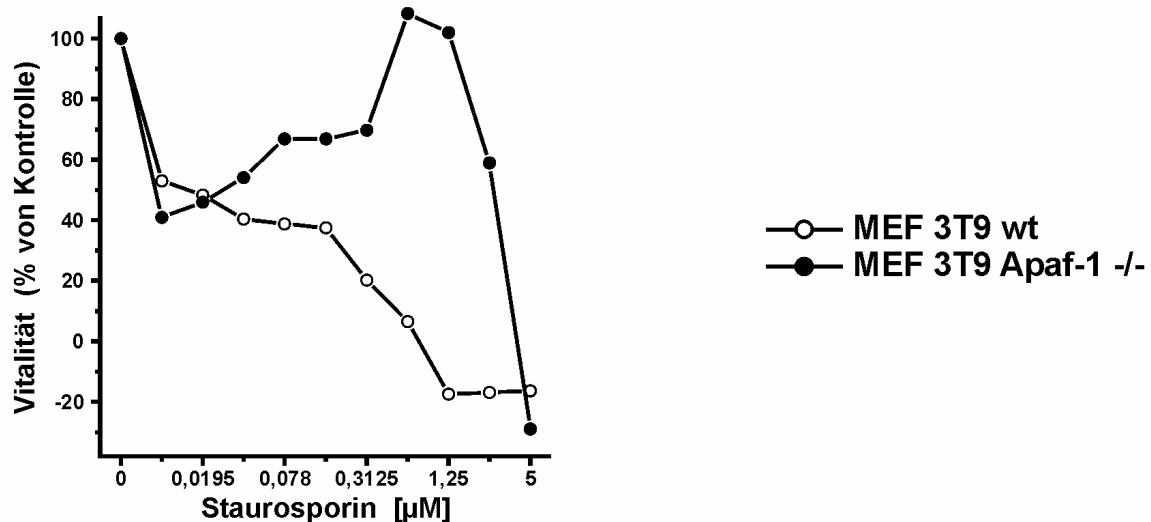


Abbildung 35: Vitalitätsabfall nach Staurosporininkubation ist in MEF 3T9-Zellen ohne Apaf-1 verlangsamt.

3×10^4 MEF-3T9-Kontrollzellen (\circ), bzw. MEF-3T9-Apaf-1^{-/-}-Zellen (\bullet) wurden mit Staurosporin in der angegebenen Konzentrationsreihe stimuliert. Die Inkubation mit den Apoptosestimuli erfolgte für 5 Stunden in einer 96-well-Gewebekulturplatte. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl MTT-Lösung (10 mg/ml) und Inkubation für weitere 4 Stunden. Danach Zugabe von 100 µl SDS-Lösung (10 %) zum Auflösen der Formazankristalle (8 h). Die photometrische Messung der Absorption diente als Maß der Zellvitalität. Gezeigt sind die Mittelwerte von Duplikaten. (Kontrolle = 100%)

Im nächsten Versuch (Abbildung 36) wurde die Caspaseaktivität mittels DEVDase-Assay in Wildtyp- und Apaf-1-defizienten-MEF-Zellen nach Apoptosestimulation bestimmt. Etoposid und Mitomycin C waren nicht in der Lage in Apaf-1-defizienten Zellen Apoptose zu induzieren; hingegen konnten beide Stimuli in den Wildtyp-Zellen Caspaseaktivität auslösen. Im Falle von Mitomycin C war die dafür notwendige Konzentration relativ hoch. Die bis zu einer Caspaseaktivität notwendige Inkubationszeit der mitochondrialen Stimuli liegt mit 10 Stunden über der in Jurkatzellen gemessenen 4–6 Stunden und weist auf eine Grundresistenz in diesen Zellen hin.

Unter Staurosporininkubation war die Caspaseaktivität bei Apaf-1-defizienten MEF-Zellen hingegen nicht vollständig blockiert. In den Wildtypzellen fand die Aktivierung aber schon zu einem deutlich früheren Zeitpunkt statt.

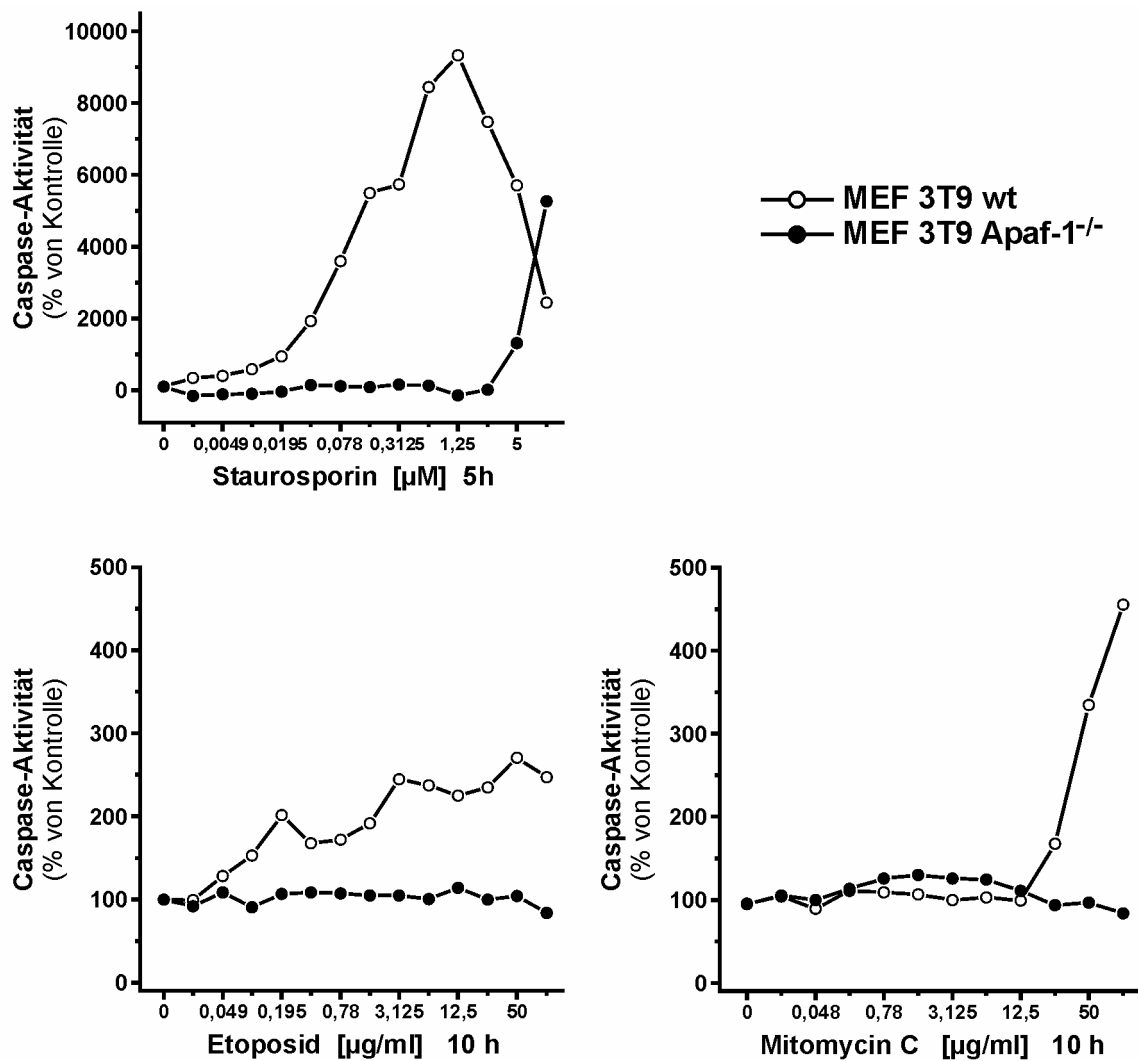


Abbildung 36: Caspase-Aktivität in MEF 3T9-Zellen

$1,5 \times 10^4$ MEF-3T9-Apaf-1^{-/-}-Zellen (●), bzw. MEF-3T9-Wildtyp-Zellen (○) werden mit aufsteigenden Konzentrationen an Staurosporin für 5 Stunden, bzw. Etoposid und Mitomycin C für 10 Stunden in 200 μ l Zellkulturmedium inkubiert (96-well-Gewebekulturplatte, 37°C/5 % CO₂). Nach der Stimulation erfolgt die fluorimetrische Messung der DEVD-AMC-Spaltung durch aktive Caspasen (37°C) im ELISA-Reader.

Die zweite verwendete Zelllinie, SK-mel-94, weist, wie in Abbildung 33 und Abbildung 34 ersichtlich, nur eine sehr geringe Expression von Apaf-1 auf. SK-mel-94 Zellen zeigten deswegen unter Inkubation mit Etoposid eine Resistenz. Staurosporin und das Staurosporin-Analogon UCN-01 sind hingegen in der Lage diese Apoptosehemmung zu durchbrechen.

Diese Daten belegen, dass Staurosporin und UCN-01 offensichtlich in der Lage sind, unabhängig von Apaf-1 und dem Apoptosom das endogene Selbstmordprogramm in der Zelle auszulösen.

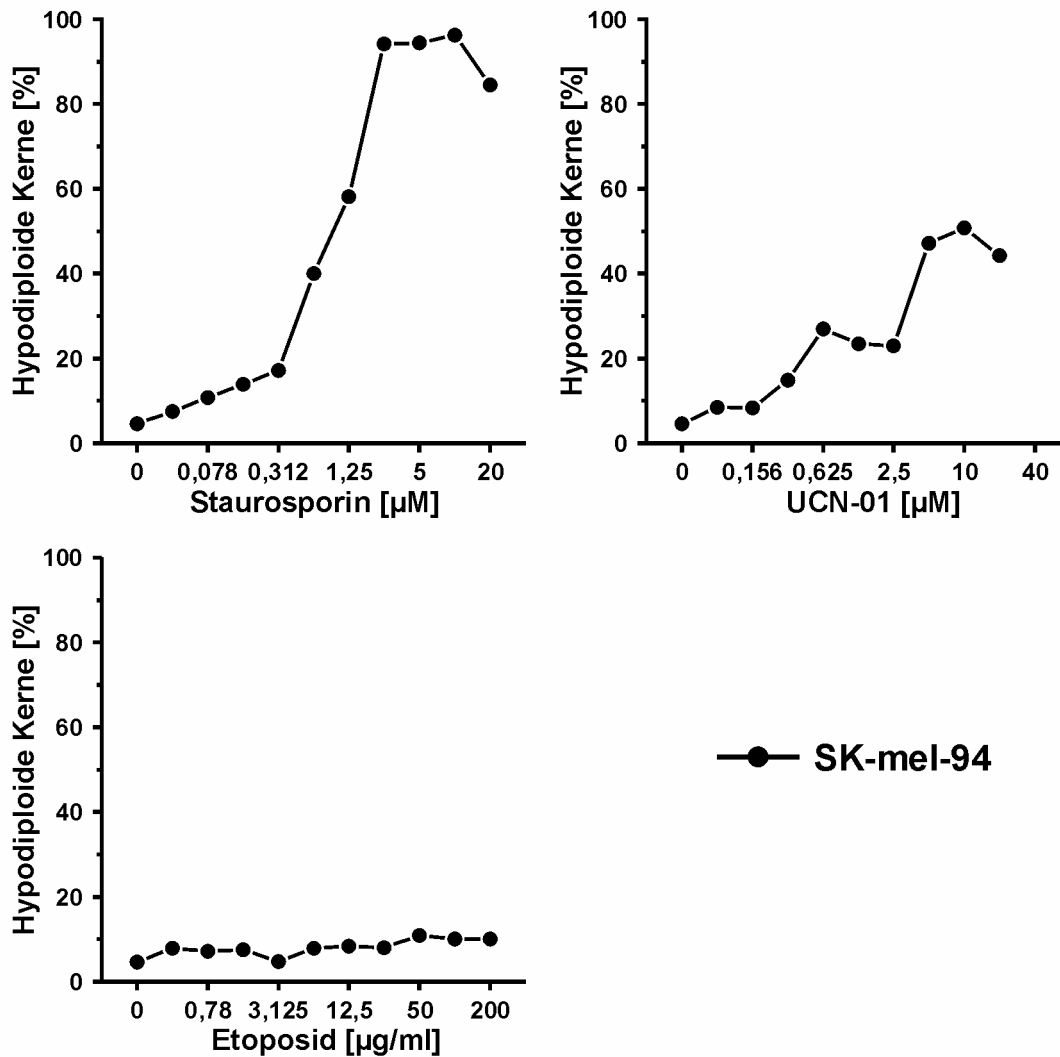


Abbildung 37: Staurosporin löst in SK-mel-94-Zellen Apoptose aus

$1,5 \times 10^5$ SK-mel-94-Zellen (●) werden mit den angegebenen Konzentrationen Staurosporin, UCN-01 oder Etoposid in der angegebenen Konzentrationsreihe in 500 µl Zellkulturmedium stimuliert. Die Inkubation erfolgt für 24 Stunden in einer 24-well-Gewebekulturplatte. Die Zellen werden durch Trypsinbehandlung vom Boden der Kulturplatten gelöst und in Kulturmedium aufgenommen. Anschließende durchflusszytometrische Messung der subdiploiden Zellkernfraktion als apoptotische Kerne (%).

Die in Abbildung 38 gezeigte Messung von Caspaseaktivität im Caspasenaktivitäts-Assay belegt, dass der mitochondriale Apoptoseauslöser Etoposid keine DEVD-AMC-Spaltung in SK-mel-94-Zellen auslösen konnte; Staurosporin und UCN-01 hingegen konnten Caspasen aktivieren, ohne dass sich das Apoptosom bilden konnte.

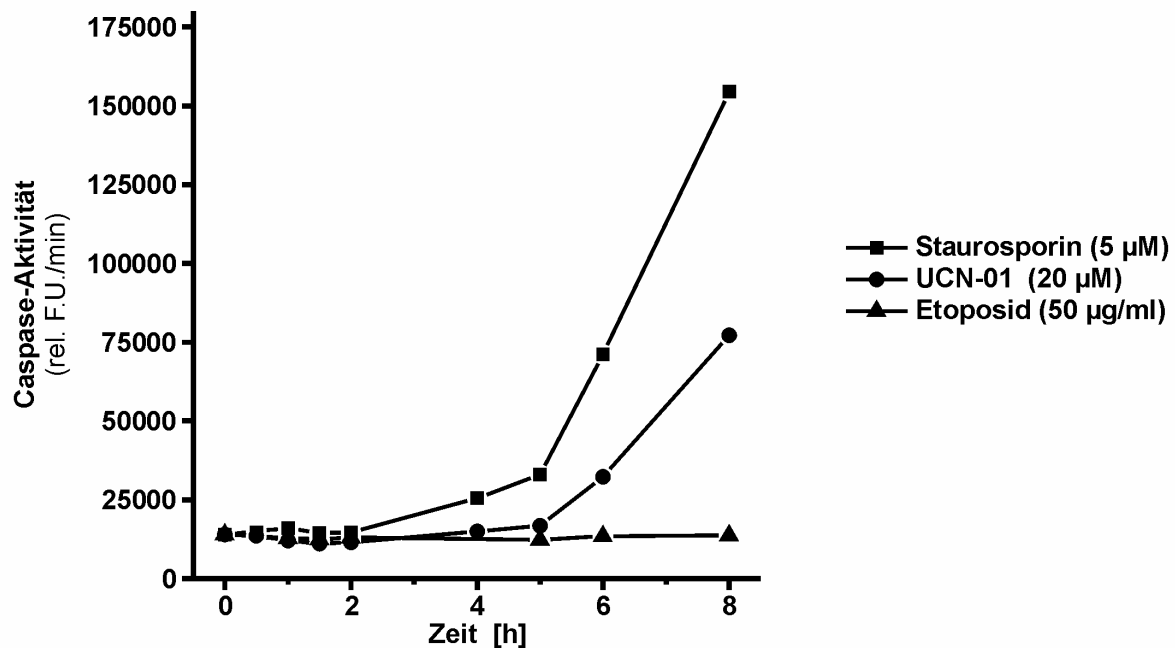


Abbildung 38: Caspase-Aktivität ausgelöst durch Apoptosestimuli in SK-mel-94-Zellen

4×10^4 SK-mel-94-Zellen (●) wurden 0–8 Stunden mit Staurosporin (5 μM), UCN-01 (20 μM), Mitomycin C (50 $\mu\text{g/ml}$) oder Etoposid (50 $\mu\text{g/ml}$) in einer 96-well-Gewebekulturplatte inkubiert. Nach der Stimulation erfolgte die fluorimetrische Messung der DEVD-AMC-Spaltung durch aktive Caspasen (37°C) im ELISA-Reader.

Der folgende Versuch (Abbildung 39) untersuchte die Vitalitätsänderungen von Apaf-1-defizienten SK-mel-94-Zellen. Die Stimulation mit Staurosporin und UCN-01 endete in einem Zusammenbruch der Zellvitalität. Die dafür notwendigen Konzentrationen waren recht hoch, was sich mit den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche deckt. Etoposid hatte keinen Einfluss auf die Zellvitalität.

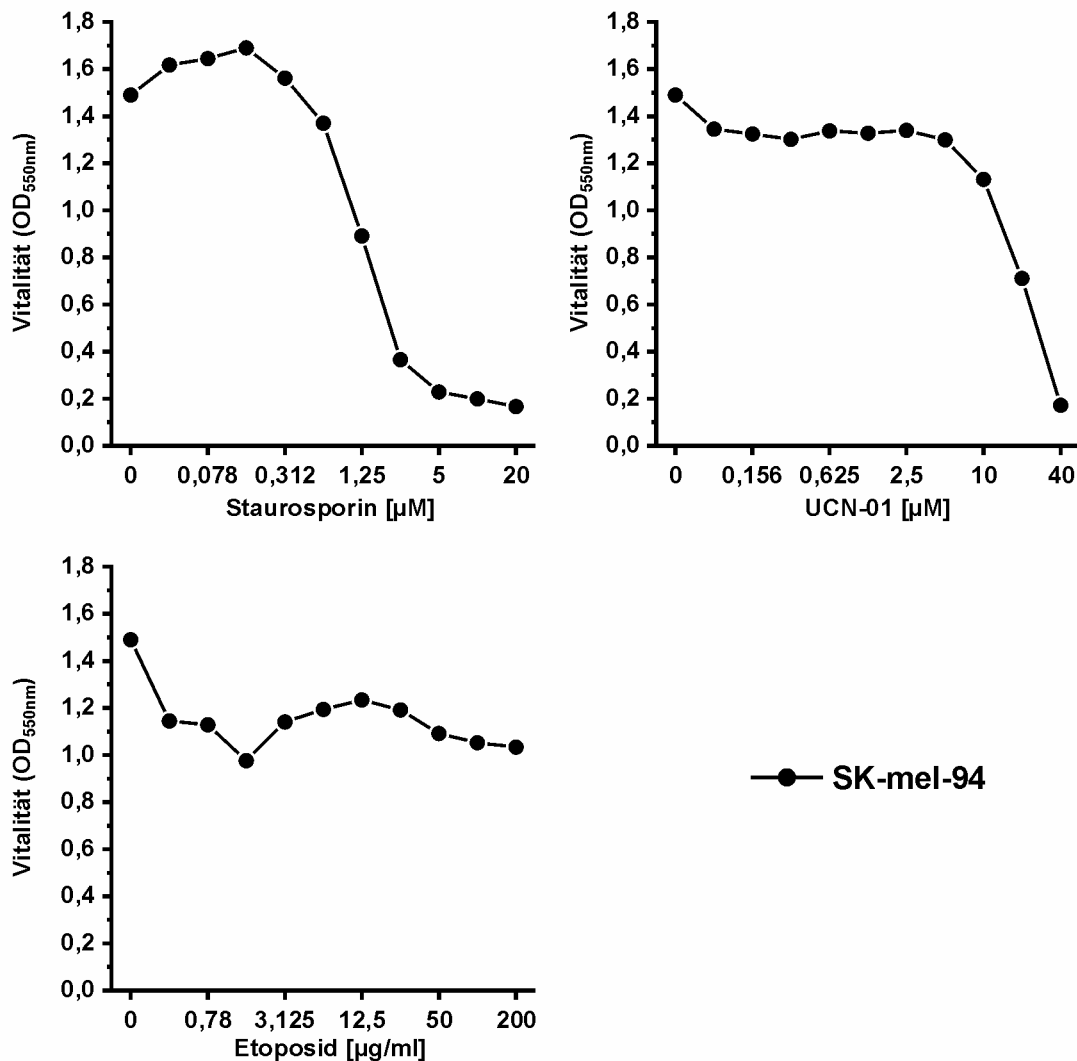


Abbildung 39: Staurosporin senkt die Vitalität in SK-mel-94-Zellen

3×10^4 SK-mel-94-Zellen (●) werden mit Staurosporin, UCN-01 und Etoposid in der angegebenen Konzentrationsreihe stimuliert. Die Inkubation mit den Apoptosestimuli erfolgt für 36 Stunden in einer 96-well-Gewebekulturplatte. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 μ l MTT-Lösung (10 mg/ml) und die Inkubation für weitere 4 Stunden. Danach Zugabe von 100 μ l SDS-Lösung (10 %) zum Auflösen der Formazankristalle (8 h). Die photometrische Messung der Absorption diente als Maß der Zellvitalität. Gezeigt sind die Mittelwerte von Duplikaten.

In Abbildung 40 werden Untersuchungen zum Membranpotential von Mitochondrien unter Apoptosestimulation gezeigt. Nachgewiesen wurde der Potentialzusammenbruch in SK-mel-94-Zellen durch Inkubation mit Staurosporin. Bei den mitochondrial agierenden Apoptosestimuli Etoposid und Mitomycin C konnte keine Potentialerniedrigung stattfinden, denn eine Aktivierung von Caspasen ist notwendig, um über die aktivierte Caspasekaskade dann die Mitochondrien zu zerstören. Zur Aktivierung der Kaskade kann es in den Apaf-1-

defizienten SK-mel-94-Zellen nicht kommen, da dafür der Zusammenbau des Apoptosoms notwendig ist.

Der hohe Kontrollwert zum Startzeitpunkt lässt sich durch eine Verzögerung in der Messung der TMRE-Lebendfärbung erklären. In dieser Zeit wurden die Zellen geschädigt und es war davon auszugehen, dass der Ausgangswert in der Höhe des 4-Stunden-Wertes von Etoposid lag. Denn es war nicht erklärbar, dass ein verlorenes Membranpotential durch potentiell schädigende Substanzen wieder hergestellt wurde.

In Jurkatzellen war der Staurosporin-induzierte Membranpotentialverlust durch den Caspaseinhibitor zVAD-fmk leicht gehemmt (S. Wesselborg, unveröffentlichte Daten, [224]). Dies wies auf eine Beteiligung von Caspasen an der Membranschädigung hin. Daneben gab es aber noch eine apoptosomunabhängige, direkte Wirkung von Staurosporin auf die Mitochondrien, die nicht mit zVAD-fmk-hemmbar war.

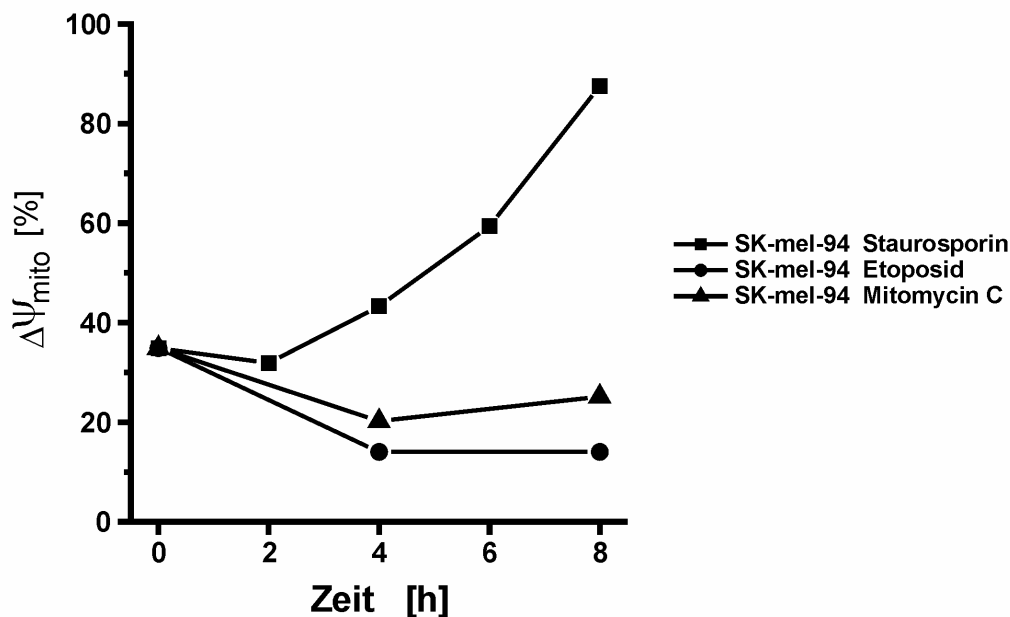


Abbildung 40: Mitochondrialer Potentialverlust unter Staurosporin

10^5 SK-mel-94-Zellen (●) wurden für 0–8 Stunden mit Staurosporin ($5\ \mu\text{M}$), Etoposid ($50\ \mu\text{g/ml}$) oder Mitomycin C ($50\ \mu\text{g/ml}$) in 24-well-Gewebekulturplatten inkubiert. Nach Lösen der Zellen vom Zellkulturplattenboden mittels Trypsin, wurden die Zellen für 30 min mit TMRE-Lösung ($25\ \text{nM}$ in Zellkulturmedium) gefärbt (37°C) und durchflusszytometrisch gemessen. Gefärbte Mitochondrien besitzen ein intaktes Membranpotential.

