

**Regulierung von Mcl-1 in Tumorzellen: Bedeutung für
die Strahlenresistenz**

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

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

**vorgelegt von
Trivigno-Calcagno, Donatella
geb. Trivigno**

2015

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. S. Huber

2. Berichterstatter:

Professor Dr. T. Schäffer

3. Berichterstatter:

Professor Dr. K. Lauber

Meiner Familie gewidmet

1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsverzeichnis.....	IV
2.	Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
2.1	Einheiten.....	VIII
2.2	Weitere Abkürzungen.....	VIII
3.	Einleitung.....	12
3.1	Einführung.....	12
3.2	Zelltodmechanismen nach Bestrahlung.....	13
3.3	Geschichte der Apoptose.....	15
3.4	Kennzeichen der Apoptose.....	17
3.5	Caspasen.....	18
3.6	Der intrinsische Signalweg der Apoptose.....	20
3.7	Die Bcl-2 Proteinruppe.....	21
3.7.1	Mitglieder und struktureller Aufbau der Bcl-2 Proteingruppe.....	21
3.7.1.1.	Strukturelle Einteilung der anti-apoptotischen Untergruppe.....	21
3.7.1.2.	Strukturelle Einteilung der pro-apoptotischen Untergruppe.....	22
3.7.2	Rolle der Bcl-2-Proteingruppe am Mitochondrium.....	23
3.7.3	Aktivierungsmodelle der Proteine Bax und Bak.....	25
3.8	Kenntnisstand der Forschung zu Mcl-1.....	28
3.8.1	Bedeutung des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 für die Apoptose.....	28
3.8.2	Regulierung der Expression des Mcl-1 Proteins.....	30
3.8.2.1.	Transkriptionelle Regulierung von Mcl-1.....	30
3.8.2.2.	Translationelle Regulierung von Mcl-1.....	31
3.8.3	Posttranslationelle Modifizierung des Proteins Mcl-1.....	36
3.9	Fragestellung.....	39
4.	Material.....	41
4.1	Chemikalien.....	41
4.2	Spezielle Medien und Reagenzien.....	42
4.2.1	Medien für die Zellkultur.....	42
4.2.2	Puffer und Lösungen.....	43
4.3	Antikörper.....	45

4.3.1	Antikörper zur Western-Blot-Analyse.....	45
4.3.1.1	Primärantikörper	45
4.3.1.2	Sekundärantikörper.....	46
4.4	Inhibitoren	46
4.5	siRNA für die Tansfektion	47
4.6	Verbrauchsmaterial.....	47
4.7	Geräte	47
4.8	Zelllinien.....	48
5.	Methoden	49
5.1	Zellkultur	49
5.1.1	Kultivierung von Zellen	49
5.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	49
5.1.3	Zellzahlbestimmung.....	49
5.2	Transfektion von Zellen.....	50
5.3	Stimulierung der Zellen	50
5.4	Bestimmung der Apoptose.....	50
5.4.1	Durchflusszytometrie/ FACS (F luorescence A ctivated C ell S orter)	50
5.4.1.1	Quantifizierung der DNA- Fragmentierung.....	51
5.4.1.2	Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$)	52
5.5	Western-Blot zum Nachweis der Proteinexpression	53
5.5.1	Herstellung von Lysaten	54
5.5.2	Proteinbestimmung.....	54
5.5.3	Probenvorbereitung.....	55
5.5.4	SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) ...	55
5.4.1	Zusammensetzung der Gele:	55
5.5.5	Detektion der Proteine.....	56
5.5.6	Densitometrie	57
5.7	Datenanalyse	57
6.	Ergebnisse	58
6.1	Apoptose in Jurkat- Zellen	58
6.1.1	Ionisierende Strahlung induziert den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, DNA–Degradierung und Caspasenaktivierung in Jurkat- Zellen.....	58
6.1.2	Einfluss ionisierender Strahlung auf Jurkat- Zellen	60

6.1.3 Mcl-1 wird in sensitiven Zellen nach Bestrahlung herunterreguliert und ist essentiell für das Überleben von Jurkat-Zellen.....	63
6.2 Regulierung von Mcl-1	65
6.2.1 Regulierung der Translation von Mcl-1 nach Bestrahlung	65
6.2.1.1 Bestrahlung führt zu einer caspaseabhängigen Prozessierung von eIF4G1, eIF4B und eIF3A, wobei Mcl-1 caspaseunabhängig reguliert wird	65
6.2.1.2 Die Prozessierung von DAP5 findet caspaseabhängig statt.....	68
6.2.1.3 eIF4B hat keinen Einfluss auf die Regulierung des Mcl-1-Levels nach Bestrahlung.....	70
6.2.1.4 Die Abnahme des Mcl-1-Levels nach Bestrahlung ist unabhängig vom Akt/mTOR- Signalweg	72
6.2.1.5 Die Dephosphorylierung von 4EBP1 nach Bestrahlung ist nicht verantwortlich für die gleichzeitige Abnahme des Mcl-1-Levels.....	74
6.3 Einfluss von Proteinen der Bcl-2-Proteingruppe auf Vitalität von Jurkat-Zellen.....	76
6.3.1 Level pro- und anti-apoptotischer Proteine in strahlensensitiven und – resistenten Jurkat- Zellen vor und nach Bestrahlung.....	76
6.3.2 Herunterregulierung von Bim, Puma und Noxa haben keinen Einfluss auf das Mcl-1-Level	77
6.4 Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Degradierung von Mcl-1.....	79
6.4.1 GSK-3 β hat keinen Einfluss auf Mcl-1-Stabilität und Apoptose	79
6.4.2 Ubiquitinierung von Mcl-1	83
6.4.3 Herunterregulierung von USP9X führt zu strahlungsinduziertem Abbau von Mcl-1 und zu Apoptose	84
6.5 Radioresistenz in K562-Zellen ist ebenfalls abhängig von USP9X.....	88
6.5.1 Apoptose in K562-Zellen.....	88
6.5.2 Herunterregulierung von USP9X sensitiviert K562-Zellen gegenüber ionisierender Strahlung.....	89
7. Diskussion.....	92
7.1 Resistenz in Jurkat T-Lymphomzellen geschieht durch verminderte Herunterregulierung von Mcl-1 nach Bestrahlung.....	92
7.2 Mcl-1-Abbau nach Bestrahlung wird nicht durch Herunterregulierung der Protein-Translation verursacht.....	93
7.2.1 Ionisierende Strahlung bewirkt eine Hemmung der Protein-Translation...	93