Die Aussagen der vorigen Versuche wurden mittels Western Blot-Analyse von SK-mel-94-Zellen bestätigt (Abbildung 41). Die Spaltung der Vollängenform von PARP (p116) war nach 12 Stunden Staurosporininkubation vollständig erfolgt. Eine Inhibierung der PARP-Spaltung durch den Caspaseinhibitor zVAD-fmk war zu erwarten, war aber nur teilweise

vorhanden. Als Begründung eines solchen Verhaltens war letztlich eine zu geringe Konzentration von zVAD-fmk durch Degradation anzunehmen (siehe oben). Etoposid war als Stimulus des mitochondrialen Signalwegs nicht in der Lage eine PARP-Spaltung in diesen Zellen zu induzieren.

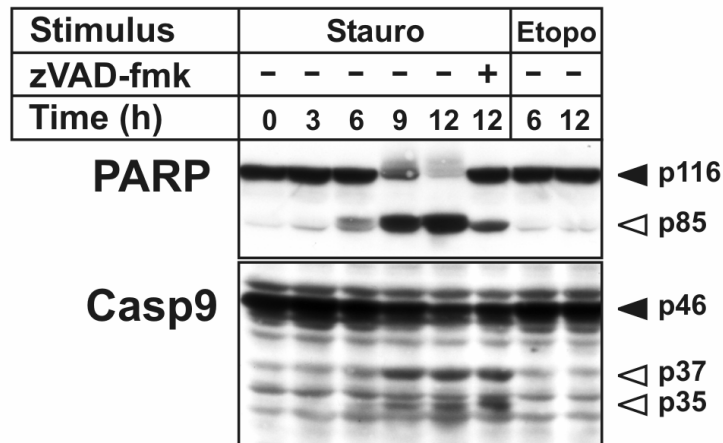


Abbildung 41: Staurosporin induziert Apoptose in Zellen ohne Apaf-1

2×10^6 SK-mel-94-Zellen wurden mit Staurosporin ($2,5 \mu\text{M}$) für die angegebenen Zeiten in 6-well-Gewebekulturplatten inkubiert. Anschließend erfolgte die Herstellung von Zelllysaten und Messung des Proteingehalts. Es wurden pro Spur $100 \mu\text{g}$ Protein aufgetragen und elektrophoretisch mittels SDS-PAGE (6–15 %) aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Western Blot. Schwarz gefüllte Dreiecke markieren die Volllängeform (p116), weiße Dreiecke zeigen die Spaltform (p85) von PARP.

4.4.2 Caspase-9

Neben Apaf-1 ist Caspase-9 essentiell für die Funktion des Apoptosoms. In den nächsten Versuchen wurde die Rolle von Caspase-9 in der Staurosporin-induzierten Apoptose untersucht. Die Experimente fanden in Caspase-9-freien Jurkatzellen statt. Als Kontrollzelllinie wurden Caspase-9-rekonstituierte Jurkatzellen verwendet.

Diese Jurkatzellen wurden mit apoptoseauslösenden Substanzen stimuliert. Die mitochondrialen Stimuli Etoposid und Mitomycin C konnten in der Caspase-9-defizienten Zelllinie keine Apoptose auslösen. Staurosporin und UCN-01 konnten – auch in hohen Konzentrationen – keine Apoptose induzieren. In Caspase-9-retransfizierten Jurkatzellen waren wieder alle vier Stimuli dazu in der Lage.

Eine Stimulation mit TRAIL oder anti-CD95, beides Stimuli des extrinsischen Signalwegs, konnte hingegen in beiden Zelllinien Apoptose bewirken. Damit war nachgewiesen, dass der im Signalweg nach der Caspase-9 gelegene Teil intakt ist – denn diesen teilen sich Caspase-9 und die im extrinsischen Signalweg aktivierte Caspase-8. Die Tatsache, dass die

Retransfektion mit Caspase-9 die Fähigkeit zur Apoptose vollständig wieder herstellt, beweist ebenfalls die intakten Apoptosewege unterhalb Caspase-9.

Für die Apoptoseauslösung durch die mitochondrialen Stimuli, sowie auch Staurosporin und UCN-01 ist Caspase-9 demnach von zentraler Bedeutung.

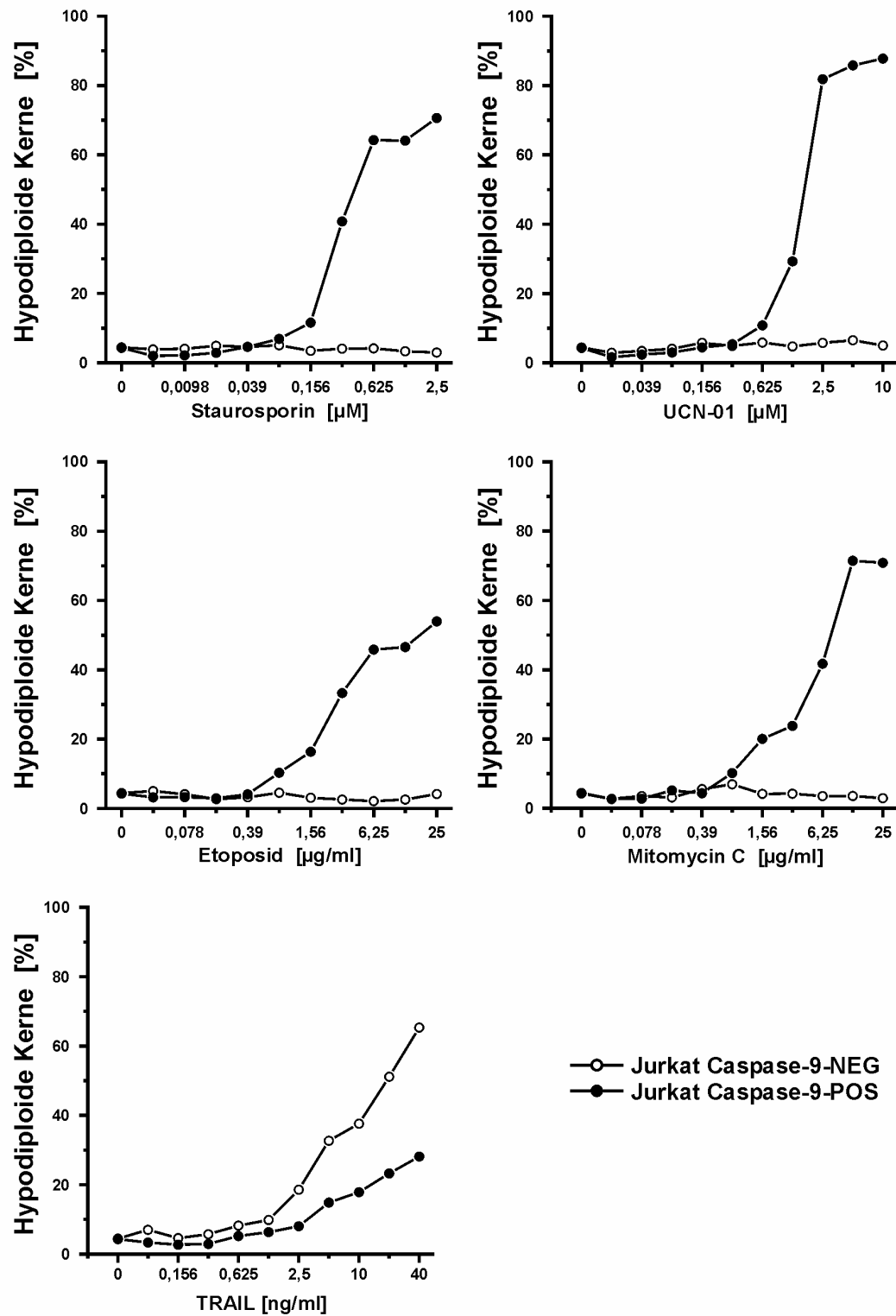


Abbildung 42: Staurosporin ist auf Caspase-9 zur Apoptoseauslösung angewiesen

5×10^4 Caspase-9-negative Jurkatzellen (\circ), bzw. Caspase-9-positive-Jurkatzellen (\bullet) wurden in der jeweils angegebenen Konzentrationsreihe mit den Stimuli Staurosporin, UCN-01, Etoposid, Mitomycin C, anti-CD95 und TRAIL stimuliert. Die Inkubation mit den Apoptosestimuli erfolgte für 24 Stunden in einer 96-well-Gewebekulturplatte. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung der subdiploiden Zellkernfraktion als apoptotische Kerne (%).

Im Versuch zur Abbildung 43 wurde die Caspaseaktivität nach Apoptosestimulation gemessen. Nach Stimulation mit den Apoptoseauslösern Staurosporin, UCN-01, Etoposid oder Mitomycin C war die Aktivität in der Jurkatzelllinie ohne Caspase-9 jeweils unverändert auf Kontrollniveau; bei den mit Caspase-9 retransfizierten Zellen wurde hingegen Aktivität gemessen. Unter TRAIL-Stimulation war Caspaseaktivität in Caspase-9-negativen wie auch -positiven Jurkatzellen zu finden. Die für die Spaltung des Fluorophors Ac-DEVD-AMC hauptverantwortliche Caspase-3, war in diesen Zellen auch ohne Caspase-9 allein durch Caspase-8 aktivierbar. Caspase-3 liegt in der Signalkaskade auch direkt hinter Caspase-9. Dies zeigt, dass Caspase-9 nach Stimulation mit Etoposid oder Mitomycin C entscheidend für die Auslösung des programmierten Zelltods ist. Bei Staurosporin und UCN-01 ist Caspase-9 der gemeinsame Nenner der beiden bisher nachgewiesenen Apoptosesignalwege: des Bcl-2-abhängigen Signalwegs und des Bcl-2-unabhängigen Signalwegs. Beide Signalwege sind ohne Caspase-9 unterbrochen und Apoptose kann nicht entstehen.

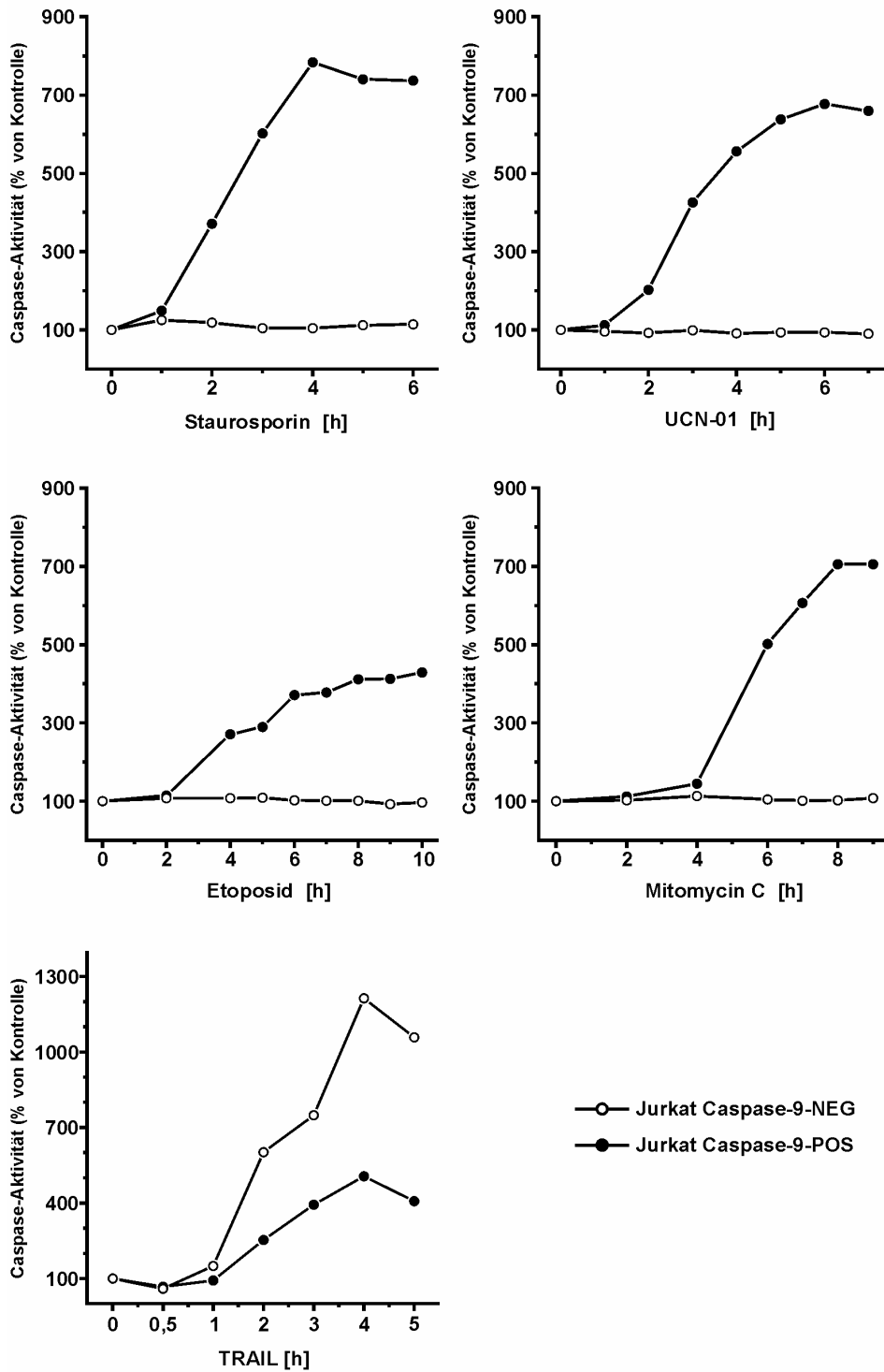


Abbildung 43: Staurosporin benötigt Caspase-9 zur Aktivierung von DEVDase-Aktivität

5×10^4 Caspase-9-positive-Jurkatzellen (●), bzw. Caspase-9-negative-Jurkatzellen (○) werden mit Staurosporin ($2,5 \mu\text{M}$) für 0–6 Stunden, UCN-01 ($10 \mu\text{M}$) für 0–7 Stunden, Etoposid ($25 \mu\text{g/ml}$) für 0–10 Stunden, Mitomycin C ($25 \mu\text{g/ml}$) für 0–9 Stunden, TRAIL (20 ng/ml) für 0–5 Stunden inkubiert (96-well-Gewebekulturplatte, $37^\circ\text{C}/5\% \text{ CO}_2$). Nach der Stimulation erfolgt die fluorimetrische Messung der DEVD-AMC-Spaltung durch aktive Caspasen (37°C) im ELISA-Reader. (Kontrolle = 100%)

Unter Staurosporin nahm bei Caspase-9-positiven Jurkatzellen die Zellvitalität stärker ab als bei Caspase-9-negativen Zellen (Abbildung 44). Dass bei Caspase-9-negativen Zellen überhaupt eine Reduktion der Vitalität auftrat, ist wahrscheinlich in der breitbandigen Kinaseinhibitor-Wirkung von Staurosporin begründet. Sie beeinflusst sehr viele Phosphorylierungsvorgänge und störte damit wohl auch die Redoxaktivität der Zellen. Bei mikroskopischer Betrachtung zeigten die Caspase-9-negativen Jurkatzellen keine typischen Apoptosemerkmale, wie Blebbing und Chromatinkondensation. Nach Inkubation mit 7-Hydroxystaurosporin (UCN-01) zeigte sich in Caspase-9-defizienten Zellen ebenfalls ein Vitalitätsverlust, aber wiederum waren keine mikroskopischen Apoptosemerkmale nachweisbar. Bei der Stimulation mit den mitochondrialen Stimuli Etoposid oder Mitomycin C wurde ausschließlich in Caspase-9-positiven Jurkatzellen ein Vitalitätsabfall detektiert; in Caspase-9-negativen Jurkatzellen kam es zu keinem Abfall der Vitalität. Nach der Inkubation mit TRAIL nahm in beiden Zelllinien die Vitalität gleichförmig ab. Caspase-9 ist offensichtlich für den Staurosporin- und UCN-01-bedingten Zelltod essentiell.

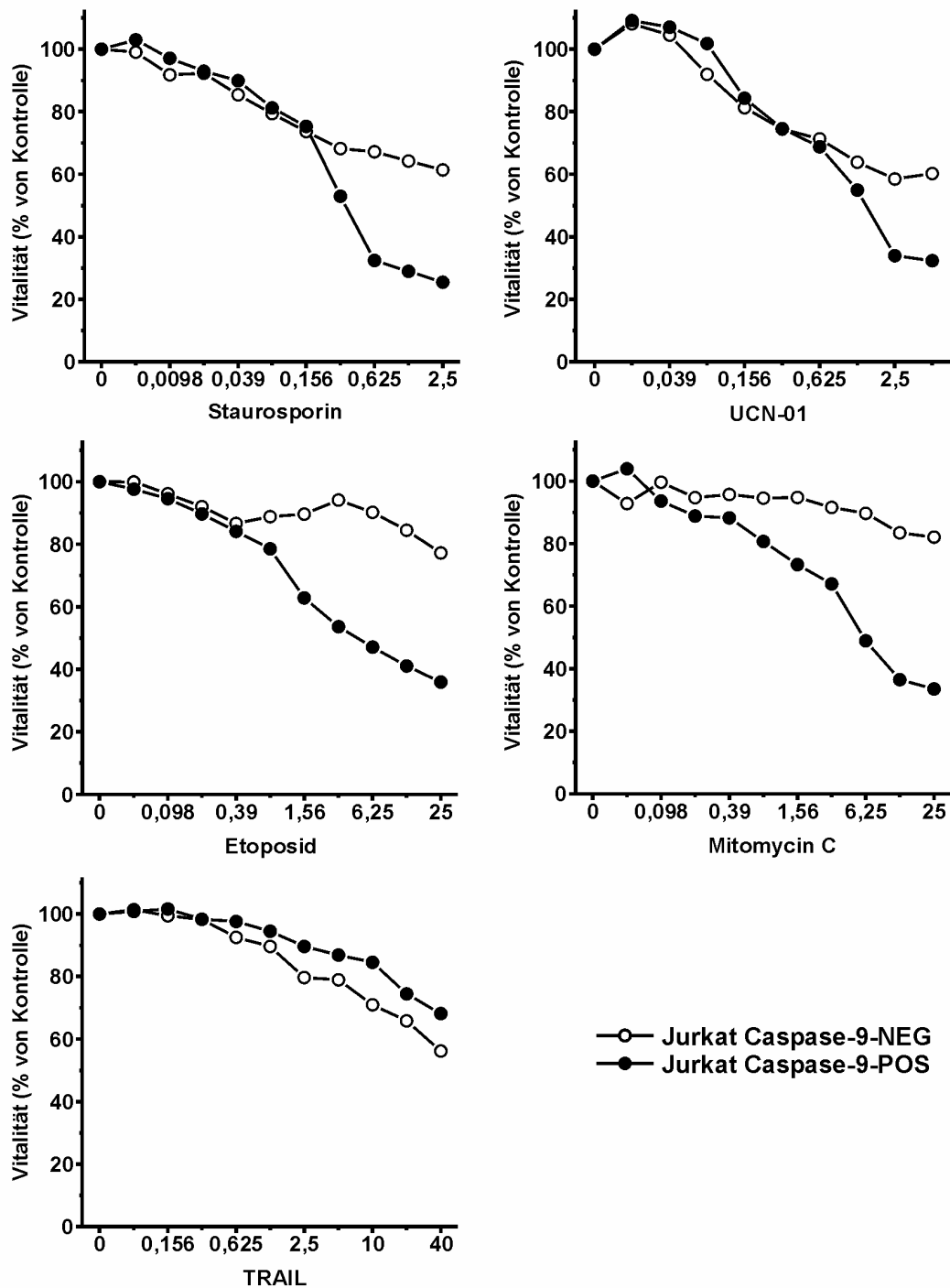


Abbildung 44: Caspase-9-negative Jurkatzellen unter Staurosporinbehandlung können ihre Vitalität länger aufrecht halten als Caspase-9-positive Jurkatzellen

5×10^4 Caspase-9-positive-Jurkatzellen (●), bzw. Caspase-9-negative-Jurkatzellen (○) wurden in der jeweils angegebenen Konzentrationsreihe mit den Stimuli Staurosporin, UCN-01, Etoposid, Mitomycin C und TRAIL stimuliert. Die Inkubation mit den Apoptosestimuli erfolgt für 24 Stunden in einer 96-well-Gewebekulturplatte. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 μ l MTT-Lösung (10 mg/ml) und weitere Inkubation für 4 Stunden. Danach Zugabe von 100 μ l SDS-Lösung (10 %) zum Auflösen der Formazankristalle (8 h). Die photometrische Messung der Absorption diene als Maß der Zellvitalität. Gezeigt sind die Mittelwerte von Duplikaten. (Kontrolle = 100%)

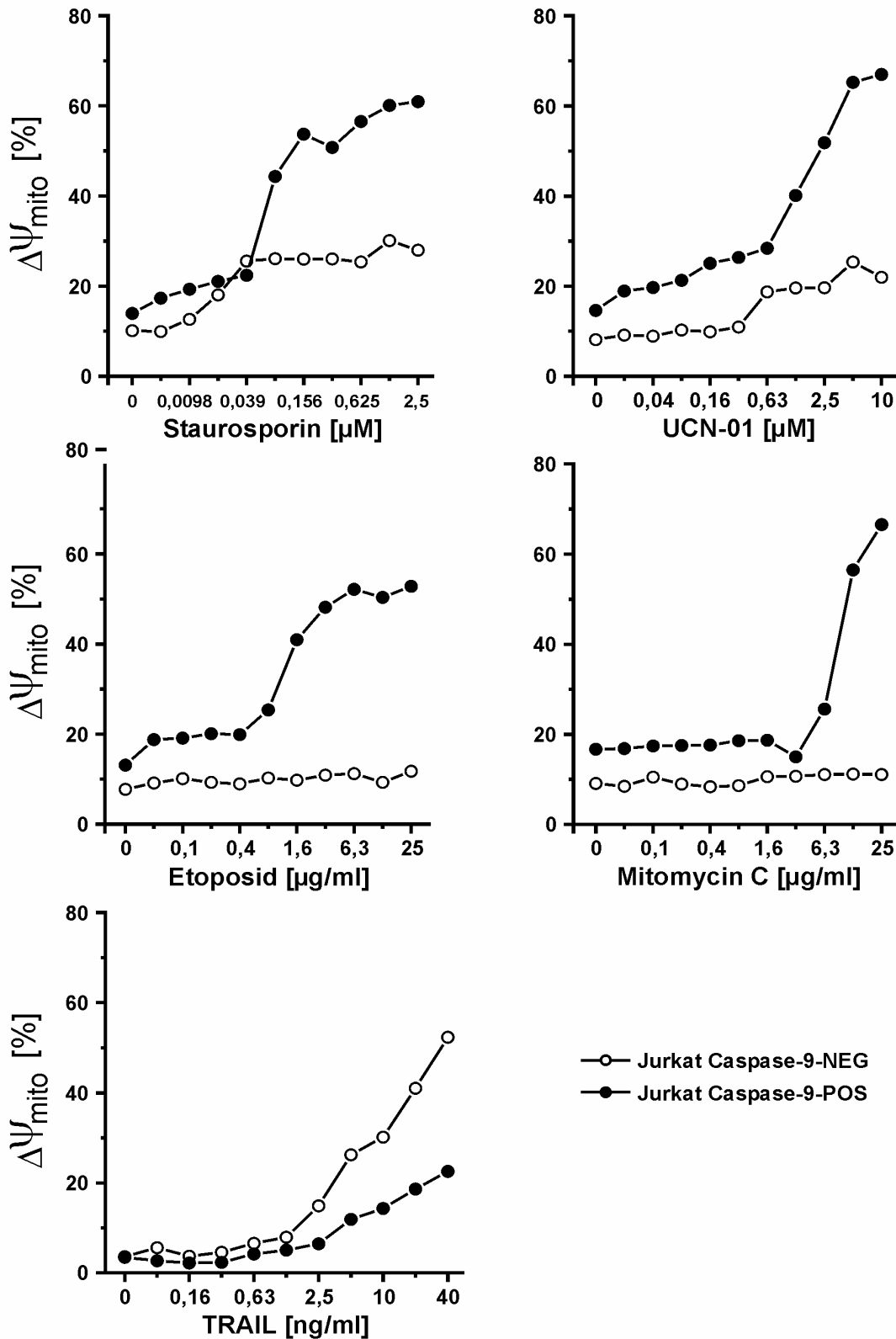
Die in Abbildung 45 gezeigte Messung des Mitochondrienmembranpotentials, wies für Caspase-9-negative Jurkatzellen nach Inkubation mit Etoposid oder Mitomycin C ein unverändertes Membranpotential nach. Jurkatzellen mit retransfizierter Caspase-9 zeigten eine Reduzierung dieses Potentials nach der Stimulation mit den mitochondrialen Stimuli. Bei einer Inkubation mit Staurosporin oder UCN-01 reagierten Caspase-9-positive Jurkatzellen mit Potentialverlust. Caspase-9-negative Jurkatzellen zeigten diese Reaktion nicht, bzw. nur in sehr geringem Umfang. Der leichte Potentialabfall in den Caspase-9-negativen Jurkatzellen unter Staurosporininkubation war möglicherweise darauf zurückzuführen, dass in diesen Zellen eine direkt durch Staurosporin vermittelte, Caspase-9-unabhängige Potentialschädigung auftritt. Diese Potentialabnahme stellt kein Anzeichen von Apoptose dar (vgl. Abbildung 42 und Abbildung 43) und war schon als unabhängig von der Cytochrom c Freisetzung nachgewiesen [219].

Auf TRAIL-Stimulation reagierten paradoxerweise Caspase-9-defiziente Jurkatzellen empfindlicher als Caspase-9-positive Jurkatzellen. Eigentlich war zu erwarten, dass in Caspase-9-positiven Zellen ein stärkerer Abfall zu verzeichnen ist, da eine Apoptoseverstärkung durch die Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs hinzukommt. Eine Erklärung dafür ist bisher nicht gefunden, zumal dieser Unterschied in anderen Apoptoseassays so nicht auffällt.