7.2.2 Die Regulierung der Cap-abhängigen Translation geschieht durch caspasenunabhängige Mechanismen	95
7.2.3 Die strahlungsabhängige Reduktion des Mcl-1-Levels wird weder Cap-/eIF4G1- noch IRES/DAP5-abhängig reguliert	96
7.3 Einfluss der BH3-only-Proteine auf die Mcl-1-Stabilität.....	97
7.4 Regulierung von Mcl-1 durch Ubiquitinligasen und Deubiquitinasen	98
7.4.1 Regulierung der Mcl-1-Stabilität durch Ubiquitinligasen	98
7.4.2 USP9X wird nach Bestrahlung aktiviert und stabilisiert Mcl-1	100
7.4 Zusammenfassung und Fazit.....	102
8. Ausblick	105
9. Literaturverzeichnis	106
10. Erklärungen zum Eigenanteil	119
11. Kongressbeiträge und publizierte Abstracts.....	119
12. Veröffentlichungen.....	120
13. Danksagung.....	121

2. Abkürzungsverzeichnis

2.1 Einheiten

°C	Grad Celsius
µl	Microliter
A	Ampere
Gy	Gray
h	Stunden
l	Liter
min	Minuten
ml	Milliliter
nM	Nanomolar
µM	Micromol
kD	Kilodalton
cm	Zentimeter
ms	Millisekunde

2.2 Weitere Abkürzungen

4E-BP1	Eukaryotic Binding Protein 1
Abb.	Abbildung
ANT	Adenine Nucleotide Translocator
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-x _L / Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated x-protein
Bcl-2	B-cell- lymphoma 2
B-CLL	B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia, <i>Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp</i>

Bcl-x _L	Bcl- x long, <i>lange Splicevariante des Bcl-x-Gens</i>
Bcl-x _S	Bcl-x short, <i>kurze Splicevariante des Bcl-x-Gens</i>
BH 1-4	Bcl-2 Homology Domain 1-4
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bim _{S, L, XL}	Bim short, long, extra long, <i>verschiedene Splicevarianten des Bim-Gens</i>
Blk	Bik like killer protein
Bod	Bcl-2 related ovarian death gene (<i>auch Bim genannt</i>)
Bok	Bcl-2 related ovarian killer
BSA	Bovines Serum- Albumin
ca.	circa
CAD	Caspase Activated DNase
CARD	Caspase Recruitment Domain
Caspasen	Cysteiny- aspartate specific protease, <i>Cystein-Aspartat spezifische Proteasen</i>
Ced-3,9	Caenorhabditis elegans death gene-3,9
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAP5	Death Associated Protein-5, <i>Tod-assoziiertes Protein-5</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DD	Death Domain, <i>Todesdomäne</i>
DED	Death Effector Domain, <i>Todeseffektordomäne</i>
DNA	Deoxyribonucleic Acid, <i>Desoxyribonukleinsäure</i>
DR	Death Receptor, <i>Todesrezeptor</i>
ECL	Enhanced chemoilluminescence, <i>verstärkte Chemoillumineszenz</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
Egl-1	Egg laying defective gene-1
eIF	eukaryotic translation Initiation Factor
ERK	Extracellular-Signal Regulated Kinase
FADD	Fas Associated Protein with Death Domain
FCS	Fetal Calf Serum, <i>Fötales bovines Serum</i>

FSC	Forward Scatter, <i>Vorwärtsstreulicht</i>
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GSK-3 β	Glykogen-Synthase-Kinase-3 β
GTP	Guanosintriphosphat
HECT	Homologous to the E6-AP Carboxyl-Terminus (<i>E6-AP ist eine Ubiquitin-Ligase</i>)
hIAP	Human Inhibitor of Apoptosis
Hrk	A product of Harakiri (<i>auch DP5 genannt</i>)
HRP	Horse Raddish Peroxidase, <i>Meerrettichperoxidase</i>
IAP	Inhibitor of Apoptosis, <i>Inhibitor der Apoptose</i>
IL	Interleukin
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
JAK	Janus Kinase, <i>Janus-Kinase</i>
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase, mitogen aktivierte Proteinkinase
Mcl-1L	Mcl-1 long, <i>lange Splicevariante des Mcl-1-Gens</i>
Mcl-1	Myleoid cell leukemia sequence-1
Mcl-1S/ Δ TM	Mcl-1 short, <i>kurze Splicevariante des Mcl-1-Gens</i>
mRNA	messenger RNA
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
mTORC 1/2	mTOR-Complex 1/2
Mule	Mcl-1 ubiquitin ligase E3
n.s.	nicht signifikant
nt	non targeting
PABP	Poly(A-)Binding Protein
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Propidium Iodide, <i>Propidiumjodid</i>
PI3-K	Phosphatidylinositol 3-kinase, <i>Phosphoinositid 3-Kinase</i>
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, <i>Phosphoinositid (3,4,5)-Trisphosphat</i>
PKB	Protein Kinase B, <i>Proteinkinase B</i>

PT	Permeability Transition
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
Puma	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonucleic Acid, <i>Ribonukleinsäure</i>
ROS	Reactive Oxygen Species, <i>reaktive Sauerstoffspezies</i>
RT	Radiotherapie
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, <i>Natriumdodecylsulfat</i>
siRNA	small interfering RNA, <i>kurze interferierende Ribonukleinsäuremoleküle</i>
sog.	sogenannt
SSC	Sideward Scatter, <i>Seitwärtsstreulicht</i>
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
tBid	truncated Bid, <i>Spaltprodukt von Bid</i>
TBS	TRIS Buffered Saline
TM	Transmembrane, <i>Transmembran</i>
TNF	Tumor Necrosis Factor, <i>Tumornekrosefaktor</i>
TPA	12-0-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
t-RNA	transfer-RNA, <i>Transfer-RNA</i>
USP9X	Ubiquitin Specific Peptidase 9 X-linked
UV	Ultraviolett
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel, <i>spannungsabhängiger Anionenkanal</i>
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor, <i>vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor</i>
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis
ZVAD-fmk	Benzyloxy-Valin-Alanin-Aspartat-O-methylfluoromethylketon
β -TrCP	Beta-Transducin repeat Containing Protein
$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Transmembranpotential

3. Einleitung

3.1 Einführung

Krebs ist nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Jeder zweite Mann und nahezu jede zweite Frau müssen damit rechnen, im Laufe ihres Lebens an Krebs zu erkranken. Ein Grund dafür ist die sich verändernde Altersstruktur unserer Gesellschaft. Diese ist auch in der Medizin ein großes Thema geworden. Aufgrund des demographischen Wandels innerhalb der Gesellschaft wurde zwischen 1980 und 2006 in Deutschland ein deutlicher Anstieg der Erkrankungsfälle durch Krebs verzeichnet (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.). Seit 1999 zeigten sich jedoch für Männer und Frauen abnehmende Sterberaten bei nahezu gleichbleibender Erkrankungsrate bei den Männern und sinkender Erkrankungsrate bei den Frauen. Die sinkende Erkrankungsrate bei Frauen ist am ehesten durch das Mammographie-Screening-Programm zur Brustkrebsprävention bedingt (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.) und zeigt, dass sich die Diagnostik von Krebserkrankungen ständig weiterentwickelt. Die abnehmende Sterberate bei beiden Geschlechtern kann unter anderem durch die sich ständig verbessernde Therapie von Krebserkrankungen erklärt werden.

Die drei Hauptkomponenten der onkologischen Therapie sind die Chirurgie, die Chemo- und die Strahlentherapie, auch Radiotherapie genannt. Während die Chemotherapie eine systemische Therapieoption darstellt, dienen die Chirurgie und Radiotherapie der lokalen Kontrolle des Tumorwachstums. Die Entscheidung über die Therapiemethode für den jeweiligen Patienten wird individuell getroffen und hängt unter anderem davon ab, um welche Tumorentität es sich handelt. Die Strahlentherapie kann neoadjuvant mit dem Ziel des sogenannten „Downstaging“, also zur Verkleinerung eines Tumors vor chirurgischen Eingriffen, eingesetzt werden, aber auch adjuvant in fraktionierten Dosen zur Vernichtung verbliebener Tumorzellen nach einer operativen Versorgung des Tumors. Sie findet auch als sogenannte „Radiochemotherapie“

in Kombination mit der systemischen zytotoxischen Therapie Anwendung. Ungefähr 50 % der Tumorpatienten erhalten in kurativer oder palliativer Absicht eine Form von Radiotherapie, z.B. als externe Anwendung oder intern als Brachytherapie (Bamberg, 2004; Delaney et al., 2005; Begg et al., 2011), so dass eine große Anzahl an Patienten von den ständigen Verbesserungen durch die Forschung profitieren kann.

3.2 Zelltodmechanismen nach Bestrahlung

Ziel der Strahlentherapie ist die lokale Tumorkontrolle durch Vernichtung klonogener Tumorzellen. Bestrahlung kann auf verschiedenen Wegen zum klonogenen Zelltod führen. Man unterscheidet im Wesentlichen die Apoptose von den nicht-apoptotischen Zelltodmechanismen, wobei diese nicht streng als isolierte Vorgänge gesehen werden können, da es zu Überschneidungen zwischen den verschiedenen Prozessen kommen kann. Nicht-apoptotische Zelltodmechanismen sind die Nekrose, die Seneszenz, der Autophagie-assoziierte Zelltod und die mitotische Katastrophe.

In der Strahlentherapie trägt die Apoptose zur frühen Toxizität in Krebszellen bei. Letztere korreliert mit einer hohen Therapieantwort (Untch & von Minckwitz, 2011). **Apoptose** (Kerr et al., 1972) bezeichnet den Vorgang des natürlichen und physiologischen Zelltods in der Zelle. Sie wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet. Hierbei handelt es sich um einen aktiven, ATP-abhängigen, genetisch codierten Suizid der Zelle. Dabei reagieren eukaryontische Zellen höherer Organismen auf exo- oder endogene Reize, wie z.B. ionisierender Strahlung oder Wachstumsfaktorenentzug mit Degradations- und Absterbeprogrammen sowie typischen morphologischen Veränderungen (siehe 3.4). Der programmierte Zelltod ist ein nicht inflammatorischer Prozess (Schultz et al., 2003), der für die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase, für die Embryonalentwicklung und für immunologische Prozesse von großer Bedeutung ist. Hierbei handelt es sich um einen sehr komplizierten Prozess, der durch verschiedene Faktoren reguliert wird. Eine Gruppe von Proteinen, die die Apoptose beeinflussen, ist die Bcl-2-Proteingruppe (siehe 3.7). Diese Proteine können entweder pro- oder anti-apoptotisch wirken (Kim et al., 2006a; van Delft & Huang, 2006a; Adams & Cory, 2007a).

Die Apoptose unterscheidet sich von der **Nekrose**. Diese wird definiert als ein pathologischer Prozess, bei dem es nach einem für die Zelle schädlichen Impuls (z.B. ionisierende Strahlung) zu einer Schwellung der Organellen und der gesamten Zelle kommt. Daraufhin folgen der Verlust der Zellmembranintegrität und die Freisetzung von Zellinhalten in die Zellperipherie. Diese Freisetzung wiederum löst, im Gegensatz zur Apoptose, eine lokale inflammatorische Reaktion des Gewebes aus (Trump et al., 1965; Duprez et al., 2009).

Ein weiterer Zelltodmechanismus ist der **Autophagozytose**-vermittelte Zelltod, auch Autophagie-assoziiertes Zelltod genannt. Bei der Autophagozytose handelt es sich um einen Mechanismus in der Zelle, bei dem zelleigene Bestandteile (z.B. Organellen, fehlgefaltete Proteine) durch zelleigene Membranen (Autophagosomen) eingeschlossen und abgebaut werden (Seglen & Bohley, 1992). Später fusioniert das Autophagosom mit einem Lysosom, einem mit abbauenden Enzymen gefüllten Vesikel (Seglen, 1990). Klar davon zu differenzieren, ist der ähnliche Vorgang der Phagozytose, bei der es durch einen Einstülpungsvorgang der Zellmembran zum Abbauvorgang von zellfremden Partikeln kommt. Es ist bekannt, dass Autophagozytose die Tumorentwicklung und -progression beeinflussen kann (Chen & Karantza-Wadsworth, 2009). Auf der einen Seite scheint die Autophagozytose Tumorzellen vor Stressfaktoren wie Hypoxie zu schützen, auf der anderen Seite können Defekte im Autophagiemechanismus zu Krebs führen (Tian et al., 2010). Es bestehen verschiedene Verbindungen zwischen Apoptose und der Autophagozytose (Festjens et al., 2006). Anti-apoptotische Proteine der Bcl-2 Proteingruppe (siehe 3.7) können z.B. mit dem autophagozytotischen Schlüsselprotein Beclin-1 interagieren und somit die Autophagozytose verhindern (Pattingre et al., 2005).