Abbildung nächste Seite:

Abbildung 45: Mitochondrienpotentialzusammenbruch durch Staurosporin in Caspase-9-negativen Jurkatzellen blockiert

10⁵ Caspase-9-positive-Jurkatzellen (●), bzw. Caspase-9-negative-Jurkatzellen (○) werden mit Staurosporin oder UCN-01 für 3 Stunden, Etoposid oder Mitomycin C für 10 Stunden oder TRAIL für 4 Stunden in 200 µl Zellkulturmedium in 96-well-Gewebekulturplatten inkubiert (37°C/5 % CO₂). Anschließend werden die Zellen für 30 min mit TMRE-Lösung (25 nM in Zellkulturmedium) gefärbt (37°C/5 % CO₂). Die Messung erfolgt im Durchflusszytometer (FACSCalibur). Auswertung der Daten mit der Software CellQuest.



Die Externalisierung von Phosphatidylserin (PS) (Abbildung 46), stellt ein sehr frühes in der Apoptose auftretendes Ereignis dar und lässt sich mittels FITC-markiertem Annexin-V durchflusszytometrisch nachweisen. Die Versuche zur Messung von externalisiertem PS

zeigten, dass Caspase-9 essentiell für die Phosphatidylserin-Externalisierung ist. Denn nach Apoptosestimulation in Caspase-9-defizienten Zellen findet kaum Externalisierung statt.

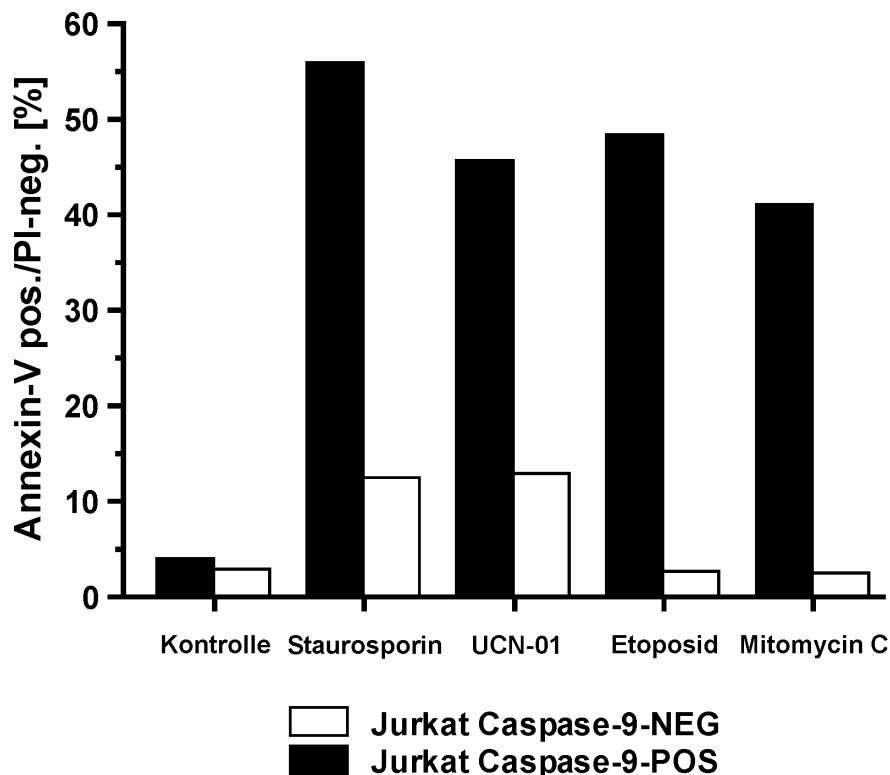


Abbildung 46: Nachweis staurosporinvermittelter Apoptose durch Phosphatidylserin-Externalisierung erfordert Caspase-9

10^5 Jurkatzellen wurden mit $2,5 \mu\text{M}$ Staurosporin oder $5 \mu\text{M}$ UCN-01 für 5 Stunden, oder $25 \mu\text{g/ml}$ Etoposid oder Mitomycin C für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FITC-Annexin-V und Propidiumiodid doppelgefärbt und zytofluorimetrisch ausgewertet. Annexin-V-positive/Propidiumiodid-negative Zellen wurden als apoptotisch erkannt (%).

Die Western Blot-Analyse der Caspase-9-defizienten Jurkatzellen diente dem Nachweis der tatsächlichen Abwesenheit von Caspase-9 und wird in Abbildung 47 gezeigt. Caspase-9-negative Jurkatzellen waren frei von Caspase-9. Detektiert wurde lediglich je eine unspezifische Bande oberhalb bzw. unterhalb der Bande der Caspase-9-Proform (46 kDa). Gleichzeitig wurde in den retransfizierten Jurkatzellen Caspase-9 bestätigt.

Nach Apoptosestimulation fanden sich die typischen Spaltungsmuster von Caspase-9 (p37/35), die retransfizierte Caspase-9 war demnach funktionell aktiv.

Unter TRAIL-Inkubation erfolgt in Caspase-9-positiven und Caspase-9-negativen Jurkatzellen die Spaltung der Vollformen der Caspase-8 (p55/53) in die Spaltprodukte p43 und p41. Ebenso war die Spaltung der p32-Vollformen von Caspase-3 zu den Spaltprodukten

p20/17 detektierbar und die Spaltung des Caspasesubstrats PARP p116 zum Spaltprodukt p85 fand statt. Die Signalwege für extrinsische Apoptose waren in beiden Jurkatzelllinien intakt.

Nach Inkubation mit mitochondrialen Stimuli fand in Caspase-9-negativen Jurkatzellen keine Spaltung von Caspase-8, Caspase-3 und PARP statt. In Caspase-9-retransfizierten Zelllinien folgte der Inkubation mit Etoposid oder Mitomycin C die entsprechende Spaltung.

In Staurosporin-behandelten Caspase-9-defizienten Jurkatzellen war eine Spaltung von PARP, Caspase-3 und Caspase-8 nicht zu detektieren. In Caspase-9-rekonstituierten Jurkatzellen war die Spaltung wieder möglich.

Caspase-9 besetzt offensichtlich eine zentrale Stelle in der Staurosporin-induzierten Apoptose. Ohne Caspase-9 ist keine Staurosporin-induzierte Apoptose möglich.

In den Western Blots mit Inkubation durch Staurosporin oder Etoposid zeigte sich eine Abnahme der PARP-p116-Bande in Caspase-9-negativen Jurkatzellen. Dies war unerwartet. Drei Möglichkeiten zur Erklärung boten sich an: Zum einen konnte die aufgetragene Proteinmenge zu gering gewesen sein (in den Banden 4, 6, 8 und 12h Jurkat Caspase-9-negativ) und sie könnte von den anderen aufgetragenen Mengen (0 und 2 h Jurkat Caspase-9-negativ, sowie Jurkat Caspase-9-positiv) im Gel stark abgewichen sein. Dem stand entgegen, dass die Western Blots von Caspase-8 und -3 aus dem gleichen SDS-PAGE-Ansatz stammten, und deren Banden nicht im gleichen Muster voneinander abwichen. Die zweite Möglichkeit war, dass eine schnelle Degradation von PARP abgelaufen war und ein nicht detektierbares PARP-Spaltprodukt entstand. Diese Spaltung konnte nicht durch Caspase-8 oder -3 hervorgerufen sein, denn bei beiden war keine Aktivierung erkennbar. In der mikroskopischen Kontrolle von inkubierten Zellen war auch kein Zelltod detektierbar. Die stimulierten Caspase-9-negativen Jurkatzellen und die unstimulierten Kontrollen unterschieden sich nicht. Die dritte Möglichkeit war ein Fehler während des Proteintransfers und eine daraus resultierende Abschwächung der Banden. Dies war wegen der Gleichförmigkeit der Störung in beiden Bandenmustern wahrscheinlich, zumal beide Blots gemeinsam transferiert wurden. Die Ursache der Abnahme von PARP im Western Blot bleibt dennoch ungeklärt. Entscheidend bleibt dabei festzuhalten, dass Caspase-9 für die Staurosporin-induzierten Apoptose essentiell ist.

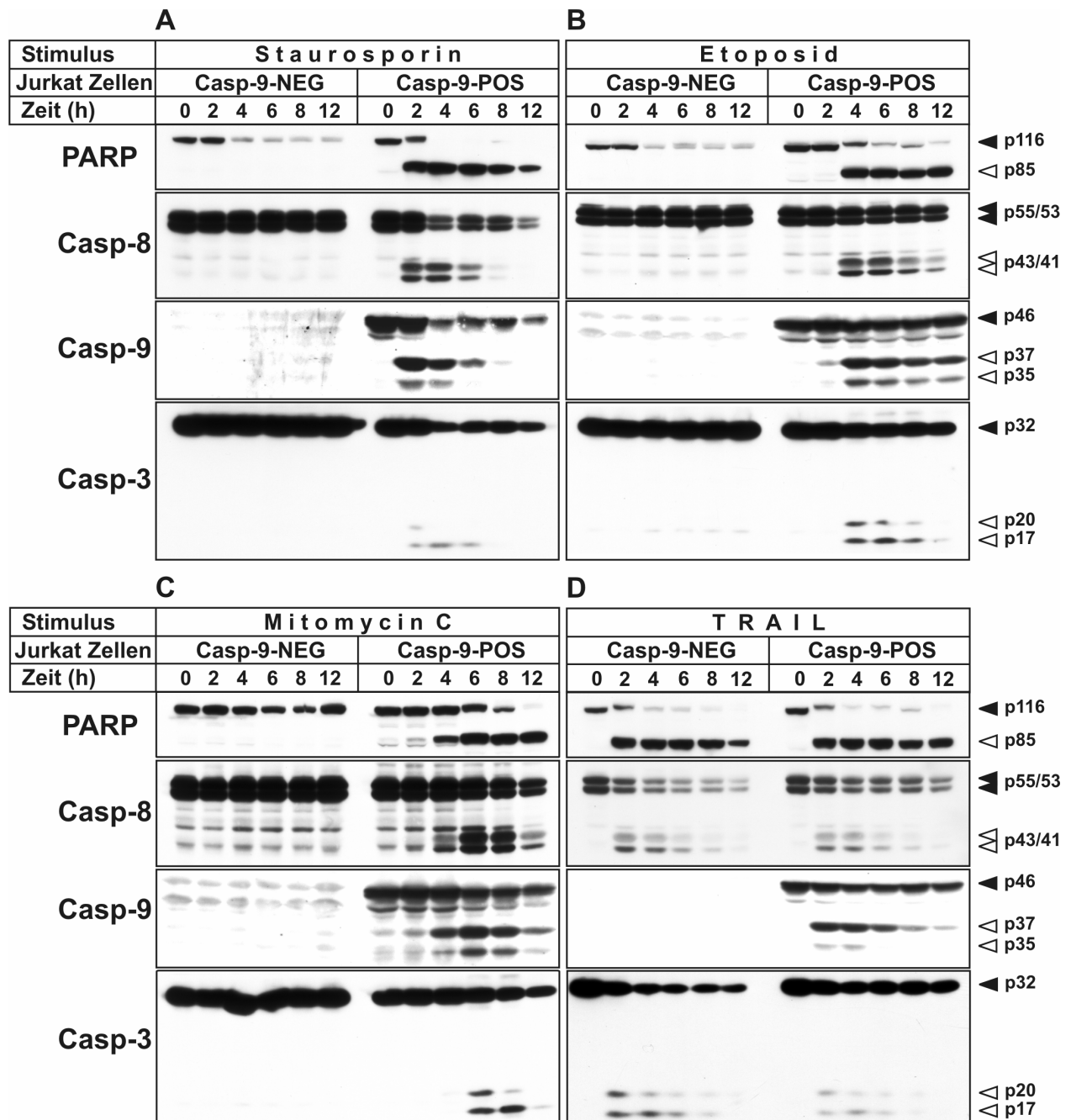


Abbildung 47: Western Blot-Analyse: Staurosporin benötigt Caspase-9 zur Caspasen- und PARP-Spaltung

2×10^6 Caspase-9-positive und Caspase-9-negative Jurkatzellen wurden mit Staurosporin ($2,5 \mu\text{M}$), Etoposid ($50 \mu\text{g/ml}$), Mitomycin C ($25 \mu\text{g/ml}$) oder TRAIL (40 ng/ml) für die angegebenen Zeiten in 6-well-Gewebekulturplatten inkubiert. Anschließend erfolgte die Herstellung von Zelllysaten und eine Messung des Proteingehalts. Es wurden pro Spur $100 \mu\text{g}$ (PARP, Caspase-8, Caspase-3), bzw. $200 \mu\text{g}$ (Caspase-9) Protein aufgetragen und elektrophoretisch mittels SDS-PAGE (8–15 %) aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Western Blot. Schwarz gefüllte Dreiecke markieren die jeweilige Volllängenform, weiße Dreiecke zeigen die dazugehörigen Spaltformen der Proteine.

Um die zuvor gefundenen Hinweise auf einen neuen Signalweg für die Staurosporin-induzierten Apoptose in einem weiteren Zellsystem zu überprüfen, wurden abschließende Versuche mit Wildtyp- und Caspase-9-defizienten-MEF-3T9-Zelllinien durchgeführt (Abbildung 48). In Wildtypzellen konnte nach Stimulation mit Etoposid eine Kernfragmentierung nachgewiesen werden; hingegen war in Caspase-9-defizienten-MEF-Zellen keine Apoptose zu finden. Analog erreichte Mitomycin C im Wildtyp hohe Apoptoseraten; in den Caspase-9-defizienten Mausfibroblasten fand keine Apoptose statt. Staurosporin oder UCN-01 lösten in den Wildtyp-MEF-Zellen ebenfalls Apoptose aus, konnten jedoch in den Caspase-9-defizienten MEF-Zellen keine Apoptose induzieren. Caspase-9 war in den murinen embryonalen Fibroblasten ebenfalls das zentrale Protein für die Staurosporin-induzierte Apoptose.

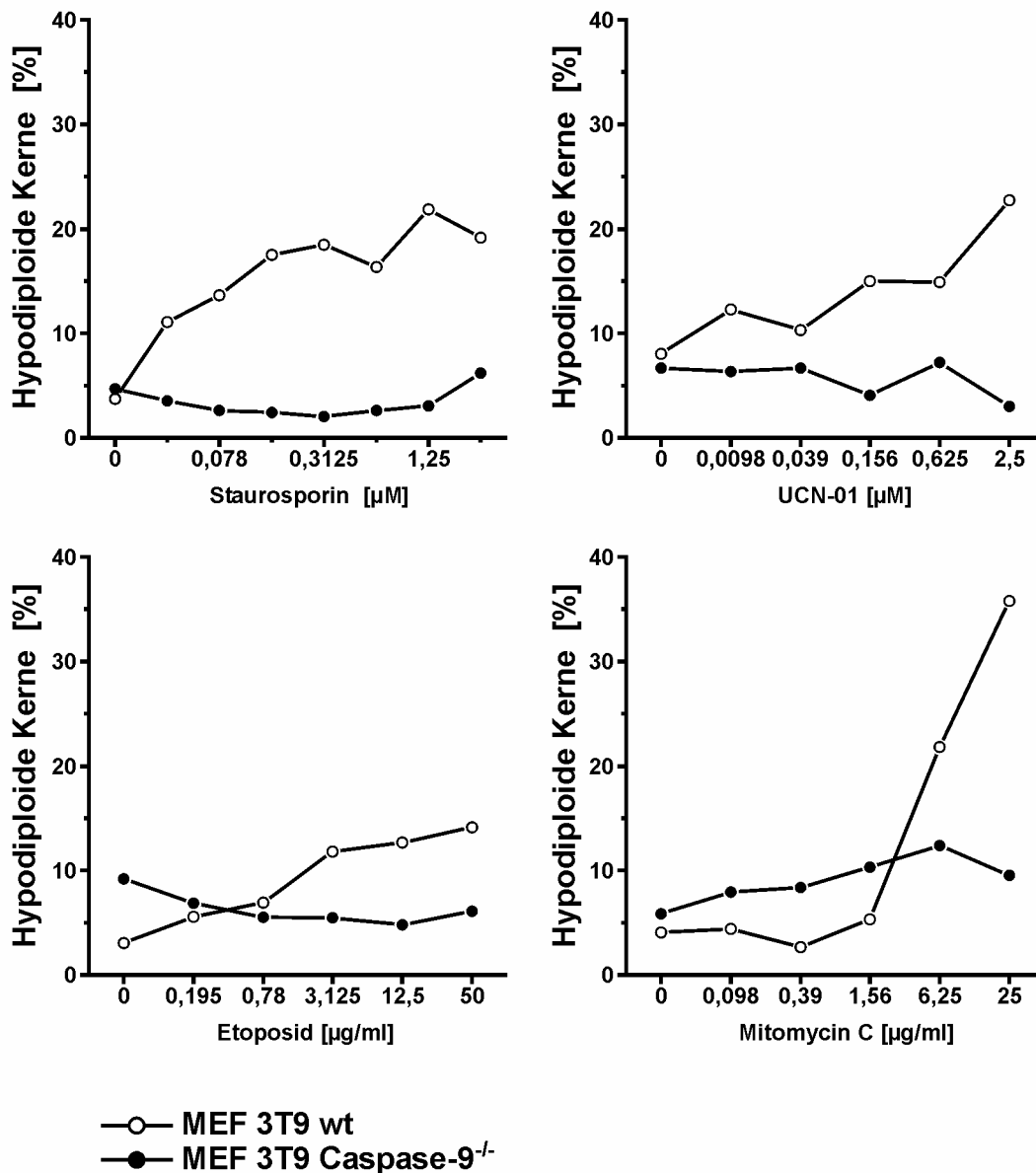


Abbildung 48: Staurosporin löst in Caspase-9-defizienten MEF-Zellen keine Apoptose aus

2×10^4 MEF-3T9-Caspase-9^{-/-}-Zellen (●), bzw. MEF-3T9-Wildtyp-Zellen (○) wurden mit den angegebenen Konzentrationen Staurosporin, UCN-01, Mitomycin C oder Etoposid in der angegebenen Konzentrationsreihe stimuliert. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden in einer 96-well-Gewebekulturplatte. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung der subdiploiden Zellkernfraktion als apoptotische Kerne (%).

In MEF 3T9-Zellen zeigte die Messung der Caspaseaktivität in Abwesenheit von Caspase-9 für keinen der verwendeten Stimuli eine Aktivierung (Abbildung 49). Im Wildtyp fand eine geringe Caspasenaktivierung durch mitochondriale Stimuli statt, was an einer allgemeinen Resistenz dieses Zelltyps liegt. In Staurosporin-behandelten Wildtyp-Zellen war die Aktivier-

ung deutlich erkennbar. Staurosporin konnte die Resistenz der Wildtypzellen gegenüber mitochondrialen Stimuli durchbrechen.

Bei Verwendung hoher Konzentrationen von Staurosporin setzte die Aktivität deutlich vor dem Messzeitpunkt ein und die aktiven Spaltprodukte waren zum Messzeitpunkt schon durch Proteasen weiter degradiert und nicht mehr aktiv. So entstand der falsche Eindruck einer geringen Aktivität bei höheren Staurosporin-Konzentrationen.

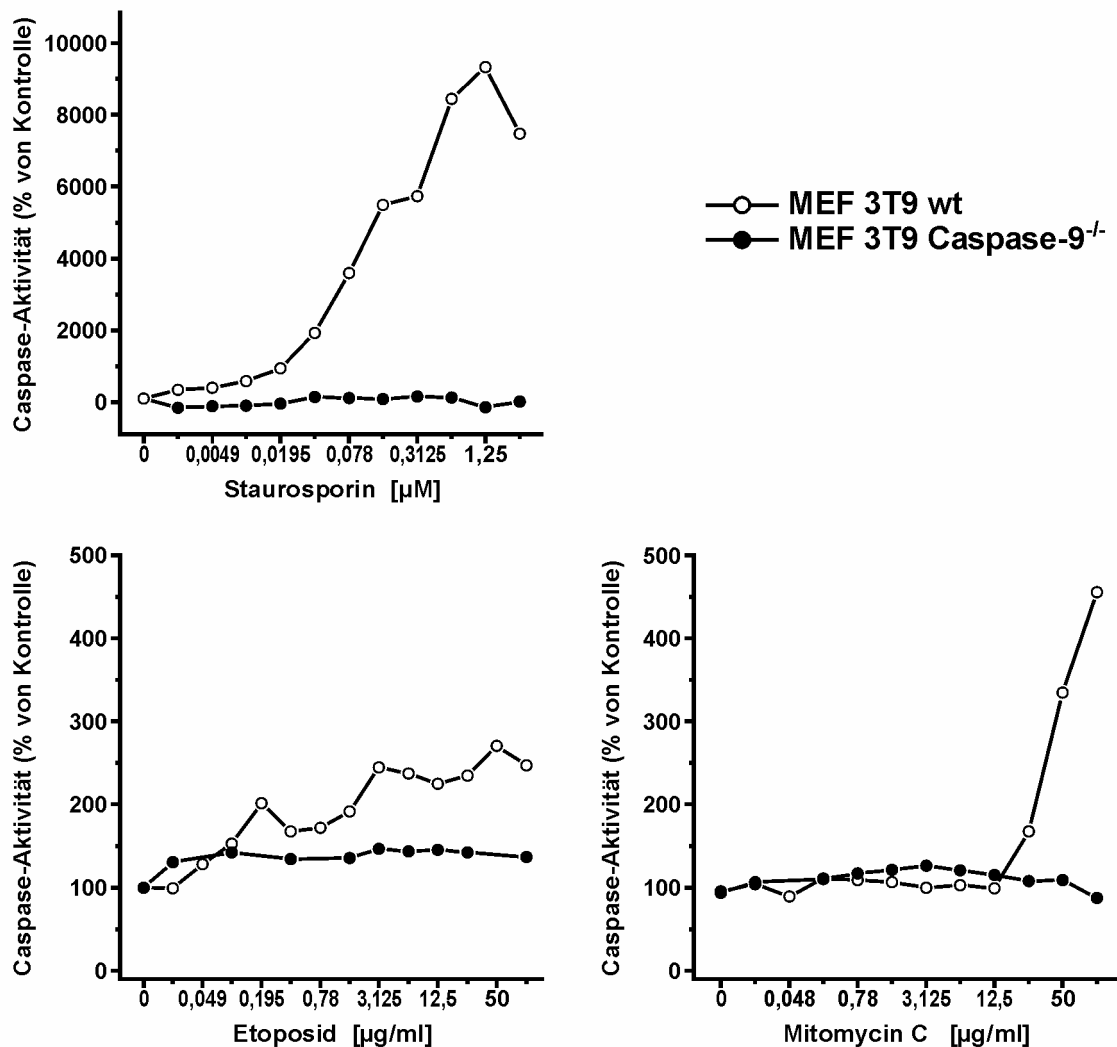


Abbildung 49: Staurosporin kann in Caspase-9-defizienten MEF-Zellen keine Caspasenaktivierung auslösen.

2×10^4 MEF-3T9-Caspase-9^{-/-}-Zellen (●), bzw. MEF-3T9-Wildtyp-Zellen (○) wurden mit aufsteigenden Konzentrationen an Staurosporin für 5 Stunden, bzw. Etoposid und Mitomycin C für 10 Stunden inkubiert (96-well-Gewebekulturplatte). Nach der Stimulation erfolgte die fluorimetrische Messung der DEVD-AMC-Spaltung durch aktive Caspasen (37°C) im ELISA-Reader. (Kontrolle = 100%)

Nach der Staurosporininkubation war die Vitalität in Caspase-9-defizienten MEF 3T9-Zellen gleich bleibend und bei Wildtypzellen verringert (Abbildung 50). Dies entsprach dem erwarteten Ergebnis.

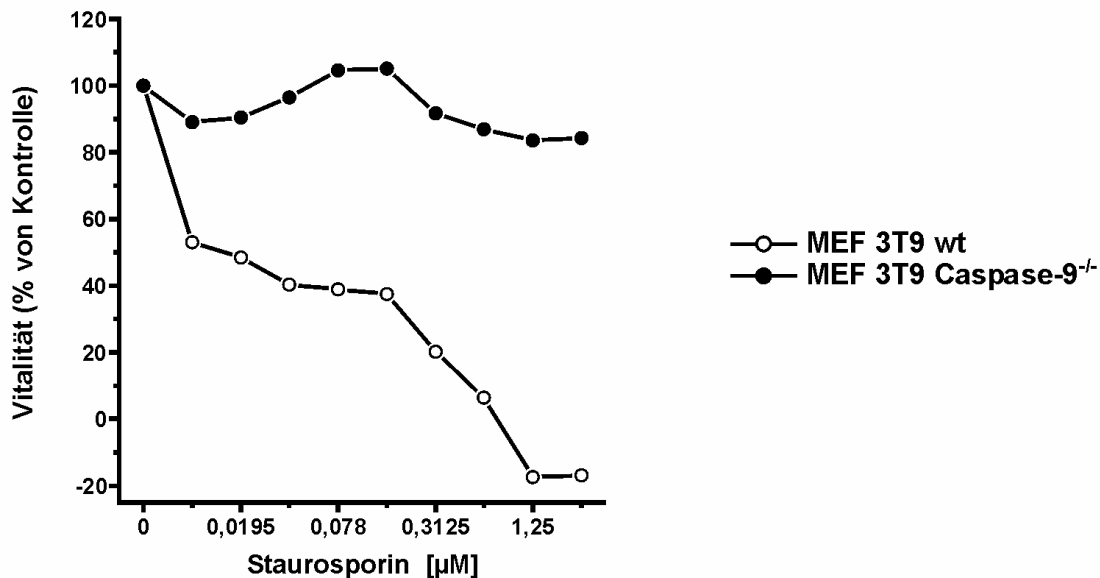


Abbildung 50: Durch Staurosporin ausgelöster Verlust der Vitalität ist in MEF-Zellen Caspase-9-abhängig

3×10^4 MEF-3T9-Caspase-9^{-/-}-Zellen (●), bzw. MEF-3T9-Wildtyp-Zellen (○) werden mit Staurosporin in der angegebenen Konzentrationsreihe in 150 µl Zellkulturmedium stimuliert. Die Inkubation mit den Apoptosestimuli erfolgt für 5 Stunden in einer 96-well-Gewebekulturplatte. Anschließend Zugabe von 10 µl MTT-Lösung (10 mg/ml) und weitere Inkubation für 4 Stunden. Danach Zugabe von 100 µl SDS-Lösung (10 %) zum Auflösen der Formazankristalle (8 h). Die photometrische Messung der Absorption diente als Maß der Zellvitalität. Gezeigt sind die Mittelwerte von Duplikaten. (Kontrolle = 100%)

4.5 Suche nach Apoptosom-ähnlichen hochmolekularen Komplexen in der Caspase-9-Aktivierung

Im nächsten Versuch sollte gezeigt werden, ob Phosphorylierungen bei der Staurosporin-induzierten Apoptose eine Rolle spielen. Da in der Caspase-9-Aktivierung über eine Beteiligung von Phosphorylierungen diskutiert wird, ist ein durch Dephosphorylierungen gesteuerter, hochmolekularer Proteinkomplex analog des Apoptosoms denkbar [225].