Ähnlich wie die Apoptose stellt die **Seneszenz** der Zelle ein Schutzmechanismus des Organismus gegenüber unkontrollierter Zellvermehrung dar. Die Seneszenz ist ein Prozess, bei dem die Zellen unter bestimmten Voraussetzungen ihr Wachstum einstellen. Man unterscheidet die replikative Seneszenz von der stressinduzierten, frühzeitigen Seneszenz

(Bischof et al., 2009). Bei der replikativen Seneszenz wird die Teilungskapazität der Zelle durch sogenannte Telomere beschränkt. Telomere sind repetitive DNA-Sequenzen, die sich am Ende jedes Chromosoms befinden und sich bei jeder Zellteilung verkürzen. Werden die Telomere zu kurz, so bleiben weitere Zellteilungen aus. Bei der stressinduzierten Seneszenz können Zellen auch nach nicht übermäßigen Zellteilungen ihre Teilungsfähigkeit verlieren. Ursache hierfür können Noxen oder Unregelmäßigkeiten in verschiedenen Zellsignalwegen sein. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass Zellen in der Seneszenz, trotz ihrer tumorsuppressiven Kapazitäten, unter bestimmten Bedingungen die Fähigkeit erlangen können, neoplastische Zellen zu produzieren und neue Tumoren zu bilden (Bischof et al., 2009).

Zusätzlich stellt die sogenannte **mitotische Katastrophe** ein Zelltodmechanismus nach Behandlung mit ionisierender Strahlung und DNA-schädigenden Agenzien dar. DNA-Schäden, wie z.B. Doppelstrangbrüche innerhalb der DNA aufgrund von Bestrahlung, führen an verschiedenen Kontrollpunkten im Zellzyklus normalerweise zu der Einleitung einer DNA-Reparatur und einem Zellzyklusarrest. Fallen diese Mechanismen aus und die Zelle tritt trotz defekter DNA verfrüht in die Mitose ein, so kommt es zum Zelltod aufgrund mitotischer Katastrophe (Castedo et al., 2004). Die mitotische Katastrophe kann somit als eine Art von Zelltod definiert werden, bei der es durch eine Kombination aus DNA-Schäden und Ausfall verschiedener Kontrollpunkte im Zellzyklus zum Tod der Zelle während oder nach der Mitose kommt. Es gibt Hinweise darauf, dass die mitotische Katastrophe eine Vorstufe des Zelltods durch Apoptose oder Nekrose sein kann (Vakifahmetoglu et al., 2008).

Da in dieser Arbeit apoptotische Merkmale untersucht werden, soll in folgenden Abschnitten der Zelltodmechanismus Apoptose näher beschrieben werden.

3.3 Geschichte der Apoptose

Die Evolution und Erforschung von Zelltod und Apoptose reicht von der Antike bis zur Gegenwart (Diamantis et al., 2008). Der Begriff Apoptose fand bereits Erwähnung in den Texten von **Hippokrates** (André, 2003). Auch wenn es schon seit der Antike mehrere Hinweise darauf gab, dass während der

Ontogenese einige Strukturen regredieren, fanden die Forscher viele Jahre lang kein Interesse an der Erforschung dieses Vorgangs. Als erster berichtete Karl **Vogt** über den Zelltod (Vogt, 1842). 1860 differenzierte **Virchow** zwischen zwei Arten von Zelltod: Nekrose und Nekrobiose. Er erläuterte die Unterschiede zwischen diesen zwei Prozessen (Virchow, 1860), wobei der Begriff Nekrobiose morphologisch die Apoptose beschrieb. Nach Virchow wurden bis zum Ende des 19. Jahrhunderts viele Studien über den Zelltod veröffentlicht. Untersucht man diese Studien näher, so erkennt man, dass einige dieser Wissenschaftler in Wirklichkeit typische Formen der Apoptose schilderten (Diamantis et al., 2008). Unter den Autoren dieser wissenschaftlichen Periode ist Walter **Flemming** (Flemming, 1885) zu nennen. Er stellte als erster eine typische Form des apoptotischen Zelltods dar und prägte das Wort „Chromatolyse“, die den Zustand der Zelle während der Apoptose meint, in dem sich das Chromatin auflöst. Flemming behauptete als erster, dass der Zelltod kein Ergebnis mechanischer Kräfte sei, sondern das Resultat aus chemischen Veränderungen in der Zelle. Ludwig **Gräper** bestätigte Flemmings Beobachtungen und wies darauf hin, dass die Chromatolyse in allen Organen existieren muss in denen Zellen eliminiert werden müssen (Gräper, 1914). Er nahm dieses Phänomen als Gegensatz zur Mitose an. 1951 listete **Glücksman** alle Formen von Zelltod während der Ontogenese in Vertebraten auf (Glücksman, 1951). Er benutzte die Termini „Karyorrhesis“ (Fragmentation des Zellkerns) und „Karyopyknose“ (Kondensation des Zellkerns). Die Darlegung dieser Beobachtungen ähnelt der Morphologie der Apoptose, wie sie bis heute beschrieben wird. Erst 1972 kam es zur Prägung des Begriffs „Apoptosis“ durch die Pathologen **Kerr, Wyllie und Currie** (Kerr et al., 1972). Die Definition basierte auf einer sehr genauen Reihe von morphologischen Veränderungen, die mit Hilfe eines Elektronenmikroskops untersucht wurden. Die Bezeichnung stammt aus dem Griechischen (apo=ab; ptosis=Senkung) und beschreibt das Fallen der Blätter im Herbst (Chowdhury et al., 2006). In der Zellbiologie bezeichnet der Begriff Apoptose den programmierten Zelltod, da es sich hier um ein nach genauen Regeln ablaufendes Eliminationsprogramm handelt (Kerr et al., 1972). Kerr zeigte, dass es während der Apoptose zu einem Schrumpfen der Zelle kommt und erläuterte

die histologischen Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose. Von ihm wurde diese Art des Zelltods als normaler Vorgang in der Zelle beschrieben (Kerr et al., 1972). Drei Arbeitsgruppen (Skalka et al., 1976; Yamada et al., 1981; Zhivotovsky et al., 1981) stellten fest, dass nach elektrophoretischer Auftrennung des Chromatins γ -bestrahlter Zellen eine typische DNA-Fragmentierung, heutzutage „DNA-Leiter“ genannt, zu sehen ist. Daraufhin wurde eine Verbindung zwischen DNA-Degradierung durch Endonukleasen und dem apoptotischen Zelltod geschaffen (Williams et al., 1974). 1980 bestätigte **Wyllie** dieses Phänomen aufgrund der Induktion von Apoptose in Thymozyten nach Behandlung mit Glukokortikoiden (Wyllie et al., 1980) und die DNA-Degradierung wurde zum ersten Marker der Apoptose. Der Begriff des „programmierten Zelltods“ wurde das erste Mal von **Lockshin und Williams** benutzt (Lockshin & Williams, 1965). Seit den neunziger Jahren kam es zu einem exponentiellen Wachstum der Publikationen zu dem Thema Apoptose. 1977 konnten **Sulston und Horvitz** an einem Tiermodell, dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*, zeigen, dass nahezu 13 % der somatischen Zellen des Embryos dieses Wurms innerhalb kurzer Zeit sterben (Sulston & Horvitz, 1977). Es gelang ihnen 1982 das erste pro-apoptotische Protein, Ced-3 (**Caenorhabditis elegans cell death gene-3**), zu identifizieren (Horvitz et al., 1982). Im Jahre 2002 erhielten Brenner, Horvitz und Sulston den Nobelpreis für Physiologie/Medizin für ihre Entdeckungen, die die genetische Regulation der Organentwicklung durch den programmierten Zelltod erklärten.

3.4 Kennzeichen der Apoptose

Die Apoptose kann auf molekularer Ebene in vier Phasen eingeteilt werden (Slee et al., 1999): In der **Initiationsphase** wird der Apoptosemechanismus durch verschiedene Stimuli wie Entzug von Wachstumsfaktoren, UV- und ionisierende Strahlung, Chemotherapeutika und Aktivierung von Todesrezeptoren aktiviert.

In der **Festlegungsphase** kommt es zur Aktivierung von sogenannten Initiatorcaspasen wie Caspase-8 und -9 (siehe 3.5). Diese Phase führt irreversibel zum Todesprogramm der Zelle. Die **Verstärkungsphase** ist gekennzeichnet durch die Aktivierung verschiedener sogenannter

Effektorcaspasen (siehe 3.5). Die Zelle scheint hier die restlichen Caspasen zu aktivieren, die für den Zelltod notwendig sind. Im Rahmen der **Exekutionsphase**, auch **Vernichtungsphase** genannt, werden eine Vielzahl von Caspasensubstraten (siehe 3.5.1) proteolytisch geschnitten, wodurch es zum Verlust der Zellintegrität kommt.

Die Schrumpfung der Zelle und der Verlust der Membransymmetrie ohne Schädigung der Organellen sind wichtige morphologische **Merkmale des apoptotischen Zelltods** (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 2010). **Caspasenaktivierung** und **Exposition von Phosphatidylserinen** aus dem Inneren der Zellmembran auf die Zelloberfläche sind prominente biochemische Merkmale der Apoptose (Fadok et al., 1992; Wyllie et al., 2010). Es werden außerdem mehrere Bläschen an der Zellmembran gebildet, indem sich Teile der Zellmembran ausstülpfen („membrane blebbing“, Zeiose). Bei der Apoptose erscheint das Chromatin kondensiert am Rand des Zellkerns. Die **DNA-Fragmentierung** durch Endonukleasen als biochemisches und morphologisches Kennzeichen der Apoptose wurde bereits in mehreren Zelltypen nachgewiesen (Saraste & Pulkki, 2000). Zum Schluss werden sogenannte „apoptotic bodies“ gebildet, in denen sich Zelltrümmer befinden (Kerr et al., 1972). Diese Bläschen werden schließlich von Phagozyten und Makrophagen phagozytiert. Es wurde auch beschrieben, dass bei der Apoptose die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran beeinflusst werden kann. Dabei werden mehrere Proteine aus dem Intermembranraum ins Zytosol freigesetzt, wo sie den apoptotischen Prozess vorantreiben (Harris & Thompson, 2000; Vogler et al., 2009).

3.5 Caspasen

Caspasen sind eine Gruppe von Proteasen mit einem Cystein im aktiven Zentrum, die Peptidbindungen an der Carboxylseite von Aspartat spalten (**Cystein-Aspartat spezifische Proteasen**). Sie spielen eine zentrale Rolle im apoptotischen Prozess (Nicholson & Thornberry, 1997; Wyllie, 2010).

Bis heute sind 14 Caspasen bekannt, 11 davon im menschlichen Organismus, die nach ihrer Funktion in Initiator-, Effektor- und cytokinprozessierende Caspasen eingeteilt werden können (Strasser et al., 2000; Chowhury et al.,

2006). **Initiatorcaspasen** bei Säugern beinhalten die Caspasen-8, -9 und -10, **Effektorcaspasen** die Caspasen-3, -6 und -7. Die dritte Gruppe der **cytokinprozessierenden** Caspasen umfasst die Caspasen-1, -4 und -5 (Riedl et al., 2001; Chowdhury et al., 2006). Letztere Caspasen spielen im Zusammenhang mit der Apoptose keine Rolle und sind an der entzündlichen Zytokinproduktion beteiligt (Kroemer & Martin, 2005).

Caspasen werden als inaktive Zymogene synthetisiert (Shi, 2004; Chowdhury et al., 2006). Sie bestehen aus einer Prodomäne, die unterschiedlich lang sein kann sowie einer langen (ca. 20 kDa) und einer kurzen (ca. 10 kDa) Untereinheit.

Aktiviert werden die Caspasen durch zwei proteolytische Spaltungen zwischen der großen und der kleinen Untereinheit sowie hinter der Prodomäne als Ergebnis einer extrinsischen oder intrinsischen Aktivierung, wie in 3.4 und 3.6 beschrieben (Thornberry, 1998; Chowdhury et al., 2006; Wyllie, 2010). Durch das Zusammenlagern der langen und kurzen Untereinheit wird das aktive Zentrum der Caspase gebildet. Initiatorcaspasen besitzen lange Prodomänen mit einem CARD-(**C**aspase **R**ecruitment **D**omain) oder DED-(**D**eath **E**ffector **D**omain) Motiv am N-terminalen Ende. Caspase-9 besitzt eine CARD-, während Caspasen-8 und -10 eine DED-Sequenz besitzen (Kumar & Colussi, 1999).

Es ist bekannt, dass einige Caspasen, vor allem Initiatorcaspasen wie z.B. Caspase-8, durch räumliche Nähe einiger Zymogene eine autoproteolytische Spaltung eingehen können (Slee et al., 1999; Strasser et al., 2000). Folglich kommt es zu einer Heterodimerisierung der kleinen und der großen Untereinheit. Zwei solcher Heterodimere bilden ein Tetramer, eine voll aktive Caspase mit zwei voneinander unabhängigen katalytischen Zentren (Earnshaw et al., 1999; Riedl et al., 2001).

Aktivierte Initiatorcaspasen können Auslöser einer Signalkaskade sein, indem sie Effektorcaspasen aktivieren. Diese bewirken anschließend durch Spaltung ihrer Substrate die Bildung des apoptotischen Phänotyps (Wyllie et al., 2010). Dieses Phänomen kann zum Nachweis von Apoptose in Zellen verwendet werden, indem die prozessierten und somit aktivierten Caspasen mit Hilfe

sogenannter Immunoblots detektiert werden (Duae et al., 2003; Chowdhury et al., 2006).