Die Proteine in Zelllysaten von unstimulierten oder Staurosporin-inkubierten Bcl-2-überexprimierenden Jurkatzellen wurden mittels einer Gelfiltration nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Um eine Ausbildung des klassischen Apoptosoms zu

verhindern, erfolgte die Staurosporininkubation der Zellen nur für 30 min. Dies und die Wahl der Bcl-2-überexprimierenden Zellen, in denen eine Apoptosombildung durch die Blockade der Cytochrom C-Freisetzung blockiert ist, schlossen falsch-positive Ergebnisse einer Apoptosombildung aus.

Die an die Gelfiltration anschließende Western Blot-Analyse der gewonnenen Fraktionen ergab eine identische Bandenverteilung in den Staurosporin-stimulierten und unstimulierten Proben (Abbildung 51). In den Fraktionen 7 bis 11 beider Proben war eine Pro-Caspase-9-Bande (46 kDa) detektierbar. Diese Bande wies auf einen hochmolekularen Komplex mit Caspase-9-Beteiligung hin. In diesem Komplex fand sich jedoch kein Apaf-1, so dass sich auch kein Apoptosom gebildet haben kann.

Die Positiv-Kontrolle zur Apoptosombildung erfolgte durch Induktion der Apoptosombildung mittels direkter Zugabe von dATP und Cytochrom c zum unstimulierten Zelllysate und nachfolgender Inkubation. Im hochmolekularen Bereich (Fraktionen 7–11) sind die apoptosombeteiligten Proteine Caspase-9 und Apaf-1 detektierbar. Das Apoptosom hat sich hier gebildet.

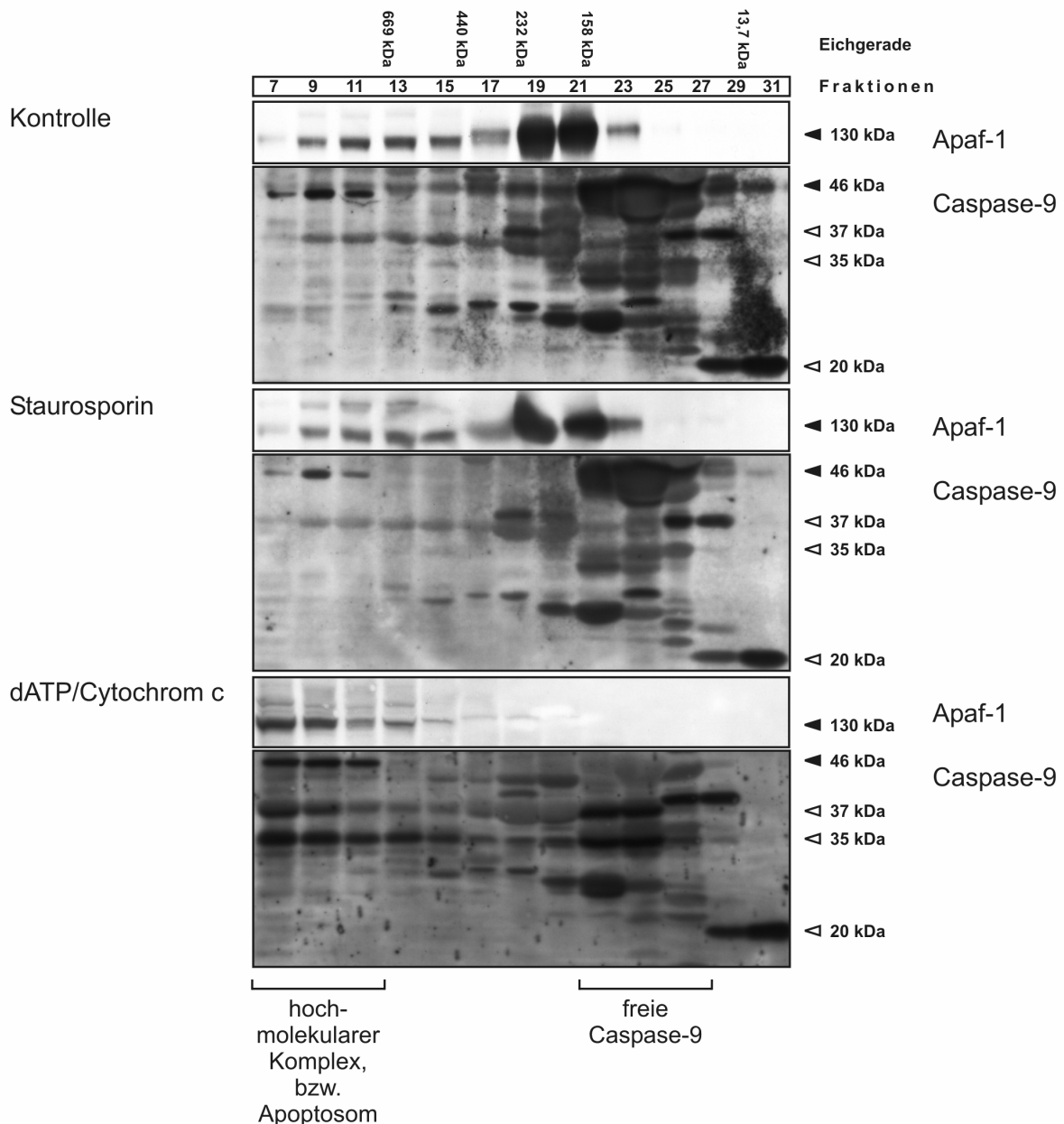


Abbildung 51: Gelfiltration von Bcl-2-überexprimierenden Jurkatzellen.

2×10^9 Bcl-2-überexprimierende Jurkatzellen wurden unstimuliert (Negativ-Kontrolle) gelassen oder 30 min mit Staurosporin ($2,5 \mu\text{M}$) stimuliert. Danach erfolgte die Herstellung der S100-Zelllysate und eine Messung des Proteingehaltes. Als Positiv-Kontrolle wurde S100-Zelllysate 30 min mit dATP (1 mM) und Cytochrom c ($10 \mu\text{M}$) inkubiert. $500 \mu\text{l}$ Zelllysate mit je $12,5 \text{ mg}$ Proteingehalt werden in einer Größenausschlusschromatographie über Sepharose 6HR (gepackt in 10/30-Säule) in Puffer A (Flussrate: $0,5 \text{ ml/min}$) aufgetrennt und in $500 \mu\text{l}$ -Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen werden zu je $100 \mu\text{l}$ aufgetragen und elektrophoretisch per SDS-PAGE (6–15 %) getrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Western Blot. Schwarz gefüllte Dreiecke markieren die Vollformen, weiße Dreiecke zeigen die Spaltformen der jeweiligen Proteine. Eichgerade: HMW Amersham

Interessanterweise lag die Pro-Caspase-9 in unbehandelten und in Staurosporin-behandelten Zellen bereits in einem hochmolekularen Komplex vor. Daher kann nicht ausgeschlossen

werden, dass unter Staurosporininkubation Caspase-9 nach Dephosphorylierungsvorgängen in diesem Komplex aktiviert wird.

Die Detektion von Phosphorylierungen an Caspase-9 war mit Antikörpern gegen Standard-Phosphorylierungsepitope geplant. Es konnte aber keiner der verwendeten Antikörper eine phosphorylierte Caspase-9 zeigen. Eine Entwicklung eines spezifischen Antikörpers gegen Caspase-9-Phosphorylierungsstellen steht deswegen im Arbeitsprogramm nachfolgender Forschungsprojekte und ermöglicht dann den Nachweis des Phosphorylierungsgeschehens in der Aktivierung von Caspase-9.

4.6 Caspase-9— Identifizierung der Interaktionspartner

Um Interaktionspartner von Caspase-9 zu finden, die in der Aktivierung von Caspase-9 eine Rolle spielen, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Die Immunpräzipitation erfolgte aus Zelllysaten der Zelllinie Jurkat Caspase-9-positiv über eine N-terminal gelegene FLAG-Signalsequenz der Caspase-9. Eine Probe blieb unbehandelt und die andere wurde 30 min mit Staurosporin (2,5 μM) inkubiert. Die kurze Inkubationszeit sollte zum einen eine Spaltung der Pro-Caspase-9 verhindern, damit nur an die Vollformen bindende Proteine kopräzipitiert werden; zum anderen war ja bekannt, dass Caspase-9 in einem Komplex vorliegt (Abbildung 51), der nicht zerstört werden sollte. Die erhaltenen Caspase-9-Koprazipitate wurden einer massenspektroskopischen Analyse unterzogen. Die Rolle der dabei gefundenen und in Tabelle 8 zusammengefassten Interaktionspartner in der Caspase-9-Aktivierung ist bislang unbekannt.

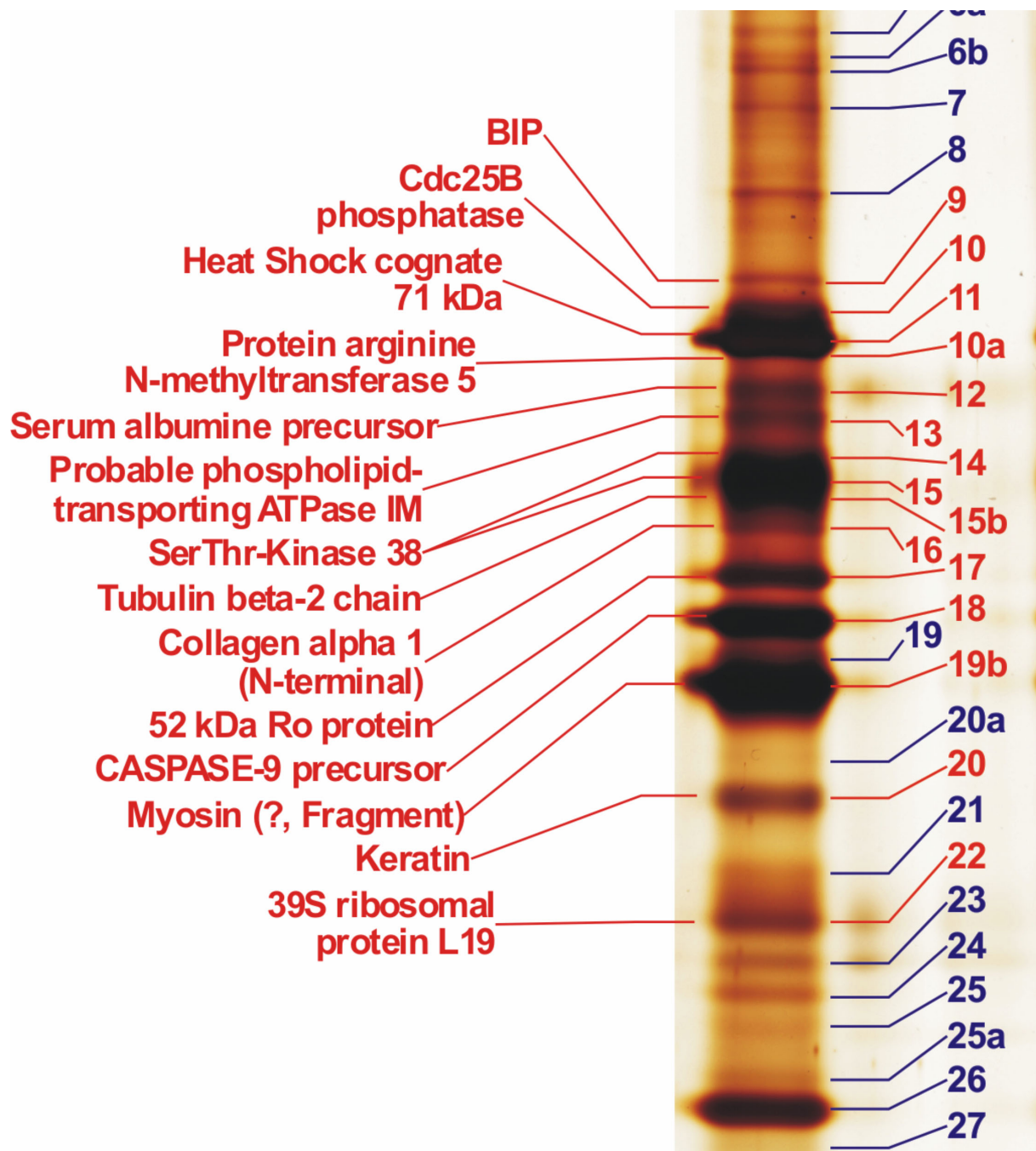


Abbildung 52: Immunpräzipitation von Caspase-9

2×10^9 Caspase-9-positive Jurkatzellen werden mit $2,5 \mu\text{M}$ Staurosporin für 30 min in 200 ml Zellkulturmedium inkubiert. Herstellung des Zelllysats und Immunpräzipitation mit anti-FLAG-M2-Agarose (Sigma). Saure Elution und elektrophoretische Auftrennung über SDS-PAGE (8–15 %). Silberfärbung der Proteinbanden und Ausschneiden der Banden. MALDI-Auswertung der darin enthaltenen Banden.

Tabelle 8: Per Immunpräzipitation gefundene mögliche Interaktionspartner der Caspase-9.

Bande	identifiziertes Protein
9 -	BIP (=Gpr78/BiP)
10 -	Cdc25B (cell division cycle 25)
11 -	Heat Shock Cognate 71kDa (= HSP7C, HSPA8)
10a -	Protein arginine N-methyltransferase 5
12 -	Serumalbumin Vorläuferprotein
13 -	Probable phospholipid-transporting ATPase IM (= ATP8B4)
14 -	Ser/Thr-Kinase 38
15b -	Tubulin β -Kette
16 -	Collagen α 1
17 -	52 kDa Ro Protein
18 -	Caspase-9 (Proform)
19b -	Myosin (?)
20 -	Keratin
22 -	39S ribosomales Protein L19, mitochondrial (Präcursor)

4.7 Untersuchungen zur Identifizierung von durch Staurosporin inhibierten Kinasen in der Apoptose

4.7.1 Literaturbekannte Kinaseinhibitoren

In den vorhergegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass in den beiden von Staurosporin aktivierten Apoptosesignalwegen Caspase-9 der gemeinsame Nenner ist. Da Staurosporin eine Vielzahl von Ser/Thr- und Tyr-Kinasen hemmt, lag der Schluss nahe, dass Caspase-9 durch eine Dephosphorylierung nach einer Staurosporininkubation aktiviert werden könnte. Dabei ist eine direkte Inhibition von Caspase-9-Kinasen durch Staurosporin denkbar, die zu einer Caspase-9-Dephosphorylierung führt und diese somit aktiviert. Weiterhin ist ein Mechanismus mit einer indirekten Caspase-9-Aktivierung möglich. Eine

Dephosphorylierung und Inaktivierung eines bislang unbekanntem Caspase-9-Interaktionspartners, welcher im Normalzustand die Aktivierung von Caspase-9 verhindert, findet statt. Interessanterweise sind in der letzten Zeit einige Kinasen beschrieben worden, die Caspase-9 phosphorylieren können. Die einzelnen Phosphorylierungsstellen mit den dazugehörigen Kinasen sind in der nachfolgenden Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Kinasen und deren Phosphorylierungsstellen in Caspase-9.

Phosphorylierungsstelle	Kinase	Literatur
Ser ¹⁹⁶ , (Ser ¹⁸³)	Protein Kinase B/Akt	[48]
Ser ⁹⁹ , Ser ¹⁸³ , Ser ¹⁹⁵	Protein Kinase A	[52]
Thr ¹⁰⁷ , (Thr ¹²⁵)	ERK2 (MEK1/2)	[49]
Tyr ¹⁵³	c-Abl	[47]
Ser ¹⁴⁴	Protein Kinase C ζ	[53]

Da Staurosporin ein breitbandig wirkender Kinaseinhibitor ist, lag die Vermutung nahe, dass durch die Inhibition einer an der Caspase-9-Phosphorylierung beteiligten Kinase Apoptose auslöst wird. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden im Weiteren Jurkatzellen verwendet, die Caspase-9-defizient und –positiv sind oder aber Bcl-2-überexprimierend und Leervektor-Kontrollzellen sind. Diese Zellen wurden mit verschiedenen Inhibitoren (Tabelle 10) der Signalwege von Protein Kinase A (PKA), Protein Kinase C (PKC), Protein Kinase B/Akt (PKB/Akt) und extrazellulär-regulierten Kinase (ERK) inkubiert und mit der Staurosporin-, bzw. UCN-01-induzierten Apoptose verglichen.

Tabelle 10: Verwendete Kinaseinhibitoren

Inhibitor	inhibierte Kinase	IC ₅₀ -Werte
Ro 31-8220	PKC	10 nM
	PKA	17 μ M
Bis-I (= GF 109230 X)	PKC, GSK-3	360 nM
PD 98059	MEK	5–10 μ M
SB 203 580	p38 MAPK	21–1 μ M

UO126	MEK 1	72 nM
	MEK 2	58 nM
Calphostin C	PKC	10 nM
PKC ζ -Pseudosubstrat	PKC ζ	EC ₅₀ -Wert: 10-20 μ M

So sollten an der Staurosporin-induzierten Apoptose beteiligte Kinasen gefunden werden. In den Versuchen die mit den Jurkatzelllinien Caspase-9-negativ vs. –positiv und Bcl-2-überexprimierend vs. Leervektor unternommen wurden, traten aber keine mit Staurosporin vergleichbaren Effekte auf. Unter den untersuchten Substanzen zeigen allein Bis-I und Ro 31-8220 eine Caspase-9-abhängige Apoptose. Der Zelltod war bei beiden Substanzen aber vollständig Bcl-2-hemmbar, was sie von der Staurosporin- oder UCN-01-induzierten Apoptose unterscheidet. Die eingesetzten Konzentrationen der Kinaseinhibitoren [53] sind hoch und jenseits der in der Literatur angegebenen IC₅₀-Werte für die jeweils inhibierten Kinasen. Der beobachtete Zelltod ist daher eher als Folge von Effekten unspezifischer Art denn einer spezifischen Inhibition der jeweiligen Kinase anzusehen. Zusätzlich wurde auch Wirkung des PI3K-Inhibitors LY-294002 und der PKB/Akt-Inhibitors SH-5 untersucht. Dabei wurde keine Apoptoseauslösung in der Western Blot-Analyse gefunden, was aber an einer zu kurzen Inkubationszeit von 8 Stunden gelegen haben mag (Daten nicht gezeigt). Eine verlängerte Inkubationszeit von 1–3 Tagen zeigte Apoptose (unveröffentlichte Daten, S. Wesselborg und P. Brossart).

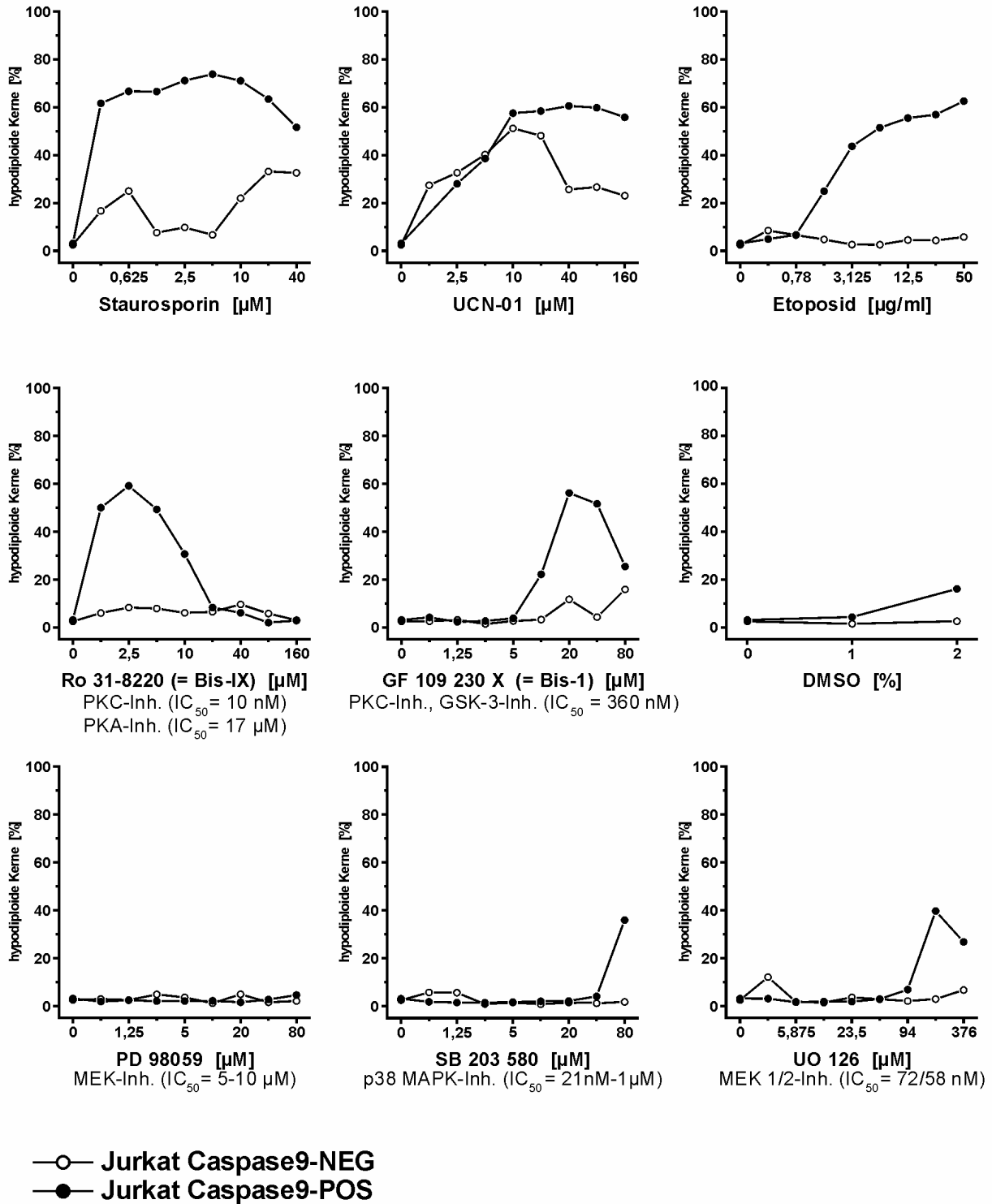


Abbildung 53: Screening von verschiedenen in der Literatur beschriebenen Kinaseinhibitoren auf ihre Fähigkeit Apoptose in Caspase-9-negativen und –positiven Jurkatzellen auszulösen.

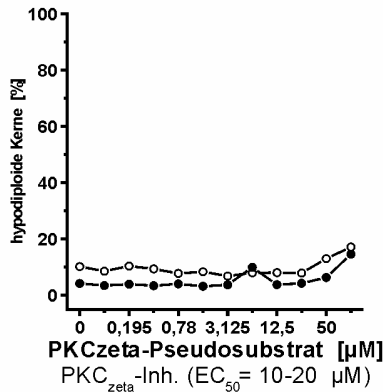
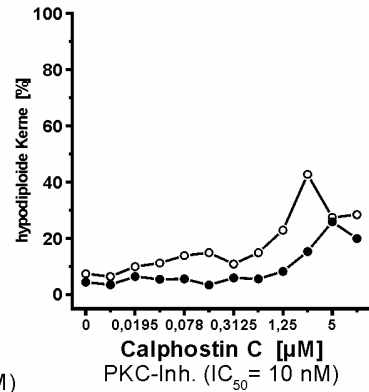
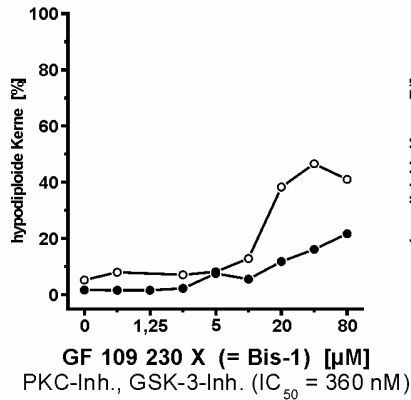
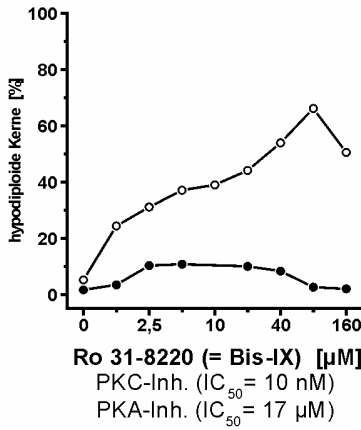
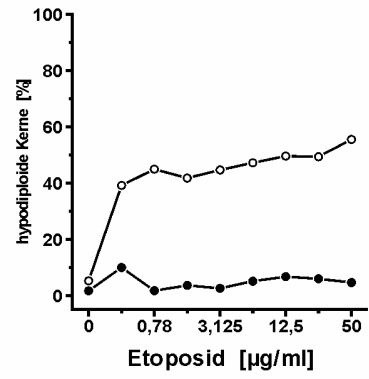
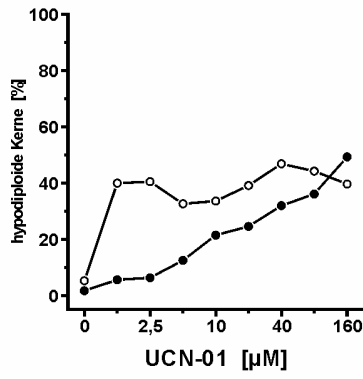
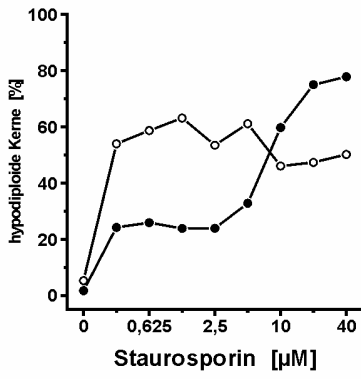
3×10^4 Caspase-9-negative Jurkatzellen (\circ), bzw. Caspase-9-positive-Jurkatzellen (\bullet) wurden mit den Stimuli Staurosporin, UCN-01, Etoposid oder den Kinaseinhibitoren in der jeweils angegebenen Konzentrationsreihe stimuliert. Die verwendeten Kinaseinhibitoren besitzen die angegebenen IC_{50} -Werte für die jeweiligen Kinasen. DMSO war das Lösemittel für die Inhibitoren. Die Inhibitoren wurden mit einer maximalen Konzentration eingesetzt, dass ein 1 %-iger DMSO-Anteil im Kulturmedium nicht erreicht wird. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden in einer 96-well-Gewebekulturplatte. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung der subdiploiden Zellkernfraktion als apoptotische Kerne (%).