Einige Caspasen, vor allem Effektorcaspasen, spalten und inaktivieren bestimmte zelluläre Proteine. Ein Beispiel für die Inaktivierung eines Enzyms nach proteolytischer Spaltung durch eine Caspase ist PARP (**P**oly-**ADP-R**ibose-**P**olymerase). PARP ist ein DNA-Reparaturenzym, das von Caspase-3 gespalten und somit inaktiviert wird (Tewari et al., 1995).

3.6 Der intrinsische Signalweg der Apoptose

In mammalen Zellen kann der apoptotische Vorgang innerhalb der Zelle in der Initiationsphase über einen **extrinsischen** und **intrinsischen** Weg in Gang gesetzt werden. Diese zwei Möglichkeiten der Stimulierung setzen die Aktivierung von Initiatorcaspasen in Gang. Während der extrinsische Apoptoseweg über den Rezeptor-vermittelten Signalweg ausgelöst wird, bei dem sogenannte **Todesliganden** an Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden, ist der intrinsische Apoptoseweg durch die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran charakterisiert. Abb.2 zeigt eine Zusammenfassung des extrinsischen und intrinsischen Apoptosewegs.

Stimuli wie Entzug von Wachstumsfaktoren und Chemotherapeutika sowie ionisierende Strahlung können die Apoptose initiieren ohne an einen Zelltodesrezeptor zu binden. Diesen Signalweg nennt man den intrinsischen oder auch mitochondrialen Weg, da es hierbei aufgrund eines Stresssignals zur Freisetzung von **Cytochrom c** aus dem Mitochondrium ins Zytosol kommt (Belka et al., 2000; Habermehl et al., 2006; Weinmann et al., 2004; You et al., 2006). Das freigesetzte Cytochrom c und **dATP** binden an **Apaf-1**, einem 140 kD großen cytosolischen Protein, und induzieren eine Konformationsänderung dieses Adaptorproteins, die zur Demaskierung der **CARD-Domäne** (**C**aspase **R**ecruitment **D**omäne) führt. **Procaspase-9** bindet über die eigene CARD-Domäne an die CARD-Domäne von Apaf-1. Nach Aktivierung am so entstandenen multimeren, ungefähr 1 MDa großen Komplex (7 Apaf-1 + 7 Cytochrom c + 7 (d) ATP + 7 Procaspase-9), auch **Apoptosom** oder „wheel of death“ genannt, kann Caspase-9 weitere Caspasen in der Kaskade aktivieren (Li et al., 1997; Zou et al., 1997; Chowdhury et al., 2006).

Aus dem mitochondrialen Intermembranraum werden neben Cytochrom c weitere Proteine, die unabhängig von der Caspasenaktivierung DNA-Degradierung induzieren können, (AIF, EndoG) sowie Antagonisten der endogenen Caspaseninhibitoren (Smac/DIABLO, OMI/HtrA), die auch die Caspasenaktivierung regulieren, freigesetzt (Susin et al., 1999; Schultz & Harrington. 2003; Li et al., 2001; Dubrez- Daloz et al., 2008; Verhagen & Vaux, 2002; Verhagen & Silke, 2002).

3.7 Die Bcl-2 Proteinruppe

3.7.1 Mitglieder und struktureller Aufbau der Bcl-2 Proteingruppe

Mitglieder der Bcl-2-Proteingruppe regulieren den Apoptosemechanismus. Der genaue Mechanismus der Regulation ist jedoch bisher unbekannt. Bcl-2, der Namensgeber der Gruppe, wurde als erstes Mitglied beschrieben. Das Protein wurde 1985 im B-Zell-Lymphom als ein Onkogen entdeckt, das nach einer chromosomalen t(14; 18)-Translokation stark überexprimiert wird (Tsujiimoto et al., 1985). Daher erhielt es den Namen **B** cell lymphoma (Bcl). 1988 wurde belegt, dass eine Überexpression von Bcl-2 die Apoptose verhindert (Vaux et al., 1988). In den vergangenen Jahren konnten immer mehr Bcl-2-ähnliche Proteine identifiziert werden, von denen ein Teil die Zelle vor Apoptose schützt, während der andere pro-apoptotisch wirkt (Strasser et al., 2000).

Ergänzend zur funktionellen Einteilung kann die Bcl-2-Proteingruppe nach strukturellen Kriterien, wie nachfolgend beschrieben, unterteilt werden (Kelekar & Thompson,1998; Strasser et al.,2000):

3.7.1.1. Strukturelle Einteilung der anti-apoptotischen Untergruppe

Die anti-apoptotische Untergruppe umfasst die Proteine **Bcl-2** (Tsujiimoto et al.,1985), **Bcl-x_L** (Boise et al.,1993), **Bcl-w** (Gibson et al.,1996), **A1/Bfl-1** (Choi et al.,1995; Lin et al.,1996), **Mcl-1** (Kozopas et al.,1993), **Boo/Diva** (Inohara et al.,1998; Song et al.,1999) und das C. elegans-Protein **Ced-9** (Hengartner et al.,1992).

Mitglieder dieser Gruppe besitzen strukturell mindestens drei von vier bekannten homologen Domänen (Bcl-2 Homology Domäne, BH 1-4). Mehrere

Beobachtungen haben gezeigt, dass Proteine aus der anti-apoptischen Bcl-2-Untergruppe verantwortlich für Chemoresistenzen sind (Sentman et al., 1991; Strasser et al., 1991; Schmitt et al., 2000; Adams & Cory, 2007a). Bcl-2 kann z.B. die Überlebenszeit der durch Zytostatika, ionisierender Strahlung und Wachstumsfaktor-Entzug gestressten Zellen verlängern (Zhou et al., 1997). Untersuchungen an mit Celecoxib behandelten Jurkat-Zellen zeigten, dass durch Überexpression von Bcl-x_L die Apoptose inhibiert werden konnte (Rudner et al., 2010b). Obwohl alle anti-apoptischen Proteine die gleiche Funktion haben, können sie sich jedoch nicht immer gegenseitig ersetzen (Willis et al., 2005; Rudner et al., 2010b; Rudner et al., 2011).