Eine Stimulation mit dem selektiven inhibitorischen PKC_{ζ} -Pseudosubstrat zeigt weder in Jurkat-Vektor-Kontrollzellen, noch in Bcl-2-überexprimierenden Jurkatzellen Apoptose. Demnach ist die von Brady et al. gezeigte Phosphorylierung von Caspase-9 an Ser¹⁴⁴ durch PKC_{ζ} [53] für eine Apoptoseauslösung nicht relevant.

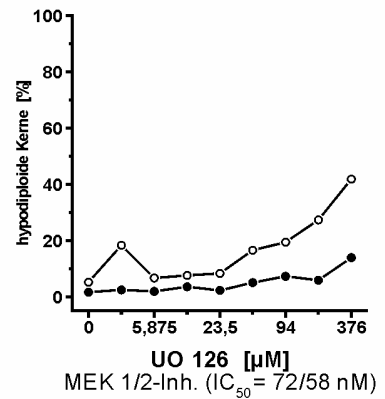
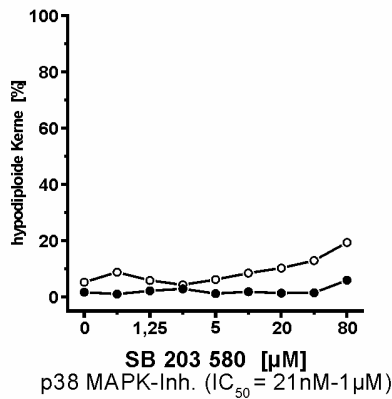
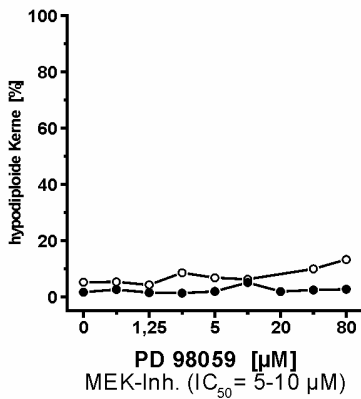
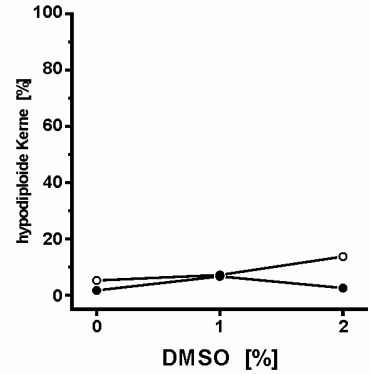
Abbildung nächste Seite:

Abbildung 54: Screening von verschiedenen in der Literatur beschriebenen Kinaseinhibitoren auf ihre Fähigkeit Apoptose in Leervektor und Bcl-2-überexprimierenden Jurkatzellen auszulösen.

3×10^4 Jurkat-Vektor-Kontrollzellen (\circ), bzw. Bcl-2-überexprimierende-Jurkatzellen (\bullet) werden analog Abbildung 53 behandelt und ausgewertet.



○ Jurkat Vector
 ● Jurkat Bcl-2



Um die Rolle von Protein Kinase C-Isotypen in der Auslösung von Apoptose zu bestimmen, wurden verschiedene PKC-Inhibitoren in Bcl-2-überexprimierenden und Leervektor-tragenden Jurkatzellen getestet. In den jeweiligen spezifischen Inhibitionsbereichen wurde keine Apoptose detektiert. Die zur Caspaseaktivitätsauslösung notwendigen Konzentrationen liegen in sehr hohen, unspezifischen Konzentrationsbereichen. Damit war über den gewählten Ansatz keine Differenzierung einer Beteiligung von Kinasen in der Apoptoseauslösung möglich.

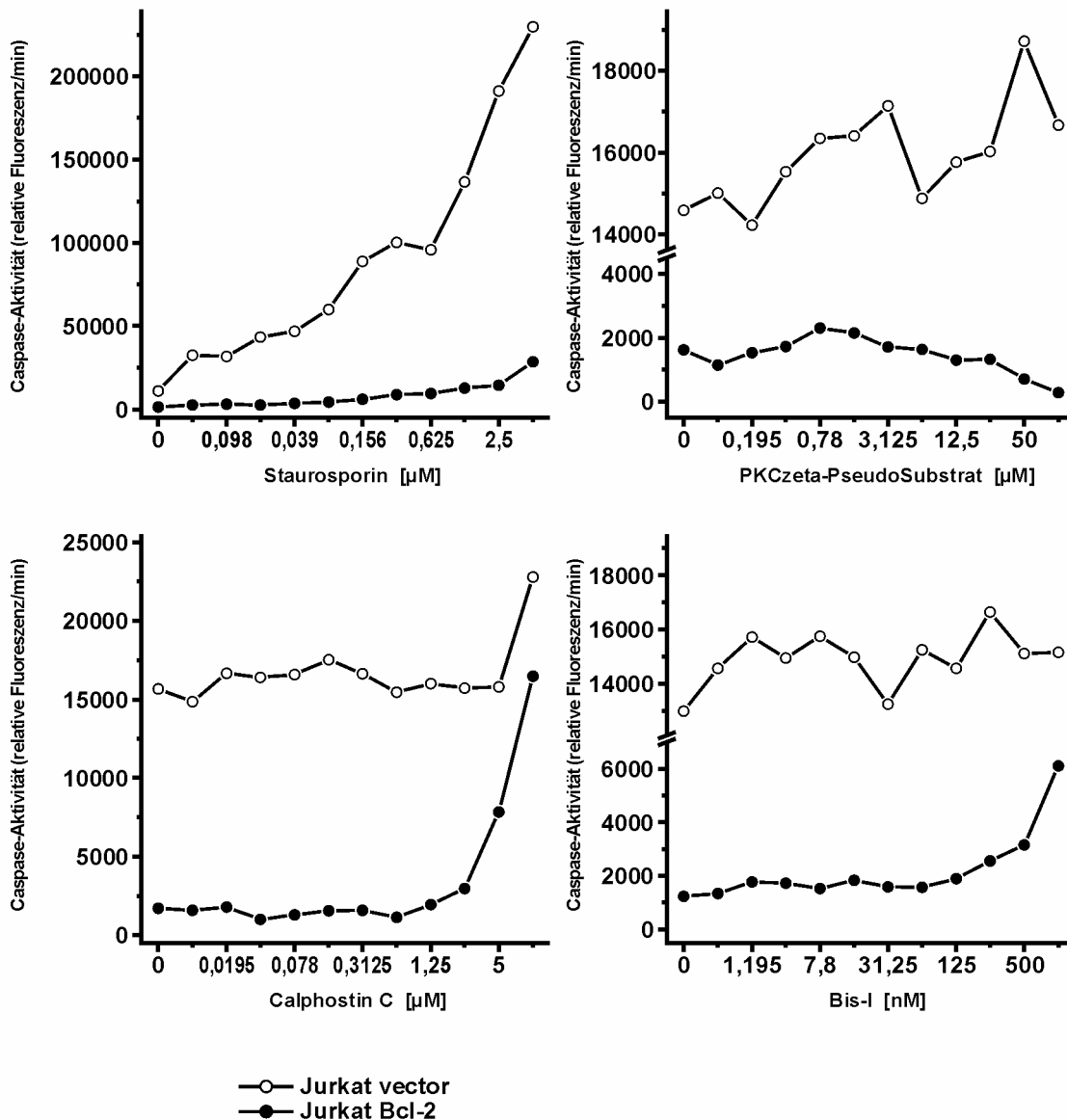


Abbildung 55: Messung von Caspaseaktivität nach Inkubation mit PKC-Inhibitoren.

3×10^4 Jurkat-Vektor-Kontrollzellen (\circ), bzw. Bcl-2-überexprimierende-Jurkatzellen (\bullet) werden mit aufsteigenden Konzentrationen an Staurosporin, Calphostin C, Bis-1 oder PKC ζ -Pseudosubstrat für 5 Stunden inkubiert (96-well-Gewebekulturplatte, $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$). Nach der Stimulation erfolgt die fluorimetrische Messung der DEVD-AMC-Spaltung durch aktive Caspasen (37°C) im ELISA-Reader.

4.7.2 Staurosporinanaloga mit Pyrrolidingerüst

In parallelen Experimenten zur Aufklärung der Staurosporin-induzierten Apoptose wurde eine Reihe von Staurosporin abgeleiteten Verbindungen eingesetzt. Verschiedene Staurosporinanaloga (CPD-Nummerierung) von Dr. Christian Peifer (Labor Prof. Dr. Stefan Laufer, Universität Tübingen) wurden daraufhin untersucht, ob sie Apoptose auslösen. Dabei konnten keine dem Staurosporin entsprechenden starken Auslöser von Apoptose darunter gefunden werden. Es ist aber nicht auszuschließen, dass es mit diesen Substanzen möglich sein wird, eine differentielle Bewertung der Beteiligung von Kinasen am Zelltod durchzuführen. Dafür muss ein Screening-Verfahren entwickelt werden, in dem nicht-apoptotisch wirkende Verbindungen auf ein Trägermaterial aufgebracht werden, dem ein Zelllysat zugesetzt wird. Das danach erhaltene Lysat soll zu einem mit Staurosporin gekoppelten Trägermaterial hinzugefügt werden. Damit kann die Spezifität der Bindung von Proteinen (vorzugsweise Kinasen) an Staurosporin erhöht werden und eine Detektion der Interaktionspartner von Staurosporin wird fokussierter sein. Die Voraussetzung dafür ist jedoch ein möglichst umfassendes Screening der Staurosporinanaloga auf Inhibitoreffekte an Kinasen in speziellen Kinase-Aktivitäts-Assays. Dieses Screening ist sehr zeit- und kostenintensiv. Zurzeit sind rund 2500 Kinasen bekannt und die verfügbaren Kinasetests bieten nur einen geringen Ausschnitt davon an (je nach Anbieter zwischen 100 und 250 verschiedene Kinasen).

Die CPD-Derivate zeigten sich insgesamt nur schwach apoptoseauslösend. Diejenigen, die Apoptose auslösen, tun dies nicht in einer dem Staurosporin vergleichbaren Weise und fallen deswegen zur weiteren Untersuchung der Staurosporin-induzierten Apoptose aus. Davon unberührt besteht die Möglichkeit, diese Substanzen gerade wegen ihrer nicht-apoptotischen Effekte zur Entwicklung von Arzneistoffen gegen kinasebedingte Krankheiten zu nutzen.

5 Diskussion

Die starke apoptotische Wirkung von Staurosporin ist in sehr vielen Zelllinien belegt, hingegen ist der Wirkmechanismus von Staurosporin in weiten Teilen unbekannt. Staurosporin wird den mitochondrial wirksamen Apoptosestimuli zugeordnet [226], die ihre Wirkung über den mitochondrialen Signalweg entfalten. Für Staurosporin werden darüber hinaus weitere Signalwege diskutiert. Zhang et al. [181] konnten einen schnellen Caspase-abhängigen und einen verzögerten Caspase-unabhängigen Signalweg der Staurosporin-induzierten Apoptose differenzieren. Eine Bcl-2-Überexpression verhinderte in Melanomzelllinien den frühen Signalweg, nicht jedoch den, durch Apoptose induzierenden Faktor (AIF) ausgelösten, verzögerten Teil. In gleicher Weise unterteilte Belmokhtar et al. [227] die Apoptosereaktion nach Staurosporininkubation in einen frühen, Caspase-abhängigen und einen späten, Caspase-unabhängigen Teil, ohne jedoch die verantwortlichen Signalwege benennen zu können.

Stepczynska et al. [184] zeigten Unterschiede in der Apoptoseauslösung durch Staurosporin und mitochondrial agierenden Zytostatika. Staurosporin kann in der zytostatikaresistenten Jurkatzelllinie JM319 den programmierten Zelltod auslösen. Jurkatzellen mit überexprimierter, dominant-negativer Caspase-9 zeigten im Gegensatz zu Staurosporin keine Prozessierung der Wildtyp-Caspase-9. Der Mechanismus der Apoptoseauslösung nach Staurosporininkubation unterscheidet sich von dem der meisten Krebstherapeutika (siehe Abbildung 14). Neben dem mitochondrialen Teil scheint ein weiterer Signalweg in der Staurosporin-induzierten schnell ablaufenden Apoptose aktiviert zu werden.

Die Behandlung von resistenten Krebszelllinien wäre mit Staurosporin bzw. dessen Derivaten aussichtsreich, da zwei Signalwege zur Abtötung kombiniert sind. Das 7-Hydroxy-Staurosporin (UCN-01) und andere Staurosporin-Derivate befinden sich bereits in der klinischen Prüfung für die Zulassung als Krebstherapeutika (siehe: 1.6.3). Die beteiligten Signalwege zu finden ist – sowohl wissenschaftlich als auch therapeutisch – von hohem Interesse.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, die in der Staurosporin-induzierten Apoptose aktivierten Signalwege und deren Proteine zu benennen. Zunächst wurden die schon bekannten Apoptosesignalwege bezüglich einer Beteiligung an der Staurosporin-induzierten Apoptose untersucht.

5.1 Bekannte Signalwege der Apoptose

Neben dem extrinsischen Todesrezeptorsignalweg sind die intrinsischen Signalwege bekannt. Intrinsische Signalwege agieren z.B. unter Beteiligung des Endoplasmatischen Retikulums (ER), des PIDDosoms oder des Mitochondriums.

5.1.1 Todesrezeptorsignalweg

TRAIL, anti-CD 95 oder andere extrinsische Stimuli verursachen über den Todesrezeptorsignalweg Apoptose. In Caspase-8-negativen, bzw. FADD-negativen Jurkatzellen ist dieser Signalweg unterbrochen und Apoptose kann nicht ausgelöst werden; Staurosporin und die mitochondrialen Stimuli lösen dagegen Apoptose aus (Abbildung 18) [59]. Daraus lässt sich ableiten, dass der extrinsische Signalweg weder an der mitochondrialen, noch an der Staurosporin-induzierten Apoptose beteiligt ist.

5.1.2 PIDDosom

Die Zelle reagiert auf DNA-schädigende Agenzien unter anderem durch die Bildung des PIDDosoms im Zellkern (vgl. 1.4.3). Das PIDDosom besteht aus den Bestandteilen PIDD, RAIDD und Caspase-2 [117]. Ist es gebildet, so wird Caspase-2 aktiviert und diese aktiviert ihrerseits den mitochondrialen Signalweg. Das Apoptosom wird gebildet und Apoptose findet statt. DNA-schädigenden Substanzen lösen in Caspase-2-negativen Zellen keine Apoptose aus, Staurosporin ist dazu jedoch in der Lage (Abbildung 21). Dies bedeutet, dass die Staurosporin-induzierte Apoptose offensichtlich nicht über das PIDDosom vermittelt wird.

5.1.3 ER-Signalweg

Das antiapoptotische Protein Bcl-2 schützt am Mitochondrium vor Apoptose. Die Schutzfunktion ist dabei nicht nur auf das Mitochondrium alleine beschränkt; ein Teil der Protektion ist durch einen Schutz am Endoplasmatischen Retikulum (ER) bestimmt. Bestimmte, in Jurkatzellen überexprimierte, Bcl-2-Konstrukte besitzen je eine Lokalisierungssequenz für entweder die ER-Membran oder die Mitochondrienmembran [203]. Damit wird in der Zelle die Schutzwirkung von Bcl-2 lokal begrenzt. (Abbildung 19 & Abbildung 20).

Die Unterschiede in der Wirksamkeit der Bcl-2-Lokalisierungen zeigen sich unter der Inkubation mit Etoposid. Überexprimiertes mitochondriales Bcl-2 und Wildtyp-Bcl-2 schützen vollständig gegen den mitochondrialen Stimulus Etoposid, während am ER lokalisiertes Bcl-2 diesen Schutz nicht gewährt. Unter Staurosporinstimulation ist eine Auslösung von Apoptose in allen Zelllinien zu beobachten (Abbildung 19). Der ER-Schutz erweist sich als kaum

wirksam; die Schutzwirkung durch mitochondrial lokalisiertes Bcl-2 ist höher. Der Schutz vor Apoptose bei Überexpression des Bcl-2-Wildtyps ohne Lokalisierungssequenzen liegt dazwischen.

Ein Teil der Staurosporin-induzierten Apoptose wird demzufolge durch Bcl-2 nicht gehemmt. Die Apoptose nach Staurosporininkubation teilt sich offensichtlich in zwei Signalwege: in einen durch Bcl-2 hemmbaren und einen durch Bcl-2 unbeeinflussten Teil.

In den weiteren Experimenten wurde zunächst der Einfluss von Staurosporin auf den mitochondrialen Apoptosesignalweg untersucht.

5.1.4 Bcl-2-Familienmitglieder und ihr Einfluss auf die Staurosporin-induzierte Apoptose

Die Bcl-2-Proteinfamilie besitzt Mitglieder mit antiapoptotischen und mit proapoptotischen Eigenschaften (vgl. 1.5.1). Als antiapoptotische Familienmitglieder wurden Bcl-2 und Bcl-X_L untersucht. Bax wurde als proapoptotischer Vertreter überprüft.

5.1.4.1 Bcl-2 und Bcl-X_L

Bcl-2-Wildtyp-überexprimierende Jurkatzellen sind teilweise, aber nicht vollständig vor Staurosporin-induzierter Apoptose geschützt (Abbildung 22 – Abbildung 26) an Staurosporin wurde die Bcl-2-bedingte Resistenz durchbrochen. Bei Stimulation einer Bcl-2-überexprimierenden MCF-7-Zelllinie mit Staurosporin wurde der gleiche Effekt beobachtet (Abbildung 27 & Abbildung 28). Die Bcl-2-bedingte Verzögerung der Apoptoseauslösung nach Staurosporininkubation zeigt die Beteiligung zweier Signalwege: Einen durch Bcl-2 geschützten Teil und einen nicht Bcl-2-schützbaren Teil.

Die Schutzwirkung von Bcl-2 im mitochondrialen Signalweg ist letztlich durch eine Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung charakterisiert. In Bcl-2-überexprimierenden Zellen kommt es nach Stimulation mit Etoposid zu keiner Cytochrom c-Freisetzung (Abbildung 26) und Apoptose bleibt aus. Cytochrom c wurde auch während der Staurosporin-induzierten Apoptose ins Zytosol freigesetzt. Dieser Vorgang ist durch die Schutzwirkung von Bcl-2 weitestgehend blockiert (Abbildung 26). Da Staurosporin jedoch in Bcl-2-überexprimierenden Zellen Apoptose auslösen kann, ist die Bildung eines Apoptosoms für diesen Anteil der Staurosporin-induzierten Apoptose offenbar entbehrlich.

Ein von Marsden et al. [124] vorgeschlagene Apoptosesignalweg wird über Caspase-7 vermittelt und ist Bcl-2-abhängig/Apaf-1-unabhängig. Dieser Signalweg spielt im

Staurosporin-induzierten Zelltod keine Rolle, da sich die Staurosporin-induzierte Apoptose als Bcl-2-unabhängig erwiesen hat (Abbildung 22 – Abbildung 28).

Als Ergebnis bleibt festzuhalten, dass in Bcl-2-geschützten Zellen eine Staurosporin-induzierte Apoptose auftritt, wenn die Staurosporinkonzentration nur hoch genug gewählt ist. Im Weiteren wurden Bcl-X_L-überexprimierende Zellen untersucht. Bcl-X_L ist wie Bcl-2 ein antiapoptotisches Protein aus der Gruppe der Bcl-2-Proteinfamilie. Bei Staurosporin-induzierter Apoptose ist die Schutzwirkung von Bcl-X_L der von Bcl-2 ähnlich. Eine Staurosporinstimulation in hoher Konzentration konnte in Bcl-X_L-überexprimierenden Jurkatzellen Apoptose auslösen. Etoposid war als mitochondrialer Stimuli nicht dazu in der Lage (Abbildung 29 – Abbildung 31). Die Staurosporin-induzierte Apoptose ist auch unter Bcl-X_L-Schutz zweigeteilt: Es finden sich ein durch Bcl-X_L inhibierbarer Teil und ein durch Bcl-X_L unbeeinflusster Teil des programmierten endogenen Zelltodes.

5.1.4.2 Bax

Bax ist ein proapoptotisches Protein der Bcl-2-Proteinfamilie. In den Bax-defizienten DU145-Prostata-Tumorzellen löst Staurosporin in höheren Konzentrationen eine verzögerte Apoptose aus. In den Bax-retransfizierten Zellen ist die Apoptoseauslösung schon bei deutlich geringeren Konzentrationen beobachtbar (Abbildung 32). Der Dualismus in der Staurosporin-induzierten Apoptose findet sich demnach auch in Bax-defizienten Zellen.

5.1.5 Apoptosom

Der Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs folgt die Bildung des Apoptosoms (vgl. 1.4.1). Nach Hydrolyse von dATP entsteht ein aus Cytochrom c, Apaf-1 und Caspase-9 bestehender Komplex, welcher Caspase-3 aktiviert und die Caspasekaskade ablaufen lässt. In vielen Tumorzellen ist die Komplexbildung des Apoptosoms gestört und führt zu einer Resistenz gegenüber von Chemotherapeutika. Zum Beispiel kann in Zellen ohne Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) oder Caspase-9 das Apoptosom nicht mehr entstehen und die Signalweiterleitung des mitochondrialen Apoptosesignalwegs ist unterbrochen (siehe: Abbildung 7) [97].

Auch sind posttranslationale Veränderungen von Apaf-1 und Caspase-9 (z.B. Methylierungen [223]) beschrieben worden, die das Zustandekommen des Apoptosoms beeinflussen.

Um eine Aussage zur Apoptosombeteiligung an der Staurosporin-induzierten Apoptose machen zu können, wurden Untersuchungen in Apaf-1-, bzw. Caspase-9-defizienten Zellen

durchgeführt. In diesen Zellen stellen z.B. Regulationsmechanismen auf Transkriptionsebene keine Rolle.

5.1.5.1 Apaf-1 ist für die Apoptosombildung essentiell – aber für die Staurosporin-induzierte Apoptose entbehrlich

Apaf-1-negative murine Fibroblasten können im Gegensatz zu den Apaf-1-normalexprimierenden Parentalzellen das Apoptosom nicht bilden. Werden Apaf-1-negative Zellen mit mitochondrialen Stimuli inkubiert, so wurde keine Apoptose registriert (Abbildung 35 & Abbildung 36). Dieser Signalweg benötigt folglich Apaf-1 zur Signalweiterleitung. Wurde mit Staurosporin inkubiert, ist in diesen Zellen Apoptose messbar. In den Kontroll-Parentalzellen findet sich schon bei weit geringeren Staurosporinkonzentrationen Apoptose. Offensichtlich ist die Staurosporin-induzierte Apoptose in höherer Staurosporinkonzentration von Apaf-1 unabhängig und Staurosporin besitzt zwei Wege der Apoptoseauslösung: einen vom Apoptosom und Apaf-1 abhängigen und einen davon unabhängigen Teil.

In den SK-mel-94-Melanomzellen mit sehr geringer Expression an Apaf-1 (Abbildung 34) konnten die vorrangegangenen Beobachtungen bestätigt werden. Um Apoptose auszulösen, sind die mitochondrialen Stimuli auf die Bildung eines Apoptosoms angewiesen und können in diesen Zellen keine Apoptose auslösen. Staurosporin löst folglich Apoptosom-unabhängig Apoptose aus (Abbildung 37 – Abbildung 41).

Yin et al. [228] konnten jüngst nachweisen, dass Caspase-9 nur dann Caspase-3 effizient aktivieren kann, wenn Caspase-9 im Apoptosom aktiviert wird. Dies ist eine denkbare Erklärung der verzögerten Apoptose in Apaf-1-negativen Zellen nach Staurosporininkubation. Der zweite essentielle Bestandteil des Apoptosoms ist Caspase-9. Deren Rolle in der Staurosporin-induzierten Apoptose wird im nächsten Abschnitt dargestellt.

5.1.5.2 Caspase-9 ist zentral in der Staurosporin-induzierten Apoptose

Werden Caspase-9-defiziente und Caspase-9-retransfizierte Jurkatzellen mit mitochondrialen Stimuli inkubiert, so ist Apoptose nur in Caspase-9-retransfizierten Zellen detektierbar, weil nur diese zur Bildung des Apoptosoms befähigt sind. Die extrinsischen Stimuli können hingegen auch in Caspase-9-defizienten Zellen Apoptose auslösen. Der Zelltod ist Caspase-8-vermittelt und eine Beteiligung des Verstärkungssignalwegs über das Mitochondrium wird nicht benötigt (vgl. 1.3.1). Werden Caspase-9-positive Jurkatzellen mit Staurosporin

inkubiert, so ist Apoptose nachweisbar. Eine Stimulation mit Staurosporin in den Caspase-9-negativen Jurkatzellen führt dagegen zu keiner Apoptose (Abbildung 42 – Abbildung 50).