3.7.1.2. Strukturelle Einteilung der pro-apoptischen Untergruppe

Die pro-apoptische Untergruppe besteht aus den Bax/Bak-ähnlichen Multidomänproteinen und den „BH3-only“-Proteinen (Abb.1). **Bax** (Oltvai et al., 1993), **Bak** (Chittenden et al., 1995; Farrow et al., 1995; Kiefer et al., 1995) und **Bok/Mtd** (Hsu et al., 1997) sind Mitglieder der Bax/Bak-ähnlichen Multidomänproteinen. Diesen Proteinen fehlt lediglich die BH4-Domäne.

Zu den „BH3-only“-Proteinen gehören **Bad** (Yang et al., 1995a), **Bik/Nbk** (Boyd et al., 1995; Han et al., 1996), **Bid** (Wang et al., 1996), **Hrk/DP5** (Inohara et al., 1997), **Blk** (Hedge et al., 1998), **Bim/Bod** (Hsu et al., 1998; O'Connor et al., 1998), **Egl-1** (Conradt & Horvitz, 1998), **Puma** (Nakano & Voudsen, 2001; Yu et al., 2001) und **Noxa** (Oda et al., 2000). Diese besitzen, wie der Name schon belegt, lediglich die BH3- Domäne.

Eine Ausnahme bildet das Protein **Bcl-x_s**, das eine pro-apoptische Splicevariante von Bcl-x_L ist, eine BH-3 und -4-Domäne besitzt und somit keiner der oben genannten Gruppen zugeteilt werden kann (Boise et al., 1993).

Die meisten Mitglieder der Bcl-2-Proteingruppe besitzen außerdem C-terminal eine hydrophobe Sequenz, auch **Transmembrandomäne** (TM-Domäne) genannt, die dem Protein die Verankerung in Membranen verschiedener Organellen, vor allem zur äußeren mitochondrialen Membran, ermöglicht (Yang et al., 1995b; Abb.1).

Das Gleichgewicht der Bcl-2-Proteine in der Zelle reguliert die Integrität der Mitochondrien und entscheidet somit über das Schicksal der Zelle (Adams & Cory, 2007).

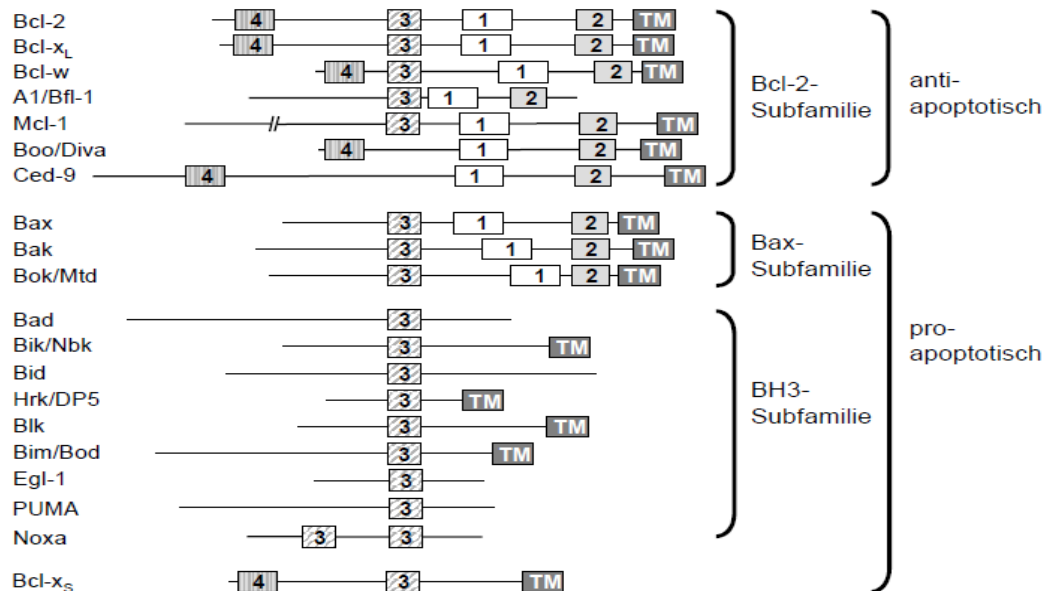


Abb.1: Struktureller Aufbau der Mitglieder der Bcl-2 Proteingruppe. Die Bcl-2 Proteingruppe beinhaltet pro- und anti-apoptotische Proteine. In der Bcl-2-Subgruppe sind alle anti-apoptotischen Proteine enthalten. Die pro-apoptotischen Proteine werden weiter in eine Bax/Bak-ähnliche und in eine BH3-only- Subgruppe unterteilt (Strasser et al., 2000).

3.7.2 Rolle der Bcl-2-Proteingruppe am Mitochondrium

Das Mitochondrium ist ein Organell in der Zelle, welches durch Elektronentransport in der inneren Mitochondrienmembran (Atmungskette) das sogenannte mitochondriale Potential ($\Delta\Psi_m$) und damit ATP generiert (Kroemer et al., 2007). Ein Merkmal des intrinsischen Apoptosewegs ist die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (siehe 3.6), welche als Konsequenz den Zerfall der Atmungskette mit sich trägt (Green & Evan, 2002). Der Verlust des Elektronentransports kann sowohl sofort nach Caspasenaktivierung stattfinden als auch caspaseunabhängig sein. Im zweiten Fall kommt es durch Mangel an ATP innerhalb von Stunden oder Tagen nach Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran zum Zelltod, welcher jedoch eher der Nekrose ähnelt als der klassischen Apoptose (Green & Evan,

2002). Zusätzlich begünstigt der Ausfall der Atmungskette die Erzeugung von ROS (**R**eactive **O**xygen **S**pecies, reaktive Sauerstoffradikale), welche den Zelltod beschleunigen (Green & Evan, 2002).

In Wirbeltieren steuern Mitglieder der Bcl-2-Proteingruppe die Permeabilität an der äußeren mitochondrialen Membran und machen somit das Mitochondrium zu einem zentralen Regulationspunkt in der Apoptose. Mitglieder der Bcl-2-Proteingruppe sind in der Zelle unterschiedlich lokalisiert. Während sich z.B. Bcl-2 am Mitochondrium und am endoplasmatischen Retikulum befinden kann (Rudner et al., 2002), ist Mcl-1 am Mitochondrium und im Zytosol lokalisiert (Akgul et al., 2000). Bak ist in gesunden Zellen typischerweise bereits an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (Harris & Thompson, 2000). Bax hingegen befindet sich als inaktives Monomer im Cytosol (Wolter et al., 1997).

Nach einem Stresssignal können „BH3-only“ Proteine jedoch die Oligomerisation und Verankerung von Bax über die Transmembrandomäne in die Mitochondrienmembran induzieren (Eskes et al., 2000). Die Oligomerisation am Mitochondrium korreliert mit der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, so dass von einem Zusammenhang zwischen den zwei Vorgängen auszugehen ist (Green & Evan, 2002).