Demnach ist Caspase-9 essentiell für die Staurosporin-induzierte Apoptose, wo hingegen die Bildung eines Apoptosoms offensichtlich nicht für die Apoptoseauslösung notwendig ist (Abbildung 37 – Abbildung 41).

Auch in den zytostatikaresistenten JM319-Jurkatzellen wurde nach Staurosporininkubation eine Caspase-9-Spaltung detektiert (Abbildung 17) und Apoptose gemessen. Hingegen waren nach Inkubation mit mitochondrialen Stimuli in diesen Zellen weder Caspase-9-Spaltung noch Apoptose detektierbar.

Diese Zellen zeigen ebenso eine Resistenz gegenüber Stimuli des extrinsischen Signalwegs. Jedoch scheint dies ein von der mitochondrialen Resistenz unabhängiger Defekt zu sein, da Staurosporin ja Apoptose auslöst und die im weiteren Apoptosesignalweg nach der Caspase-9 gelegenen Interaktionspartner (z.B. Caspase-3) die gleichen wie im extrinsischen Signalweg sind.

Wenn Caspase-9 so zentral für die Staurosporin-induzierte Apoptose ist, stellt sich die Frage, durch welchen Mechanismus Caspase-9 aktiviert wird. Da Staurosporin ein starker Kinaseninhibitor ist, ist eine von Phosphorylierungen abhängige Apoptoseauslösung denkbar.

5.1.5.3 Die katalytisch inaktive Caspase-9-DN beeinflusst nicht die Caspase-9-abhängige Apoptose durch Staurosporin.

In Caspase-9-DN-überexprimierenden-Jurkatzellen wird eine dominant-negative Caspase-9 überexprimiert. Das aktive Zentrum dieser Caspase-9-DN besitzt eine Cystein-Alanin-Austauschmutation (C²⁸⁷A) und ist katalytisch unwirksam. In Caspase-9-DN-Jurkatzellen kompetitiert diese Mutante mit der nativen Form. Wie Stepczynska et al. [184] in diesen Zellen zeigen konnten, ist der mitochondriale Stimulus Etoposid nicht in der Lage, eine Spaltung von Caspase-9 oder -8 auszulösen. Hingegen waren Staurosporin und anti-CD95 dazu in der Lage. Werden nun Caspase-9-defiziente Zellen verwendet (Abbildung 42–Abbildung 49), so wurde die Staurosporin-induzierte Apoptose blockiert. Die Restmenge der nativen Caspase-9 in den Caspase-9-DN-überexprimierenden Zellen ist offensichtlich ausreichend, um von Staurosporin aktiviert zu werden und Apoptose auszulösen. Der inhibitorische Effekt der Mutante ist wahrscheinlich ausschließlich auf die Apoptosombildung begrenzt.

5.2 Zentrale Rolle der Phosphorylierung in der Apoptose

In den Apoptosesignalwegen werden viele Proteine in ihrer Aktivität durch eine Phosphorylierung, bzw. eine Dephosphorylierung gesteuert. Allgemein gilt, bis auf wenige Ausnahmen [170], dass Phosphorylierungen eine antiapoptotische Wirkung besitzen [48, 165, 166, 171, 229] und Dephosphorylierungen zu Apoptose führen [148, 230-232]. Da Staurosporin einen potenten Breitband-Kinaseinhibitor darstellt und eine Vielzahl von Serin-/Threonin- und Tyrosin-Kinasen hemmt [178], steht zu vermuten, dass durch Staurosporin auch antiapoptotische Kinasen inhibiert werden. Durch diese antiapoptotischen Kinasen werden Proteine im Apoptosesignalweg durch Phosphorylierung inaktiviert. Wird nun die antiapoptotische Kinase mittels Staurosporin blockiert, können daraufhin proapoptotische Phosphatasen die Apoptosesubstrate dephosphorylieren und dadurch deren apoptotische Wirkung aktivieren. Die durch Staurosporin inhibierten dafür verantwortlichen anti-apoptotischen Kinasen, sind bislang noch unbekannt.

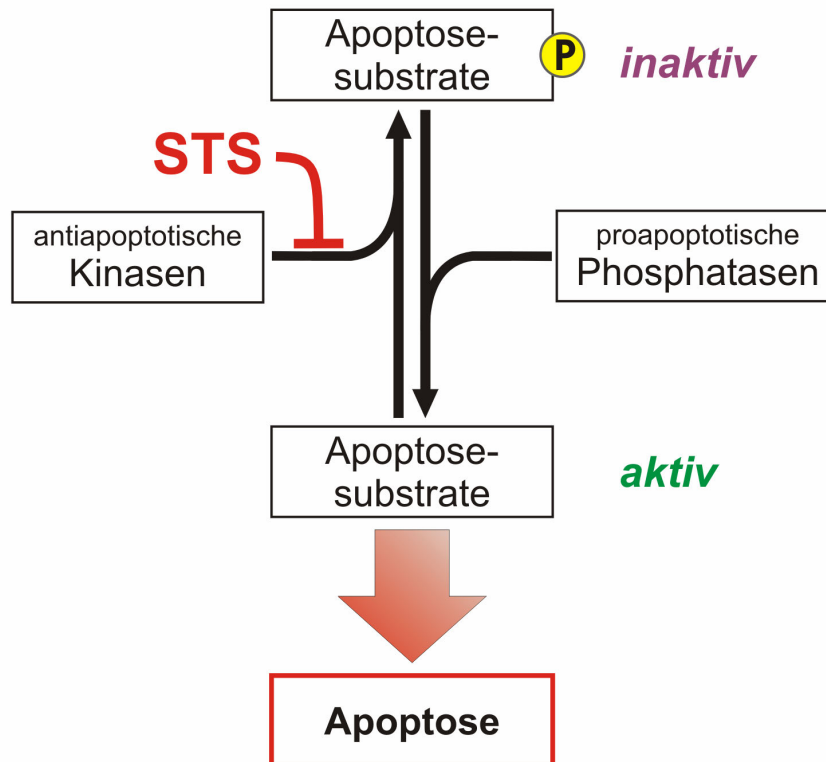


Abbildung 56: Phosphatasen und Kinasen und die Wirkung von Staurosporin in der Apoptose

5.2.1 PKB/Akt-abhängige Apoptose ist nicht mit Staurosporin-induzierten Apoptose identisch

In vielen Tumoren findet sich eine konstitutiv aktive Protein Kinase B (PKB)/Akt und dort für eine Therapieresistenz der Krebszellen verantwortlich [233]. Durch PKB/Akt vermittelte Phosphorylierungen wirken antiapoptotisch (vgl. 1.6), so z.B. die Phosphorylierungen von Bad (Ser¹³⁶) und Caspase-9 (Ser¹⁹⁶). Nach Hemmung der PKB/Akt-Aktivität mit Inhibitoren (z.B. SH-5 [234]) oder PI3-Kinase-Inhibitoren (z.B. Wortmannin [235], LY-294002 [48]) werden resistente Tumorzelllinien wieder auf Apoptosestimuli sensitiv. Tang et al. [235] konnten zeigen, dass eine Überexpression von Akt die Staurosporin-induzierte Apoptose verzögert, aber nicht verhindert. Sie zeigten auch, dass eine Inhibierung der PI3-Kinase mit Wortmannin eine verstärkte Wirkung von Staurosporin zur Folge hat. Dies zeigt, dass der Kinaseinhibitor Staurosporin den PKB/Akt-Signalweg nicht blockiert. Die beschriebene Verstärkung bei einer Beteiligung des Signalwegs an der Staurosporin-induzierten Apoptose sollte nicht auftreten, wenn dessen Überlebenswirkung durch Staurosporin schon aufgehoben wäre.

Werden Tumorzellen mit dem PI3-Kinase-Inhibitor LY-294002 inkubiert, tritt nach 1–3 Tagen Inkubationszeit Apoptose auf (unveröffentlichte Daten, Sebastian Wesselborg und Peter Brossart). Staurosporin und LY-294002 teilen sich daher nicht den gleichen Apoptosesignalweg, da Staurosporin schon zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt Apoptose induziert. Somit ist die Beteiligung des PKB/Akt-Überlebenssignalwegs an der Staurosporin-induzierten Apoptose auszuschließen.

5.2.2 Wirkung von Staurosporin auf die Phosphorylierung/Kinasen

Im menschlichen Genom sind rund 500 Kinasen zu finden [236]. Entgegen der ursprünglichen Meinung Staurosporin, sei ein spezifischer PKC-Inhibitor, ist Staurosporin ein unspezifischer Inhibitor sehr vieler Kinasen. Fabian et al. zeigten, dass Staurosporin bei 104 von 113 Kinasen deren Aktivität blockiert [178]. Die relevanten Kinasen der Staurosporin-induzierten Apoptose sind bislang unbekannt. Die Hemmung der Kinasen durch Staurosporin erfolgt kompetitiv in deren hoch konservierten ATP-Tasche, was dessen unspezifische Wirkung erklärt (vgl. 1.6.4).

5.2.3 Caspase-9-Phosphorylierung zur Aktivitätssteuerung

Eine Phosphorylierung von Caspase-9 verhindert deren Rekrutierung ans Apoptosom und damit die Aktivierung. Cardone [48] stellte erstmals einen Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung von Caspase-9 und deren Inaktivierung her. Die Phosphorylierung von humaner Caspase-9 zur Aktivitätssteuerung war nachgewiesen, wenn auch die physiologische Relevanz eben dieser Ser¹⁹⁶-Phosphorylierung unklar ist. So fehlt in anderen Spezies (Maus, Hund) genau diese Phosphorylierungsstelle in Caspase-9 [50]. Inzwischen sind verschiedene Phosphorylierungsstellen in Caspase-9 zur Regulation der Caspase-9-Aktivität bekannt und wurden den entsprechenden Kinasen zugeordnet.

Tabelle 11: Phosphorylierungsstellen von Caspase-9.

Phosphorylierungsstelle	verantwortliche Kinase	Literatur
Ser ¹⁹⁶ (?), (Ser ¹⁸³):	Protein Kinase B (PKB)/Akt	[48] Phosphorylierungsstelle nicht in jeder Spezies vorhanden [50]
Ser ⁹⁹ , Ser ¹⁸³ , Ser ¹⁹⁵ :	Protein Kinase A (PKA)	[52] Einfluss auf Aktivierung jedoch unwahrscheinlich
Thr ¹⁰⁷ , (Thr ¹²⁵):	ERK2 (MEK1/2)	[49]
Tyr ¹⁵³ :	c-Abl	[47]
Ser ¹⁴⁴ :	Protein Kinase C zeta (PKC ζ)	[53]

Die in den Veröffentlichungen genannten Kinasen wurden in der vorliegenden Arbeit durch spezifische Kinaseinhibitoren gehemmt und die ausgelöste Apoptose gemessen (Abbildung 53 – Abbildung 55). Die Ergebnisse waren enttäuschend. Keiner der literaturbekannten Inhibitoren hat sich als vergleichbar zu Staurosporin oder UCN-01 gezeigt. Insbesondere die Beteiligung der PKC-Proteinfamilie in der Staurosporin-induzierten Apoptose war schon durch frühere Untersuchungen ausgeschlossen worden [176, 177]. Bradys [53] Erwähnung der atypischen Protein Kinase C zeta (PKC ζ)-abhängigen Caspase-9-Phosphorylierung als Inhibitor der Caspase-9/Apaf-1-Interaktion überraschte deswegen [177]. In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Inhibition von PKC ζ als Apoptoseauslöser in Jurkatzellen ausgeschlossen (Abbildung 53 – Abbildung 55). Eine Apoptosebeteiligung der neben PKC ζ genannten Kinasen konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Keiner der literaturbekannten Kinaseinhibitoren hatte im und weit jenseits des angegebenen IC₅₀-Inhibitionsbereichs einen für die jeweilige Kinase spezifischen apoptotischen Effekt. In sehr hohen Dosierungen wurde Zelltod messbar, welcher aber nicht zwischen Caspase-9-positiv und -negativ, bzw. zwischen Leervektor-Kontrollzellen und Bcl-2-überexprimierenden Zellen unterschied und als unphysiologisch einordenbar ist. Allein die Inhibitoren Ro 31-8220 und Bis-I sind in der Lage, staurosporinähnlich Apoptose auszulösen, jedoch ebenfalls erst in unspezifischen

Konzentrationsbereichen. Damit war über diesen Ansatzpunkt keine Aussage zu apoptosebeteiligten Kinasen möglich.

Die Aktivitätsregulation von Caspase-9 durch Protein Kinase A (PKA)-abhängige, direkte Phosphorylierung ist fraglich, da Mutationsversuche der Phosphorylierungsstellen in Caspase-9 keinen Einfluss auf die Caspase-9-Aktivierung zeigten [52]. Vielmehr ist eine PKA-abhängige Regulation über einen bisher unbekanntem, mit Apaf-1 interagierenden Faktor wahrscheinlich [52].

5.2.4 Kinaseinhibitoren

Um eine weitere Untersuchung von potentiellen Kinasen im Staurosporin-Signalweg durchzuführen, wurden die von Christian Peifer synthetisierten Staurosporinanaloga [237] eingesetzt. Diese Staurosporin-Derivate besitzen die durch Molecular-Modeling-optimierte Grundstruktur des Staurosporin. Ein rund 20 Kinasen umfassender Kinasenaktivitätsassay zu diesen Verbindungen existiert und zeigt für einzelne Verbindungen eine starke Kinaseninhibition.

In den von mir durchgeführten Apoptoseassays sind keine Apoptosewirkungen aufgetreten und somit steht keine der von Peifer et al. [237] getesteten Kinasen mit der Staurosporin-induzierten Apoptose im direkten Zusammenhang. Wenn man diese nicht-apoptotischen Kinaseinhibitoren in einem erweiterten Kinasenaktivitätsassay untersucht, können unter den dort gehemmten Kinasen keine mit Wirkung auf die Apoptose sein. Diese Kinasen scheiden dann auch für eine weitere Untersuchung der Staurosporin-induzierten Apoptose aus.

Die Untersuchung von Purinderivaten mit kinaseinhibierenden Eigenschaften [238] haben die in sie gesetzten Erwartungen nicht erfüllt. Es sind keine dem Staurosporin vergleichbare Wirkungen gefunden worden. Die Ergebnisse ließen keinen Schluss auf die am Staurosporin-induzierten Zelltod beteiligen Kinasen zu.

Im Umkehrschluss ist zu bemerken, dass die getesteten Verbindungen keine Apoptose auslösen und daher für eine Anwendung als Arzneistoff für nicht mit Apoptosestörungen einhergehende, kinasebedingte Krankheiten zur Verfügung stehen. Der PKC β -Inhibitor Ruboxistaurin (LY-333531) ist zum Beispiel ein Staurosporinderivat, welches nicht in die Apoptose eingreift. Es befindet sich derzeit in der klinischen Prüfung und soll bei diabetischer Retino-, Neuro- und Nephropathie zum Einsatz kommen.

5.3 Bindungspartner von Caspase-9.

Um Bindungspartner von Caspase-9 zu finden, die von Staurosporin beeinflusst sind, wurde eine Immunpräzipitation mit Zelllysat von Caspase-9-rekonstituierten Jurkatzellen durchgeführt. Verglichen wurde eine Staurosporin-behandelte gegen eine unbehandelte Kontrolle im SDS-PAGE-Silbergel; voneinander abweichende Banden wurden einer massenspektroskopischen Untersuchung unterzogen. Die Ergebnisse sind wegen der geringen Unterschiede im Bandenmuster mit Vorbehalt bezüglich ihrer Staurosporin-Abhängigkeit zu verwenden. Sie zeigen aber doch, dass Caspase-9 mit einer Vielzahl von Proteinen interagiert.

Tabelle 12: Interaktionspartner von Caspase-9

Interaktionspartner von Caspase-9	Funktionen
BIP (=Gpr78/BiP)	Das BiP-Protein ist ein Repräsentant der Chaperon-Proteinfamilie, das in Folge der Unfolded Protein Reaction (UPR) des ER transkriptionell aktiviert wird und im ER dem ER-Stress entgegenwirkt, indem es die Proteinfaltung unterstützt. [239].
Cdc25B (cell division cycle 25)	spezifische duale Phosphatase, die am G1/S-Übergang des Zellzyklus T14 und Y15 im aktiven Zentrum der Cdk dephosphoryliert [240].
Heat Shock Cognate 71kDa (= HSP7C, HSPA8)	Gegenspieler von Heat Shock Protein 70 kDa (Hsp70); die Aktivierung von Caspase-9 wird verhindert [241, 242].
Protein arginine N-methyltransferase 5 (= PRMT1)	Transskriptionskontrolle, methyliert spezifisch Arginin-3 der Histone H4 [243]
Serumalbumin Vorläuferprotein	vielfältige Aufgaben (Transport von Hormonen, osmotisches Gleichgewicht des Blutes)
Probable phospholipid-transporting ATPase IM (= ATP8B4)	bislang ohne Funktionsbeschreibung
Ser/Thr-Kinase 38	bislang ohne Funktionsbeschreibung

Tubulin β -Kette	Hauptbestandteil der Mikrotubuli
Collagen $\alpha 1$	ubiquitär vorhandenes Protein
52 kDa Ro Protein	Sjoegren Syndrom Typ A Antigen
Caspase-9 (Proform)	
Myosin (?)	Bestandteil der Muskulatur
Keratin	Verunreinigung durch Aufarbeitungsprozess
39S ribosomales Protein L19, mitochondrial (Präcursor)	Teil der 39S-Untereinheit der Ribosomen

5.4 Hochmolekularer Caspase-9-Komplex

Für mitochondriale Stimuli ist die Entstehung eines Apoptosoms für die Aktivierung der Caspasekaskade entscheidend. Caspase-9 wurde unter Staurosporininkubation jedoch ohne das Apoptosom aktiviert. Ob Caspase-9 dabei an einem apoptosomähnlichen Komplex beteiligt ist, welcher die Aktivierung der Caspase-9 beeinflusst, wurde im nächsten Versuch überprüft. Für den Versuch wurden Jurkatzellen mit Bcl-2-Überexpression gewählt, da in diesen Zellen die Cytochrom c-Freisetzung verhindert und damit die Bildung des eigentlichen Apoptosoms blockiert wird. Die Zellen werden mit Staurosporin stimuliert und die Zelllysate einer Gelfiltration unterzogen [225]. Durch Größenausschlusschromatographie werden die großen Proteinkomplexe zuerst von der Säule eluiert. Bei Betrachtung der gewonnenen Fraktionen (Abbildung 51) zeigt sich Caspase-9 mit anderen Proteinen in einem hochmolekularen, inaktiven Komplex. Dieser Komplex ist Staurosporin-unabhängig und schon in Kontrollzellen zu finden. Er stellt daher keinen Ansatzpunkt für eine weitere Untersuchung der staurosporinabhängigen Caspase-9-Aktivierung dar. Die ursprüngliche Hoffnung war, dass ein Phosphorylierungsgeschehen von Caspase-9 durch Staurosporin beeinflusst würde und sich damit die Caspase-9-Beteiligung an Proteinkomplexen verändert. Alle getesteten Phosphorylierungsantikörper zeigten sich zum Nachweis einer Caspase-9-Phosphorylierung ungeeignet. Dieser Ansatz zur Bestimmung des Phosphorylierungsstatus ist noch ausbaufähig, wenn radioaktiver Phosphor zur Detektion des Phosphorylierungsgeschehens verwendet wird.

5.5 Ausblick

In den folgenden Monaten sollen die durch Immunpräzipitation gefundenen Interaktionspartner von Caspase-9 in ihrer Funktion aufgeklärt werden. Weiter sollen die Bestandteile des gefundenen Caspase-9-Komplexes aus der Gelfiltration identifiziert werden. Die Bestimmung der Phosphorylierung von Caspase-9 soll durch Einsatz von radioaktiven ATP erfolgen.

Ein weiteres Hauptziel der kommenden Untersuchungen ist die Bestimmung der relevanten Kinasesignalwege in der Staurosporin-induzierten Apoptose. Dafür soll ein siRNA-Screening durchgeführt werden, in dem die Neusynthese von einzelnen Kinasen herunterreguliert und die Kinasenbeteiligung am Staurosporin-induzierten Zelltod nachweisbar wird. Diese Untersuchungen entstehen in Zusammenarbeit mit Dr. Ingo Engels (Novartis, La Jolla, USA). Insgesamt sollen die Kenntnisse des neuen Apoptosesignalweges dann die Möglichkeit eröffnen, neue Targets für Drugscreening-Assays zu definieren. Damit soll dann die Elimination von Tumoren ermöglicht werden, die sich bislang resistent gegenüber konventionellen DNA-schädigenden Zytostatika zeigten.

6 Zusammenfassung

Der von Staurosporin ausgelöste Apoptosesignalweg ist bislang unbekannt. Es wurde von Stepczynska et al. [184] beschrieben, dass Staurosporin in zytostatikaresistenten JM319-Zellen (Abbildung 17) eine verzögerte Apoptose zeigt. Daher wurde ein vom mitochondrialen Apoptosesignalweg unabhängiger Signalweg für Staurosporin postuliert. In der vorliegenden Arbeit wird versucht, die für Staurosporin-induzierte Apoptose wichtigen Apoptosesignalwege zu finden.

Systematisch werden die folgenden Signalwege untersucht:

- 1 – Der extrinsische Signalweg,
- 2 – Die Beteiligung des Zellkernes,
- 3 – Die Beteiligung des Endoplasmatischen Retikulums,
- 4 – Der mitochondriale Signalweg,
- 5 – Apoptosombildung.

Die Signalwege 2–4 werden als intrinsische Signalwege bezeichnet.

Der extrinsische Signalweg ist durch seine Ansteuerbarkeit durch von außen an der Zellmembran gelegenen Rezeptoren charakterisiert. Bindet dort der Ligand an seinen Rezeptor, wird eine Apoptosereaktion in der Zelle ausgelöst. Die in dieser Arbeit verwendeten Jurkatzellen A3 besitzen keine Caspase-8 oder kein FADD, die beide für eine Weiterleitung des extrinsischen Apoptosesignals entscheidend sind. Staurosporin kann in diesen defizienten Zellen unverändert Apoptose auslösen (Abbildung 18). Für Staurosporin kommt daher nur ein intrinsischer Signalweg in Betracht.

Die intrinsischen Signalwege teilen sich in drei Bereiche auf. Zentral ist allen das Mitochondrium, das durch Cytochrom c-Freisetzung die Bildung des Apoptosoms ermöglicht. Aktiviert durch DNA-schädigende Substanzen sendet der Zellkern Apoptosesignale aus. Die Signalkaskade des PIDDosoms schließt die Caspase-2 ein. Caspase-2-defiziente Zellen sind nicht in der Lage, das Apoptosesignal DNA-schädigender Stoffe weiterzugeben. Da diese Zellen aber auf Staurosporin empfindlich bleiben, schließt dies eine Beteiligung des Caspase-2-abhängigen Signalwegs für die Staurosporin-induzierte Apoptose aus (Abbildung 21).

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) wird durch ER-schädigende Substanzen zerstört. Eine Zerstörung des ER oder Probleme mit der Proteinmodifikation im ER lösen Apoptose aus. Sie ist durch unterschiedliche Mechanismen an das Mitochondrium gekoppelt. Ein spezifischer ER-Schutz ist mit Überexpression des antiapoptotisch wirkenden, ER-lokalisierten Bcl-2 zu

erreichen. Staurosporin kann trotz Bcl-2-Schutz am ER unverändert Apoptose auslösen (Abbildung 19). Der Signalweg über das ER wird daher von Staurosporin nicht als Hauptweg beschriftet.

Die proapoptotischen Proteine Bak und Bax übertragen die Apoptosesignale der verschiedenen intrinsischen Signalwege auf das Mitochondrium. Wird der mitochondriale Signalweg durch Störung der Mitochondrienfunktionen oder durch Bax/Bak aktiviert, so wird Cytochrom c ins Zytosol freigesetzt und das Apoptosom gebildet. Das Mitochondrium wird durch die Gegenspieler von Bax/Bak – Bcl-2 und Bcl-X_L – vor Apoptose geschützt. Dieser Schutz ist bei Inkubation mit Staurosporin unvollständig, da höhere Konzentrationen an Staurosporin in Bcl-2- oder Bcl-X_L-geschützten Zellen wieder Apoptose auslösen können (Abbildung 22).

Die Cytochrom c-Freisetzung aus dem Mitochondrium ins Zytosol ermöglicht den Zusammenbau des Apoptosoms. Das Apoptosom entsteht nur durch Zusammentreffen von Cytochrom c, Apaf-1, dATP und Caspase-9. Fehlt einer der Bestandteile ist die Bildung unmöglich. In Apaf-1-defizienten Zellen kann durch Staurosporin Apoptose ausgelöst werden (Abbildung 36). Deswegen ist das Apoptosom keine Voraussetzung für die Staurosporin-induzierte Apoptose.

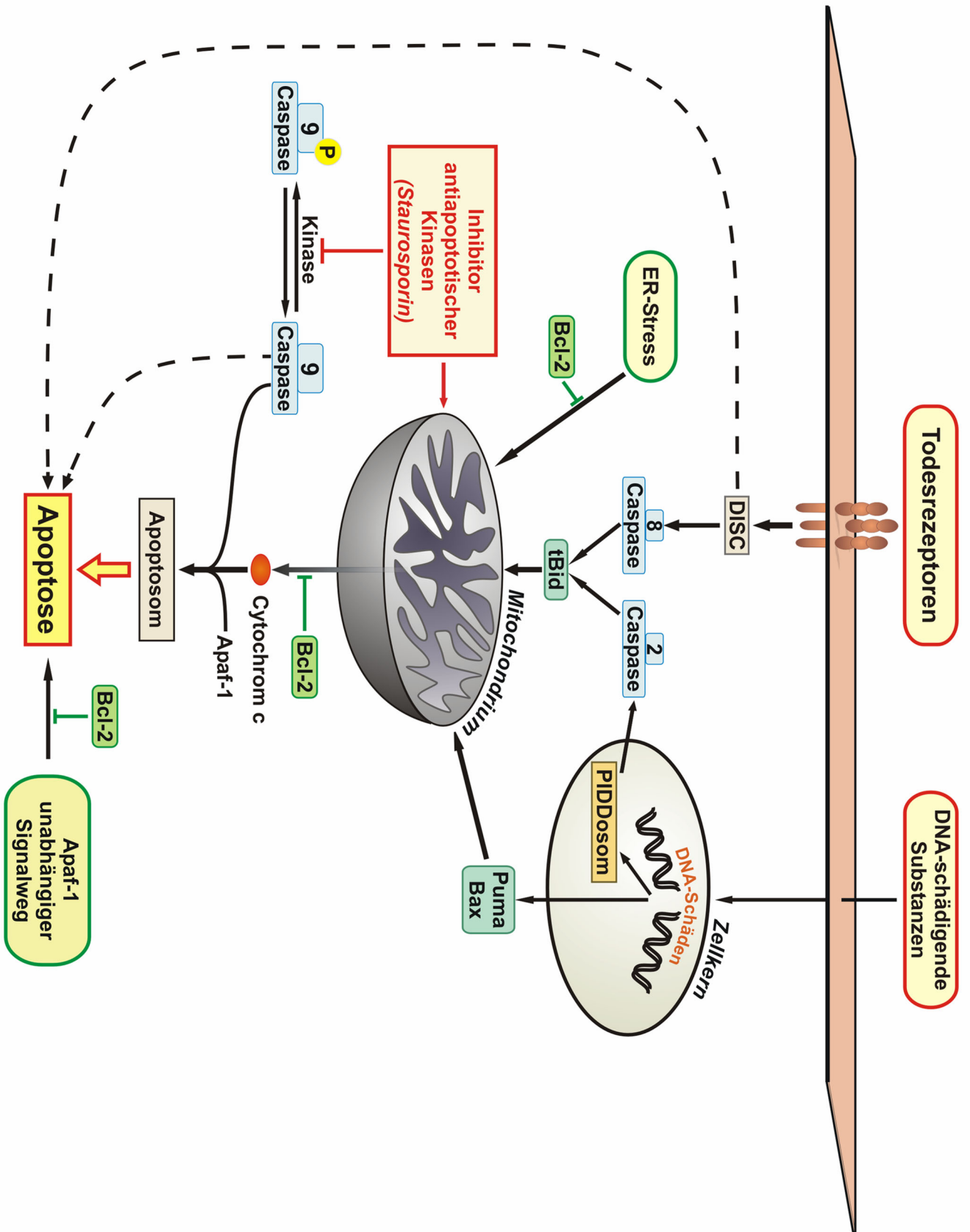
Fehlt hingegen Caspase-9 in den Zellen, so findet nach Staurosporininkubation keine Apoptose mehr statt (Abbildung 42). Caspase-9 ist demnach das zentrale Protein einer durch Staurosporin ausgelösten Apoptose. Caspase-9 spielt dabei eine doppelte Rolle: in niedrigen Konzentrationen löst Staurosporin durch eine Schädigung des Mitochondriums und Cytochrom c-Freisetzung Apoptosom-abhängig Apoptose aus. Ist der Zusammenbau des Apoptosoms nicht möglich, so aktiviert Staurosporin in hohen Konzentrationen auch direkt Caspase-9 und löst so Apoptose aus.

Der unspezifische Kinaseinhibitor Staurosporin inhibiert eine Vielzahl an Kinasen [178, 182]. Folglich liegt der Schluss nahe, eine Rolle der Kinasen in der Apoptoseauslösung zu vermuten, denn die Aktivierung von Caspase-9 kann über Phosphorylierungen gesteuert werden. Die entscheidenden Interaktionspartner in der Aktivierung der Caspase-9, vornehmlich durch Staurosporin inhibierbare Kinasen, sind bislang unbekannt. Die Entdeckung dieser Partner ist das Ziel weiterer Forschungen auf diesem Gebiet. Durch den neu beschriebenen Apoptosesignalweg können neue Staurosporinähnliche Strukturen für Drugscreening-Assays synthetisiert werden, um damit dann die Elimination von Tumoren zu ermöglichen, die bislang resistent gegenüber konventionellen DNA-schädigenden Zytostatika

sind. Als Zusammenfassung der bekannten und der in dieser Arbeit gefundenen Signalwege dient die folgende Grafik, die insbesondere die Rolle von Staurosporin in der Apoptose unterstreicht.

Folgende Seite:

Abbildung 57: Signalwege der Apoptose unter besonderer Berücksichtigung des Breitbandkinaseinhibitors Staurosporin.



7 Literatur

- [1] **J. F. Kerr, A. H. Wyllie and A. R. Currie.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* (1972).**26**, 239-57.
- [2] **J. E. Sulston and H. R. Horvitz.** Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* (1977).**56**, 110-56.
- [3] **S. Wesselborg, U. Prufer, M. Wild, B. Schraven, S. C. Meuer and D. Kabelitz.** Triggering via the alternative CD2 pathway induces apoptosis in activated human T lymphocytes. *Eur J Immunol* (1993).**23**, 2707-10.
- [4] **E. Duvall, A. H. Wyllie and R. G. Morris.** Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology* (1985).**56**, 351-8.
- [5] **N. N. Danial and S. J. Korsmeyer.** Cell death: critical control points. *Cell* (2004).**116**, 205-19.
- [6] **F. Madeo, E. Frohlich and K. U. Frohlich.** A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol* (1997).**139**, 729-34.
- [7] **S. Wissing, P. Ludovico, E. Herker, S. Buttner, S. M. Engelhardt, T. Decker, A. Link, A. Proksch, F. Rodrigues, M. Corte-Real, K. U. Frohlich, J. Manns, C. Cande, S. J. Sigrist, G. Kroemer and F. Madeo.** An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J Cell Biol* (2004).**166**, 969-74.
- [8] **M. D. Jacobson, M. Weil and M. C. Raff.** Programmed cell death in animal development. *Cell* (1997).**88**, 347-54.
- [9] **H. R. Horvitz.** Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* (1999).**59**, 1701s-1706s.
- [10] **F. Q. Alenzi.** Apoptosis and diseases: regulation and clinical relevance. *Saudi Med J* (2005).**26**, 1679-90.
- [11] **S. Ghavami, M. Hashemi, K. Kadkhoda, S. M. Alavian, G. H. Bay and M. Los.** Apoptosis in liver diseases--detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit* (2005).**11**, RA337-45.
- [12] **Y. Okuda, B. R. Apatoff and D. N. Posnett.** Apoptosis of T cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid is associated with disease activity of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* (2006).**171**, 163-70.
- [13] **P. E. Mouser, E. Head, K. H. Ha and T. T. Rohn.** Caspase-mediated cleavage of glial fibrillary acidic protein within degenerating astrocytes of the Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol* (2006).**168**, 936-46.
- [14] **S. A. Oakes, S. S. Lin and M. C. Bassik.** The control of endoplasmic reticulum-initiated apoptosis by the BCL-2 family of proteins. *Curr Mol Med* (2006).**6**, 99-109.
- [15] **R. Gerl and D. L. Vaux.** Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis* (2005).**26**, 263-270.
- [16] **D. Hanahan and R. A. Weinberg.** The hallmarks of cancer. *Cell* (2000).**100**, 57-70.
- [17] **J. Yuan and B. A. Yankner.** Apoptosis in the nervous system. *Nature* (2000).**407**, 802-9.
- [18] **A. Saraste and K. Pulkki.** Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* (2000).**45**, 528-37.
- [19] **K. Lauber, S. G. Blumenthal, M. Waibel and S. Wesselborg.** Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* (2004).**14**, 277-87.
- [20] **J. Savill and V. Fadok.** Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* (2000).**407**, 784-788.
- [21] **E. Farber.** Programmed cell death: necrosis versus apoptosis. *Mod. Pathol.* (1994).**7**, 605-609.

- [22] **X. Wu, C. Molinaro, N. Johnson and C. A. Casiano.** Secondary necrosis is a source of proteolytically modified forms of specific intracellular autoantigens: implications for systemic autoimmunity. *Arthritis Rheum.* (2001).**44**, 2642-52.
- [23] **S. Van Cruchten and W. Van Den Broeck.** Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* (2002).**31**, 214-23.
- [24] **S. M. Srinivasula, R. Hegde, A. Saleh, P. Datta, E. Shiozaki, J. Chai, R. A. Lee, P. D. Robbins, T. Fernandes-Alnemri, Y. Shi and E. S. Alnemri.** A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* (2001).**410**, 112-6.
- [25] **E. S. Alnemri, D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong and J. Yuan.** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* (1996).**87**, 171.
- [26] **I. Budihardjo, H. Oliver, M. Lutter, X. Luo and X. Wang.** Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (1999).**15**, 269-90.
- [27] **G. S. Salvesen and V. M. Dixit.** Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1999).**96**, 10964-10967.
- [28] **N. P. Walker, R. V. Talanian, K. D. Brady, L. C. Dang, N. J. Bump, C. R. Ferenz, S. Franklin, T. Ghayur, M. C. Hackett, L. D. Hammill and et al.** Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* (1994).**78**, 343-52.
- [29] **P. Fuentes-Prior and G. S. Salvesen.** The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* (2004).**384**, 201-32.
- [30] **G. S. Salvesen and V. M. Dixit.** Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* (1997).**91**, 443-6.
- [31] **K. M. Boatright, M. Renatus, F. L. Scott, S. Sperandio, H. Shin, I. M. Pedersen, J. E. Ricci, W. A. Edris, D. P. Sutherlin, D. R. Green and G. S. Salvesen.** A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* (2003).**11**, 529-41.
- [32] **U. Fischer, R. U. Janicke and K. Schulze-Osthoff.** Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* (2003).**10**, 76-100.
- [33] **J. B. Denault and G. S. Salvesen.** Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev* (2002).**102**, 4489-500.
- [34] **H. Li, H. Zhu, C.-J. Xu and J. Yuan.** Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* (1998).**94**, 491-501.
- [35] **X. Liu, H. Zou, C. Slaughter and X. Wang.** DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* (1997).**89**, 175-84.
- [36] **X. Liu, H. Zou, P. Widlak, W. Garrard and X. Wang.** Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1. *J Biol Chem* (1999).**274**, 13836-40.
- [37] **D. Wu, A. Ingram, J. H. Lahti, B. Mazza, J. Grenet, A. Kapoor, L. Liu, V. J. Kidd and D. Tang.** Apoptotic release of histones from nucleosomes. *J Biol Chem* (2002).**277**, 12001-8.
- [38] **S. H. Kaufmann, S. Desnoyers, Y. Ottaviano, N. E. Davidson and G. G. Poirier.** Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* (1993).**53**, 3976-85.
- [39] **A. H. Boulares, A. G. Yakovlev, V. Ivanova, B. A. Stoica, G. Wang, S. Iyer and M. Smulson.** Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem* (1999).**274**, 22932-40.

- [40] **K. K. Wang, R. Posmantur, R. Nath, K. McGinnis, M. Whitton, R. V. Talanian, S. B. Glantz and J. S. Morrow.** Simultaneous degradation of alphaII- and betaII-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *J Biol Chem* (1998).**273**, 22490-7.
- [41] **L. Rao, D. Perez and E. White.** Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* (1996).**135**, 1441-55.
- [42] **A. Di Bacco, K. Keeshan, S. L. McKenna and T. G. Cotter.** Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. *Oncologist* (2000).**5**, 405-15.
- [43] **Q. Zhan, S. Jin, B. Ng, J. Plisket, S. Shangary, A. Rathi, K. D. Brown and R. Baskaran.** Caspase-3 mediated cleavage of BRCA1 during UV-induced apoptosis. *Oncogene* (2002).**21**, 5335-45.
- [44] **R. Ravi, A. Bedi, E. J. Fuchs and A. Bedi.** CD95 (Fas)-induced caspase-mediated proteolysis of NF-kappaB. *Cancer Res* (1998).**58**, 882-6.
- [45] **M. Renatus, H. R. Stennicke, F. L. Scott, R. C. Liddington and G. S. Salvesen.** Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001).**98**, 14250-5.
- [46] **M. A. McDonnell, D. Wang, S. M. Khan, M. G. Vander Heiden and A. Kelekar.** Caspase-9 is activated in a cytochrome c-independent manner early during TNFalpha-induced apoptosis in murine cells. *Cell Death Differ* (2003).**10**, 1005-15.
- [47] **D. Raina, P. Pandey, R. Ahmad, A. Bharti, J. Ren, S. Kharbanda, R. Weichselbaum and D. Kufe.** c-Abl tyrosine kinase regulates caspase-9 autocleavage in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem* (2005).**280**, 11147-51.
- [48] **M. H. Cardone, N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch and J. C. Reed.** Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* (1998).**282**, 1318-21.
- [49] **L. A. Allan, N. Morrice, S. Brady, G. Magee, S. Pathak and P. R. Clarke.** Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nat Cell Biol* (2003).**5**, 647-54.
- [50] **J. Rodriguez, H.-H. Chen, S.-C. Lin, Y. Lazebnik, J. C. Reed, M. H. Cardone, N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. Franke and E. Stanbridge.** Caspase Phosphorylation, Cell Death, and Species Variability. *Science* (2000).**287**, 1363.
- [51] **E. Fujita, A. Jinbo, H. Matuzaki, H. Konishi, U. Kikkawa and T. Momoi.** Akt phosphorylation site found in human caspase-9 is absent in mouse caspase-9. *Biochem Biophys Res Commun* (1999).**264**, 550-5.
- [52] **M. C. Martin, L. A. Allan, M. Lickrish, C. Sampson, N. Morrice and P. R. Clarke.** Protein kinase A regulates caspase-9 activation by Apaf-1 downstream of cytochrome c. *J Biol Chem* (2005).**280**, 15449-55.
- [53] **S. C. Brady, L. A. Allan and P. R. Clarke.** Regulation of caspase 9 through phosphorylation by protein kinase C zeta in response to hyperosmotic stress. *Mol Cell Biol* (2005).**25**, 10543-55.
- [54] **U. Maurer, C. Charvet, A. S. Wagman, E. Dejardin and D. R. Green.** Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell* (2006).**21**, 749-60.
- [55] **C. Belka, J. Rudner, S. Wesselborg, A. Stepczynska, P. Marini, A. Leppl-Wienhues, H. Faltin, M. Bamberg, W. Budach and K. Schulze-Osthoff.** Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis. *Oncogene* (2000).**19**, 1181-90.
- [56] **A. Nencioni, S. Wesselborg and P. Brossart.** Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its ligands in the control of immune responses. *Crit Rev Immunol* (2003).**23**, 1-13.

- [57] **B. Neumeister, M. Faigle, K. Lauber, H. Northoff and S. Wesselborg.** Legionella pneumophila induces apoptosis via the mitochondrial death pathway. *Microbiology* (2002).**148**, 3639-50.
- [58] **J. L. Perfettini, M. Castedo, T. Roumier, K. Andreau, R. Nardacci, M. Piacentini and G. Kroemer.** Mechanisms of apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *Cell Death Differ* (2005).**12 Suppl 1**, 916-23.
- [59] **I. H. Engels, A. Stepczynska, C. Stroh, K. Lauber, C. Berg, R. Schwenzer, H. Wajant, R. U. Janicke, A. G. Porter, C. Belka, M. Gregor, K. Schulze-Osthoff and S. Wesselborg.** Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene* (2000).**19**, 4563-73.
- [60] **H. Bantel, I. H. Engels, W. Voelter, K. Schulze-Osthoff and S. Wesselborg.** Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Res* (1999).**59**, 2083-90.
- [61] **S. Wesselborg, I. H. Engels, E. Rossmann, M. Los and K. Schulze-Osthoff.** Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction. *Blood* (1999).**93**, 3053-63.
- [62] **C. P. Berg, A. Rothbart, K. Lauber, G. M. Stein, I. H. Engels, C. Belka, R. U. Janicke, K. Schulze-Osthoff and S. Wesselborg.** Tributyltin (TBT) induces ultra-rapid caspase activation independent of apoptosome formation in human platelets. *Oncogene* (2003).**22**, 775-80.
- [63] **N. Itoh, S. I. A. Yonehara, M. Yonehara, S. Mizushima, M. Sameshima, A. Hase, Y. Seto and S. Nagata.** The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* (1991).**66**, 233-243.
- [64] **D. W. Banner, A. D'Arcy, W. Janes, R. Gentz, H. J. Schoenfeld, C. Broger, H. Loetscher and W. Lesslauer.** Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* (1993).**73**, 431-445.
- [65] **K. Schulze-Osthoff, D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg and M. E. Peter.** Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* (1998).**254**, 439-59.
- [66] **M. R. Sprick, M. A. Weigand, E. Rieser, C. T. Rauch, P. Juo, J. Blenis, P. H. Krammer and H. Walczak.** FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* (2000).**12**, 599-609.
- [67] **M. E. Peter and P. H. Krammer.** The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* (2003).**10**, 26-35.
- [68] **J. L. Bodmer, N. Holler, S. Reynard, P. Vinciguerra, P. Schneider, P. Juo, J. Blenis and J. Tschopp.** TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol* (2000).**2**, 241-3.
- [69] **P. H. Krammer.** CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* (2000).**407**, 789-95.
- [70] **J. Rudner, V. Jendrossek, K. Lauber, P. T. Daniel, S. Wesselborg and C. Belka.** Type I and type II reactions in TRAIL-induced apoptosis -- results from dose-response studies. *Oncogene* (2005).**24**, 130-40.
- [71] **M. Grinberg, R. Sarig, Y. Zaltsman, D. Frumkin, N. Grammatikakis, E. Reuveny and A. Gross.** tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *J Biol Chem* (2002).**277**, 12237-45.
- [72] **S. J. Korsmeyer, M. C. Wei, M. Saito, S. Weiler, K. J. Oh and P. H. Schlesinger.** Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* (2000).**7**, 1166-73.
- [73] **M. J. Goldenthal and J. Marin-Garcia.** Mitochondrial signaling pathways: a receiver/integrator organelle. *Mol Cell Biochem* (2004).**262**, 1-16.

- [74] **X. Wang.** The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* (2001).**15**, 2922-33.
- [75] **X. Liu, C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson and X. Wang.** Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* (1996).**86**, 147-157.
- [76] **G. van Loo, X. Saelens, M. van Gorp, M. MacFarlane, S. J. Martin and P. Vandennebeele.** The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* (2002).**9**, 1031-42.
- [77] **G. Kroemer.** Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* (2003).**304**, 433-5.
- [78] **D. R. Green and G. Kroemer.** The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* (2004).**305**, 626-9.
- [79] **D. Arnout, B. Gaume, M. Karbowski, J. C. Sharpe, F. Cecconi and R. J. Youle.** Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *Embo J* (2003).**22**, 4385-99.
- [80] **N. Joza, S. A. Susin, E. Daugas, W. L. Stanford, S. K. Cho, C. Y. Li, T. Sasaki, A. J. Elia, H. Y. Cheng, L. Ravagnan, K. F. Ferri, N. Zamzami, A. Wakeham, R. Hakem, H. Yoshida, Y. Y. Kong, T. W. Mak, J. C. Zuniga-Pflucker, G. Kroemer and J. M. Penninger.** Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* (2001).**410**, 549-54.
- [81] **J. F. Scaife.** The effect of lethal doses of x-irradiation on the enzymatic activity of mitochondrial cytochrome c. *Can J Biochem* (1966).**44**, 433-48.
- [82] **E. Bossy-Wetzel, D. D. Newmeyer and D. R. Green.** Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J* (1998).**17**, 37-49.
- [83] **M. A. Benedict, Y. Hu, N. Inohara and G. Nunez.** Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra WD-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9. *J. Biol. Chem.* (2000).**275**, 8461-8.
- [84] **Y. Hu, M. A. Benedict, L. Ding and G. Nunez.** Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.* (1999).**18**, 3586-95.
- [85] **D. Acehan, X. Jiang, D. G. Morgan, J. E. Heuser, X. Wang and C. W. Akey.** Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* (2002).**9**, 423-32.
- [86] **X. Yu, D. Acehan, J. F. Menetret, C. R. Booth, S. J. Ludtke, S. J. Riedl, Y. Shi, X. Wang and C. W. Akey.** A structure of the human apoptosome at 12.8 Å resolution provides insights into this cell death platform. *Structure (Camb)* (2005).**13**, 1725-35.
- [87] **Y. Hu, L. Ding, D. M. Spencer and G. Nunez.** WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J. Biol. Chem.* (1998).**273**, 33489-94.
- [88] **S. M. Srinivasula, M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri and E. S. Alnemri.** Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* (1998).**1**, 949-57.
- [89] **C. Adrain, E. A. Slee, M. T. Harte and S. J. Martin.** Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *J. Biol. Chem.* (1999).**274**, 20855-60.
- [90] **H. Zou, Y. Li, X. Liu and X. Wang.** An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* (1999).**274**, 11549-56.
- [91] **K. Cain, S. B. Bratton, C. Langlais, G. Walker, D. G. Brown, X. M. Sun and G. M. Cohen.** Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and

- inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J. Biol. Chem.* (2000).**275**, 6067-70.
- [92] **K. Cain, D. G. Brown, C. Langlais and G. M. Cohen.** Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J. Biol. Chem.* (1999).**274**, 22686-92.
- [93] **D. W. Nicholson.** Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* (1999).**6**, 1028-42.
- [94] **M. M. Hill, C. Adrain, P. J. Duriez, E. M. Creagh and S. J. Martin.** Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J* (2004).**23**, 2134-45.
- [95] **G. S. Salvesen and C. S. Duckett.** IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2002).**3**, 401-10.
- [96] **D. Twiddy, D. G. Brown, C. Adrain, R. Jukes, S. J. Martin, G. M. Cohen, M. MacFarlane and K. Cain.** Pro-apoptotic proteins released from the mitochondria regulate the protein composition and caspase-processing activity of the native Apaf-1/caspase-9 apoptosome complex. *J Biol Chem* (2004).**279**, 19665-82.
- [97] **Z. T. Schafer and S. Kornbluth.** The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Dev Cell* (2006).**10**, 549-61.
- [98] **G. Kroemer and J. C. Reed.** Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* (2000).**6**, 513-9.
- [99] **J. G. Pastorino, N. Shulga and J. B. Hoek.** Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* (2002).**277**, 7610-8.
- [100] **M. Izawa, T. Harada, I. Deura, F. Taniguchi, T. Iwabe and N. Terakawa.** Drug-induced apoptosis was markedly attenuated in endometriotic stromal cells. *Hum Reprod* (2006).**21**, 600-4.
- [101] **C. P. Baines, C. X. Song, Y. T. Zheng, G. W. Wang, J. Zhang, O. L. Wang, Y. Guo, R. Bolli, E. M. Cardwell and P. Ping.** Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circ Res* (2003).**92**, 873-80.
- [102] **M. Juhaszova, D. B. Zorov, S. H. Kim, S. Pepe, Q. Fu, K. W. Fishbein, B. D. Ziman, S. Wang, K. Ytrehus, C. L. Antos, E. N. Olson and S. J. Sollott.** Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* (2004).**113**, 1535-49.
- [103] **N. Zamzami, P. Marchetti, M. Castedo, D. Decaudin, A. Macho, T. Hirsch, S. A. Susin, P. X. Petit, B. Mignotte and G. Kroemer.** Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* (1995).**182**, 367-77.
- [104] **G. Kroemer, P. Petit, N. Zamzami, J. L. Vayssiere and B. Mignotte.** The biochemistry of programmed cell death. *Faseb J* (1995).**9**, 1277-87.
- [105] **S. Shimizu and Y. Tsujimoto.** Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000).**97**, 577-82.
- [106] **R. J. Kaufman.** Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* (1999).**13**, 1211-1233.
- [107] **H. P. Harding, M. Calton, F. Urano, I. Novoa and D. Ron.** Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2002).**18**, 575-99.

- [108] **T. Nakagawa, H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B. A. Yankner and J. Yuan.** Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* (2000).**403**, 98-103.
- [109] **C. Reimertz, D. Kogel, A. Rami, T. Chittenden and J. H. M. Prehn.** Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *J. Cell Biol.* (2003).**162**, 587-597.
- [110] **F. Di Sano, E. Ferraro, R. Tufi, T. Achsel, M. Piacentini and F. Cecconi.** Endoplasmic reticulum stress induces apoptosis by an apoptosome-dependent but caspase 12-independent mechanism. *J Biol Chem* (2006).**281**, 2693-700.
- [111] **K. D. McCullough, J. L. Martindale, L. O. Klotz, T. Y. Aw and N. J. Holbrook.** Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* (2001).**21**, 1249-59.
- [112] **J. Hacki, L. Egger, L. Monney, S. Conus, T. Rosse, I. Fellay and C. Borner.** Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene* (2000).**19**, 2286-95.
- [113] **R. V. Rao, S. Castro-Obregon, H. Frankowski, M. Schuler, V. Stoka, G. del Rio, D. E. Bredesen and H. M. Ellerby.** Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* (2002).**277**, 21836-42.
- [114] **Y. Ito, P. Pandey, N. Mishra, S. Kumar, N. Narula, S. Kharbanda, S. Saxena and D. Kufe.** Targeting of the c-Abl tyrosine kinase to mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* (2001).**21**, 6233-42.
- [115] **P. Pinton, D. Ferrari, E. Rapizzi, F. Di Virgilio, T. Pozzan and R. Rizzuto.** The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *Embo J* (2001).**20**, 2690-701.
- [116] **R. Rizzuto, P. Pinton, W. Carrington, F. S. Fay, K. E. Fogarty, L. M. Lifshitz, R. A. Tuft and T. Pozzan.** Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* (1998).**280**, 1763-6.
- [117] **A. Tinel and J. Tschopp.** The PIDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* (2004).**304**, 843-6.
- [118] **Z. Gao, Y. Shao and X. Jiang.** Essential roles of the Bcl-2 family of proteins in caspase-2-induced apoptosis. *J Biol Chem* (2005).**280**, 38271-5.
- [119] **P. Lassus, X. Opitz-Araya and Y. Lazebnik.** Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* (2002).**297**, 1352-4.
- [120] **J. D. Robertson, M. Enoksson, M. Suomela, B. Zhivotovsky and S. Orrenius.** Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* (2002).**277**, 29803-9.
- [121] **Y. Guo, S. M. Srinivasula, A. Druilhe, T. Fernandes-Alnemri and E. S. Alnemri.** Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem* (2002).**277**, 13430-7.
- [122] **M. D. Jacobson, J. F. Burne and M. C. Raff.** Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *Embo J* (1994).**13**, 1899-910.
- [123] **K. Schulze-Osthoff, H. Walczak, W. Droge and P. H. Kramer.** Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol* (1994).**127**, 15-20.
- [124] **V. S. Marsden, L. O'Connor, L. A. O'Reilly, J. Silke, D. Metcalf, P. G. Ekert, D. C. Huang, F. Cecconi, K. Kuida, K. J. Tomaselli, S. Roy, D. W. Nicholson, D. L. Vaux, P. Bouillet, J. M. Adams and A. Strasser.** Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* (2002).**419**, 634-7.

- [125] **K. Wang, X. M. Yin, D. T. Chao, C. L. Milliman and S. J. Korsmeyer.** BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* (1996).**10**, 2859-69.
- [126] **J. M. Boyd, G. J. Gallo, B. Elangovan, A. B. Houghton, S. Malstrom, B. J. Avery, R. G. Ebb, T. Subramanian, T. Chittenden, R. J. Lutz and et al.** Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* (1995).**11**, 1921-8.
- [127] **L. O'Connor, A. Strasser, L. A. O'Reilly, G. Hausmann, J. M. Adams, S. Cory and D. C. S. Huang.** Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.* (1998).**17**, 384-395.
- [128] **E. Yang, J. Zha, J. Jockel, L. H. Boise, C. B. Thompson and S. J. Korsmeyer.** Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* (1995).**80**, 285-91.
- [129] **R. Hegde, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri and E. S. Alnemri.** Blk, a BH3-containing mouse protein that interacts with Bcl-2 and Bcl-xL, is a potent death agonist. *J Biol Chem* (1998).**273**, 7783-6.
- [130] **N. Inohara, L. Ding, S. Chen and G. Nunez.** harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *Embo J* (1997).**16**, 1686-94.
- [131] **H. Puthalakath and A. Strasser.** Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ* (2002).**9**, 505-12.
- [132] **T. Chittenden, E. A. Harrington, R. O'Connor, C. Flemington, R. J. Lutz, G. I. Evan and B. C. Guild.** Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* (1995).**374**, 733-6.
- [133] **Z. N. Oltvai, C. L. Milliman and S. J. Korsmeyer.** Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* (1993).**74**, 609-619.
- [134] **J. M. Rodriguez, M. A. Glozak, Y. Ma and W. D. Cress.** Bok, Bcl-2 related ovarian killer, is cell cycle regulated and sensitizes to stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* (2006).
- [135] **G. J. Griffiths, L. Dubrez, C. P. Morgan, N. A. Jones, J. Whitehouse, B. M. Corfe, C. Dive and J. A. Hickman.** Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* (1999).**144**, 903-14.
- [136] **K. M. Kozopas, T. Yang, H. L. Buchan, P. Zhou and R. W. Craig.** MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1993).**90**, 3516-20.
- [137] **L. H. Boise, M. Gonzalez Garcia, C. E. Postema, L. Ding, T. Lindsten, L. A. Turka, X. Mao, G. Nunez and C. B. Thompson.** Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* (1993).**74**, 597-608.
- [138] **L. Gibson, S. P. Holmgren, D. C. Huang, O. Bernard, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, G. R. Sutherland, E. Baker, J. M. Adams and S. Cory.** bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* (1996).**13**, 665-75.
- [139] **P. I. Chuang, E. Yee, A. Karsan, R. K. Winn and J. M. Harlan.** A1 is a constitutive and inducible Bcl-2 homologue in mature human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* (1998).**249**, 361-5.
- [140] **U. Fischer and K. Schulze-Osthoff.** New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev* (2005).**57**, 187-215.

- [141] **L. del Peso, M. Gonzalez Garcia, C. Page, R. Herrera and G. Nunez.** Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* (1997).**278**, 687-9.
- [142] **J. E. Springer, R. D. Azbill, S. A. Nottingham and S. E. Kennedy.** Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* (2000).**20**, 7246-51.
- [143] **S. Cory, D. C. Huang and J. M. Adams.** The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* (2003).**22**, 8590-607.
- [144] **C. D. Bortner and J. A. Cidlowski.** Cellular mechanisms for the repression of apoptosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2002).**42**, 259-81.
- [145] **D. R. Alessi, S. R. James, C. P. Downes, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese and P. Cohen.** Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* (1997).**7**, 261-9.
- [146] **R. C. Hresko and M. Mueckler.** mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* (2005).**280**, 40406-16.
- [147] **O. N. Ozes, L. D. Mayo, J. A. Gustin, S. R. Pfeffer, L. M. Pfeffer and D. B. Donner.** NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* (1999).**401**, 82-5.
- [148] **A. Brunet, A. Bonni, M. J. Zigmond, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis and M. E. Greenberg.** Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* (1999).**96**, 857-68.
- [149] **P. L. Dahia, R. C. Aguiar, J. Alberta, J. B. Kum, S. Caron, H. Sill, D. J. Marsh, J. Ritz, A. Freedman, C. Stiles and C. Eng.** PTEN is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies. *Hum Mol Genet* (1999).**8**, 185-93.
- [150] **G. Rena, A. R. Prescott, S. Guo, P. Cohen and T. G. Unterman.** Roles of the forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) phosphorylation sites in regulating 14-3-3 binding, transactivation and nuclear targeting. *Biochem J* (2001).**354**, 605-12.
- [151] **D. A. Linseman, R. A. Phelps, R. J. Bouchard, S. S. Le, T. A. Laessig, M. L. McClure and K. A. Heidenreich.** Insulin-like growth factor-I blocks Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim) induction and intrinsic death signaling in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* (2002).**22**, 9287-97.
- [152] **Q. L. Deveraux and J. C. Reed.** IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* (1999).**13**, 239-52.
- [153] **G. S. Salvesen and J. M. Abrams.** Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene* (2004).**23**, 2774-84.
- [154] **Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. S. Salvesen and J. C. Reed.** X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* (1997).**388**, 300-4.
- [155] **C. Du, M. Fang, Y. Li, L. Li and X. Wang.** Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* (2000).**102**, 33-42.
- [156] **S. M. Srinivasula, P. Datta, X. J. Fan, T. Fernandes Alnemri, Z. Huang and E. S. Alnemri.** Molecular Determinants of the Caspase-promoting Activity of Smac/DIABLO and Its Role in the Death Receptor Pathway. *J. Biol. Chem.* (2000).**275**, 36152-36157.
- [157] **G. van Loo, M. van Gurp, B. Depuydt, S. M. Srinivasula, I. Rodriguez, E. S. Alnemri, K. Gevaert, J. Vandekerckhove, W. Declercq and P. Vandenabeele.** The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ.* (2002).**9**, 20-6.

- [158] **L. P. Kane, V. S. Shapiro, D. Stokoe and A. Weiss.** Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* (1999).**9**, 601-4.
- [159] **H. Chong, H. G. Vikis and K. L. Guan.** Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* (2003).**15**, 463-9.
- [160] **K. Owada, N. Sanjo, T. Kobayashi, H. Mizusawa, H. Muramatsu, T. Muramatsu and M. Michikawa.** Midkine inhibits caspase-dependent apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase in cultured neurons. *J Neurochem* (1999).**73**, 2084-92.
- [161] **S. Matsuda, A. Minowa, S. Suzuki and S. Koyasu.** Differential activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 pathways during FTY720-induced apoptosis of T lymphocytes that is suppressed by the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Immunol* (1999).**162**, 3321-6.
- [162] **X. Wang, J. L. Martindale, Y. Liu and N. J. Holbrook.** The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J* (1998).**333 (Pt 2)**, 291-300.
- [163] **D. L. Persons, E. M. Yazlovitskaya, W. Cui and J. C. Pelling.** Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin. *Clin Cancer Res* (1999).**5**, 1007-14.
- [164] **H. Harada, B. Becknell, M. Wilm, M. Mann, L. J. Huang, S. S. Taylor, J. D. Scott and S. J. Korsmeyer.** Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell* (1999).**3**, 413-22.
- [165] **S. R. Datta, H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh and M. E. Greenberg.** Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* (1997).**91**, 231-41.
- [166] **S. R. Datta, A. Katsov, L. Hu, A. Petros, S. W. Fesik, M. B. Yaffe and M. E. Greenberg.** 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* (2000).**6**, 41-51.
- [167] **T. Ito, X. Deng, B. Carr and W. S. May.** Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J Biol Chem* (1997).**272**, 11671-3.
- [168] **R. M. Bell, Y. A. Hannun and C. R. Loomis.** Mechanism of regulation of protein kinase C by lipid second messengers. *Symp Fundam Cancer Res* (1986).**39**, 145-56.
- [169] **I. Gutcher, P. R. Webb and N. G. Anderson.** The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. *Cell Mol Life Sci* (2003).**60**, 1061-70.
- [170] **P. P. Ruvolo, X. Deng, B. K. Carr and W. S. May.** A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J. Biol. Chem.* (1998).**273**, 25436-42.
- [171] **G. C. Mayne and A. W. Murray.** Evidence that protein kinase Cepsilon mediates phorbol ester inhibition of calphostin C- and tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in U937 histiocytic lymphoma cells. *J Biol Chem* (1998).**273**, 24115-21.
- [172] **K. Hoegger, G. Partik, M. Schorkhuber and B. Marian.** Protein-kinase-C isoenzymes support DNA synthesis and cell survival in colorectal-tumor cells. *Int J Cancer* (1999).**83**, 650-6.
- [173] **S. Omura, S. Sasaki, Y. Iwai and H. Takeshima.** Staurosporine, a potentially important gift from a microorganism. *Journal of Antibiotics* (1977).**48**, 535-458.
- [174] **V. Baran, D. Fabian, P. Rehak and J. Koppel.** Nucleolus in apoptosis-induced mouse preimplantation embryos. *Zygote* (2003).**11**, 271-83.
- [175] **T. Tamaoki, H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto and F. Tomita.** Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* (1986).**135**, 397-402.

- [176] **S. T. Harkin, G. M. Cohen and A. Gescher.** Modulation of apoptosis in rat thymocytes by analogs of staurosporine: lack of direct association with inhibition of protein kinase C. *Mol Pharmacol* (1998).**54**, 663-70.
- [177] **Z. Han, P. Pantazis, T. S. Lange, J. H. Wyche and E. A. Hendrickson.** The staurosporine analog, Ro-31-8220, induces apoptosis independently of its ability to inhibit protein kinase C. *Cell Death Differ* (2000).**7**, 521-30.
- [178] **M. A. Fabian, W. H. Biggs, 3rd, D. K. Treiber, C. E. Atteridge, M. D. Azimioara, M. G. Benedetti, T. A. Carter, P. Ciceri, P. T. Edeen, M. Floyd, J. M. Ford, M. Galvin, J. L. Gerlach, R. M. Grotzfeld, S. Herrgard, D. E. Insko, M. A. Insko, A. G. Lai, J. M. Lelias, S. A. Mehta, Z. V. Milanov, A. M. Velasco, L. M. Wodicka, H. K. Patel, P. P. Zarrinkar and D. J. Lockhart.** A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat Biotechnol* (2005).**23**, 329-36.
- [179] **O. D. Perez, S. Kinoshita, Y. Hitoshi, D. G. Payan, T. Kitamura, G. P. Nolan and J. B. Lorens.** Activation of the PKB/AKT pathway by ICAM-2. *Immunity* (2002).**16**, 51-65.
- [180] **M. M. Hill, M. Andjelkovic, D. P. Brazil, S. Ferrari, D. Fabbro and B. A. Hemmings.** Insulin-stimulated protein kinase B phosphorylation on Ser-473 is independent of its activity and occurs through a staurosporine-insensitive kinase. *J. Biol. Chem.* (2001).**276**, 25643-6.
- [181] **X. D. Zhang, S. K. Gillespie and P. Hersey.** Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol Cancer Ther* (2004).**3**, 187-97.
- [182] **M. A. Fabian, W. H. Biggs, D. K. Treiber, P. P. Zarrinkar and D. J. Lockhart.** Response to Molecule-kinase interaction map. *Nat Biotechnol* (2005).**23**, 1346-8.
- [183] **I. H. Engels, A. Stepczynska, C. Stroh, K. Lauber, C. Berg, R. Schwenzer, H. Wajant, R. U. Janicke, A. G. Porter, C. Belka, M. Gregor, K. Schulze Osthoff and S. Wesselborg.** Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene* (2000).**19**, 4563-73.
- [184] **A. Stepczynska, K. Lauber, I. H. Engels, O. Janssen, D. Kabelitz, S. Wesselborg and K. Schulze-Osthoff.** Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation. *Oncogene* (2001).**20**, 1193-202.
- [185] **S. Wesselborg, I. H. Engels, E. Rossmann, M. Los and K. Schulze-Osthoff.** Anticancer drugs induce caspas-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction. *Blood* (1999).**93**, 3053-3063.
- [186] **R. Ren.** Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* (2005).**5**, 172-83.
- [187] **N. Normanno, A. De Luca, C. Bianco, L. Strizzi, M. Mancino, M. R. Maiello, A. Carotenuto, G. De Feo, F. Caponigro and D. S. Salomon.** Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* (2006).**366**, 2-16.
- [188] **J. P. David, D. Mehic, L. Bakiri, A. F. Schilling, V. Mandic, M. Priemel, M. H. Idarraga, M. O. Reschke, O. Hoffmann, M. Amling and E. F. Wagner.** Essential role of RSK2 in c-Fos-dependent osteosarcoma development. *J Clin Invest* (2005).**115**, 664-72.
- [189] **J. G. Shelton, P. W. Moye, L. S. Steelman, W. L. Blalock, J. T. Lee, R. A. Franklin, M. McMahan and J. A. McCubrey.** Differential effects of kinase cascade inhibitors on neoplastic and cytokine-mediated cell proliferation. *Leukemia* (2003).**17**, 1765-82.
- [190] **J. Dancey and E. A. Sausville.** Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov* (2003).**2**, 296-313.

- [191] **P. Cohen and M. Goedert.** GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* (2004).**3**, 479-87.
- [192] **P. Cohen and A. Knebel.** KESTREL: a powerful method for identifying the physiological substrates of protein kinases. *Biochem J* (2006).**393**, 1-6.
- [193] **I. Nicoletti, G. Migliorati, M. C. Pagliacci, F. Grignani and C. Riccardi.** A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* (1991).**139**, 271-9.
- [194] **I. Vermes, C. Haanen, H. Steffens-Nakken and C. Reutelingsperger.** A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* (1995).**184**, 39-51.
- [195] **K. Heeg, J. Reimann, D. Kabelitz, C. Hardt and H. Wagner.** A rapid colorimetric assay for the determination of IL-2-producing helper T cell frequencies. *J Immunol Methods* (1985).**77**, 237-46.
- [196] **M. M. Bradford.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* (1976).**72**, 248-54.
- [197] **U. K. Laemmli.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970).**227**, 680-5.
- [198] **T. Rabilloud, G. Carpentier and P. Tarroux.** Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* (1988).**9**, 288-91.
- [199] **A. Samali, J. Cai, B. Zhivotovsky, D. P. Jones and S. Orrenius.** Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *Embo J* (1999).**18**, 2040-8.
- [200] **D. N. Perkins, D. J. Pappin, D. M. Creasy and J. S. Cottrell.** Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* (1999).**20**, 3551-67.
- [201] **M. Inaba, H. Kobayashi, Y. Sakurai and R. K. Johnson.** Active efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of P388 leukemia. *Cancer Res* (1979).**39**, 2200-3.
- [202] **M. G. Annis, N. Zamzami, W. Zhu, L. Z. Penn, G. Kroemer, B. Leber and D. W. Andrews.** Endoplasmic reticulum localized Bcl-2 prevents apoptosis when redistribution of cytochrome c is a late event. *Oncogene* (2001).**20**, 1939-52.
- [203] **J. Rudner, A. Lepple-Wienhues, W. Budach, J. Berschauer, B. Friedrich, S. Wesselborg, K. Schulze-Osthoff and C. Belka.** Wild-type, mitochondrial and ER-restricted Bcl-2 inhibit DNA damage-induced apoptosis but do not affect death receptor-induced apoptosis. *J Cell Sci* (2001).**114**, 4161-72.
- [204] **R. V. Rao, H. M. Ellerby and D. E. Bredesen.** Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* (2004).**11**, 372-80.
- [205] **A. Villunger, E. M. Michalak, L. Coultas, F. Mullauer, G. Bock, M. J. Ausserlechner, J. M. Adams and A. Strasser.** p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* (2003).**302**, 1036-8.
- [206] **A. Gross, J. M. McDonnell and S. J. Korsmeyer.** BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* (1999).**13**, 1899-911.
- [207] **J. M. Adams and S. Cory.** The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* (1998).**281**, 1322-6.
- [208] **B. C. Baliga and S. Kumar.** Role of Bcl-2 family of proteins in malignancy. *Hematol Oncol* (2002).**20**, 63-74.

- [209] **M. C. Wei, W. X. Zong, E. H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A. J. Ross, K. A. Roth, G. R. MacGregor, C. B. Thompson and S. J. Korsmeyer.** Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* (2001).**292**, 727-30.
- [210] **P. Bouillet and A. Strasser.** Bax and Bak: back-bone of T cell death. *Nat Immunol* (2002).**3**, 893-4.
- [211] **E. A. Slee, S. A. Keogh and S. J. Martin.** Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release. *Cell Death Differ* (2000).**7**, 556-65.
- [212] **A. Strasser, H. Puthalakath, P. Bouillet, D. C. Huang, L. O'Connor, L. A. O'Reilly, L. Cullen, S. Cory and J. M. Adams.** The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control. *Ann N Y Acad Sci* (2000).**917**, 541-8.
- [213] **L. M. Loew, R. A. Tuft, W. Carrington and F. S. Fay.** Imaging in five dimensions: time-dependent membrane potentials in individual mitochondria. *Biophys J* (1993).**65**, 2396-407.
- [214] **J. C. Goldstein, N. J. Waterhouse, P. Juin, G. I. Evan and D. R. Green.** The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* (2000).**2**, 156-62.
- [215] **P. Li, D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri and X. Wang.** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* (1997).**91**, 479-89.
- [216] **A. Saleh, S. M. Srinivasula, S. Acharya, R. Fishel and E. S. Alnemri.** Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem* (1999).**274**, 17941-5.
- [217] **X. Luo, I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter and X. Wang.** Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* (1998).**94**, 481-490.
- [218] **R. M. Kluck, E. Bossy Wetzels, D. R. Green and D. D. Newmeyer.** The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* (1997).**275**, 1132-1136.
- [219] **S. Matsuyama and J. C. Reed.** Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation. *Cell Death Differ* (2000).**7**, 1155-65.
- [220] **E. N. Shiozaki, J. Chai and Y. Shi.** Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002).**99**, 4197-202.
- [221] **J. Rodriguez and Y. Lazebnik.** Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* (1999).**13**, 3179-84.
- [222] **G. J. Todaro and H. Green.** Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* (1963).**17**, 299-313.
- [223] **M. S. Soengas, P. Capodici, D. Polsky, J. Mora, M. Esteller, X. Opitz-Araya, R. McCombie, J. G. Herman, W. L. Gerald, Y. A. Lazebnik, C. Cordon-Cardo and S. W. Lowe.** Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* (2001).**409**, 207-11.
- [224] **N. J. Waterhouse, J. C. Goldstein, O. von Ahsen, M. Schuler, D. D. Newmeyer and D. R. Green.** Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J Cell Biol* (2001).**153**, 319-28.

- [225] **K. Lauber, H. A. Appel, S. F. Schlosser, M. Gregor, K. Schulze-Osthoff and S. Wesselborg.** The adapter protein apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) is proteolytically processed during apoptosis. *J Biol Chem* (2001).**276**, 29772-81.
- [226] **X. Roucou, B. Antonsson and J. C. Martinou.** Involvement of mitochondria in apoptosis. *Cardiol Clin* (2001).**19**, 45-55.
- [227] **C. A. Belmokhtar, J. Hillion and E. Segal-Bendirdjian.** Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene* (2001).**20**, 3354-62.
- [228] **Q. Yin, H. H. Park, J. Y. Chung, S. C. Lin, Y. C. Lo, L. S. da Graca, X. Jiang and H. Wu.** Caspase-9 holoenzyme is a specific and optimal procaspase-3 processing machine. *Mol Cell* (2006).**22**, 259-68.
- [229] **M. Hetman, S. L. Hsuan, A. Habas, M. J. Higgins and Z. Xia.** ERK1/2 antagonizes glycogen synthase kinase-3 β -induced apoptosis in cortical neurons. *J Biol Chem* (2002).**277**, 49577-84.
- [230] **K. Thiam, E. Loing, D. Zoukhri, C. Rommens, R. Hodges, D. Dartt, C. Verwaerde, C. Auriault, H. Gras Masse and C. Sergheraert.** Direct evidence of cytoplasmic delivery of PKC- α , - ϵ and - ζ pseudosubstrate lipopeptides: study of their implication in the induction of apoptosis. *FEBS Lett* (1999).**459**, 285-90.
- [231] **F. Shibasaki and F. McKeon.** Calcineurin functions in Ca(2+)-activated cell death in mammalian cells. *J Cell Biol* (1995).**131**, 735-43.
- [232] **H. G. Wang, N. Pathan, I. M. Ethell, S. Krajewski, Y. Yamaguchi, F. Shibasaki, F. McKeon, T. Bobo, T. F. Franke and J. C. Reed.** Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* (1999).**284**, 339-43.
- [233] **A. Khwaja.** Akt is more than just a Bad kinase. *Nature* (1999).**401**, 33-4.
- [234] **A. P. Kozikowski, H. Sun, J. Brognard and P. A. Dennis.** Novel PI analogues selectively block activation of the pro-survival serine/threonine kinase Akt. *J Am Chem Soc* (2003).**125**, 1144-5.
- [235] **D. Tang, H. Okada, J. Ruland, L. Liu, V. Stambolic, T. W. Mak and A. J. Ingram.** Akt is activated in response to an apoptotic signal. *J Biol Chem* (2001).**276**, 30461-6.
- [236] **G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter and S. Sudarsanam.** The protein kinase complement of the human genome. *Science* (2002).**298**, 1912-34.
- [237] **C. Peifer, T. Stoiber, E. Unger, F. Totzke, C. Schachtele, D. Marme, R. Brenk, G. Klebe, D. Schollmeyer and G. Dannhardt.** Design, synthesis, and biological evaluation of 3,4-diarylmaleimides as angiogenesis inhibitors. *J Med Chem* (2006).**49**, 1271-81.
- [238] **S. A. Laufer, D. M. Domeyer, T. R. Scior, W. Albrecht and D. R. Hauser.** Synthesis and biological testing of purine derivatives as potential ATP-competitive kinase inhibitors. *J Med Chem* (2005).**48**, 710-22.
- [239] **P. Baumeister, S. Luo, W. C. Skarnes, G. Sui, E. Seto, Y. Shi and A. S. Lee.** Endoplasmic reticulum stress induction of the Grp78/BiP promoter: activating mechanisms mediated by YY1 and its interactive chromatin modifiers. *Mol Cell Biol* (2005).**25**, 4529-40.
- [240] **I. Nilsson and I. Hoffmann.** Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res* (2000).**4**, 107-14.
- [241] **H. M. Beere, B. B. Wolf, K. Cain, D. D. Mosser, A. Mahboubi, T. Kuwana, P. Taylor, R. I. Morimoto, G. M. Cohen and D. R. Green.** Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* (2000).**2**, 469-75.

- [242] **D. D. Mosser, A. W. Caron, L. Bourget, A. B. Meriin, M. Y. Sherman, R. I. Morimoto and B. Massie.** The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* (2000).**20**, 7146-59.
- [243] **H. Wang, Z. Q. Huang, L. Xia, Q. Feng, H. Erdjument-Bromage, B. D. Strahl, S. D. Briggs, C. D. Allis, J. Wong, P. Tempst and Y. Zhang.** Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* (2001).**293**, 853-7.

LISTE DER AKADEMISCHEN LEHRER

Prof. H. G. Andresen, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Prof. W. Back, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Prof. O. Bäßler, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Dr. A. Braun, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Prof. G. Dannhardt, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Prof. G. Gattow, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Dr. M. Grubert, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

PhR N. Heilman, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Prof. N. Kaffrell, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Prof. R. Kirste, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Prof. S. Laufer, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Prof. M. Loos, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Prof. F. Moll, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Prof. W. Müller-Klieser, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Prof. F. Oesch, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Prof. U. Pindur, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Dr. K. Sattler, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Prof. G. Schönhense, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Prof. J. Stöckigt, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Prof. K. Unger, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Prof. S. Wesselborg, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Joachim Manns
Kirchgasse 2
72070 Tübingen

* 18. Februar 1970, in Würselen/Aachen
ledig

SCHULBILDUNG

1976–1980 Grundschule Kastellaun
1980–1989 Herzog-Johann-Gymnasium, Simmern (Hunsrück)
05.1989 Abitur (Allgemeine Hochschulreife).

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

10.1990 - 05.1991 Chemie-Studium an der Johann-Gutenberg-Universität, Mainz.
04.1991 - 10.1995 Pharmazie-Studium an der Johann-Gutenberg-Universität, Mainz.
02.2002 – 06.2006 Dissertation mit dem Thema:
 „Identifizierung eines neuen Apoptosesignalweges in chemotherapeu-
 tikaresistenten Tumorzellen — Molekulare Wirkungsweise des
 Proteinkinaseinhibitors Staurosporin in der Aktivierung des endogenen
 programmierten Selbstmordprogrammes“
 Anfertigung in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sebastian Wesselborg
 (Universitätsklinik Tübingen) unter externer Betreuung durch Prof. Dr.
 Stefan Laufer (Pharmazeutisches Institut, Tübingen).

WEITERBILDUNG

06.1999 – 06.2001 Weiterbildung zum Fachapotheker für Offizinpharmazie.