In der Doppelmembran der Mitochondrien befinden sich bestimmte Poren, wie VDAC (**V**oltage **D**ependent **A**nion **C**hannel) in der äußeren und ANT (**A**denine **N**ucleotide **T**ranslocator) in der inneren mitochondrialen Membran, welche das Mitochondrium permeabel für verschiedene Metaboliten und Ionen machen.

Elektrophysiologische Studien haben gezeigt, dass Bax die Öffnungswahrscheinlichkeit von VDAC reguliert (Shimizu et al., 2000b). VDAC und ANT können unter bestimmten Umständen zusammen mit weiteren Komponenten eine PT-Pore (**P**ermeability **T**ransition **P**ore) bilden, die auch durch verschiedene Mitglieder der Bcl-2-Proteingruppe reguliert werden kann (Harris & Thompson, 2000). Bcl-2 und Bcl-x_L können die PT-Pore inhibieren und somit die Integrität der Mitochondrienmembran stabilisieren (Shimizu et al., 2000a). Pro-apoptotische Proteine wie Bax hingegen können durch eine direkte Interaktion mit einer der PT-Poren-Untereinheiten die Pore öffnen, wodurch Cytochrom c ins Zytosol freigesetzt wird (Narita et al., 1998).

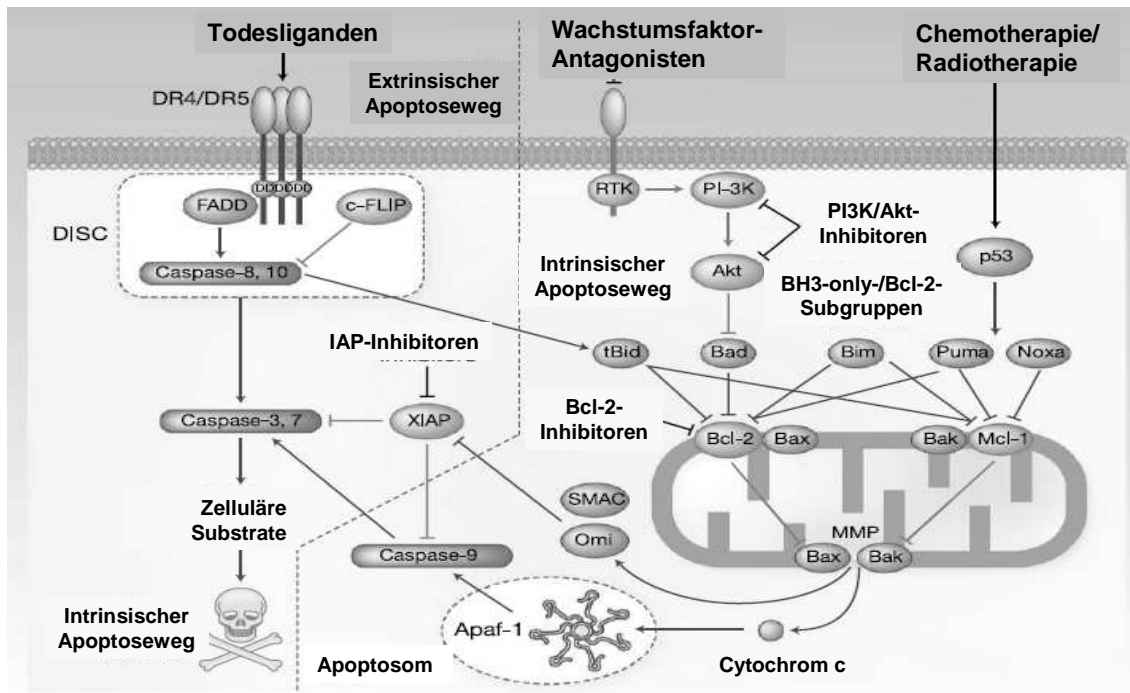


Abb.2: Zusammenfassung intrinsischer und extrinsischer Apoptoseweg. Der extrinsische Apoptoseweg wird durch das Binden von Todesliganden an Todesrezeptoren ausgelöst. In dieser Abbildung wird der durch DR4/DR5 induzierte Signalweg visualisiert. Der intrinsische Apoptoseweg mit dem Zusammenspiel von pro- und anti-apoptischen Proteinen am Mitochondrium sowie von Caspasen bis zur Bildung des Apoptosoms sind in dieser Abbildung zusammengefasst (Wiezorek et al., 2010).

Die Fähigkeit der pro-apoptischen Proteine sich nach einem Stimulus in der äußeren mitochondrialen Membran zu verankern, scheint für den Vorgang der Apoptose ein wichtiger Faktor zu sein. Ob nun Proteine der Bcl-2-Proteingruppe zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran durch Regulierung der oben genannten Kanäle führen oder ob sie spezifische Kanäle bilden, die die Membrandurchlässigkeit erhöhen, ist noch ungeklärt. Wahrscheinlich sind sie für beide Mechanismen verantwortlich (Harris & Thompson, 2000).

3.7.3 Aktivierungsmodelle der Proteine Bax und Bak

Die Expression von Bax und Bak ist essentiell für den intrinsischen Apoptoseweg. Fehlen Bax und Bak gleichzeitig in einem Zellsystem oder in isolierten Mitochondrien, so kommt es zu einer stark verminderten Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und somit zu erheblicher Resistenz in der Auslösung des intrinsischen Apoptosewegs

(Lindsten et al., 2000; Cheng et al., 2001; Zong et al., 2001). In gesunden Zellen verhindern anti-apoptotische Proteine vor allem die Aktivierung von Bax und Bak und schützen somit die Zelle vor Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (van Delft & Huang, 2006b).

Die anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Proteingruppe können laut Studien mit ihren BH-1, -2 und -3 Domänen an BH-3 Domänen von pro-apoptotischen Proteinen binden und sie somit inhibieren (Sattler et al., 1997; Minn et al., 1999; Chen et al., 2005). Anti-apoptotische Proteine können somit die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran aufhalten, während Bax und Bak sowie „BH3-only“-Proteine diese fördern (Yang et al., 1997; Harris & Thompson, 2000; Green & Evan, 2002).

Hierzu kann die pro-apoptotische Bcl-2-Proteingruppe in sogenannte „Effektoren“ und „Regulatoren“ unterteilt werden (Adams & Cory, 2007a; Chipuk et al., 2010). Während die Effektoren Bax und Bak aktiv am Mitochondrium wirken (Wei et al., 2001), stellen Regulatoren „BH3-only“ Proteine dar, welche für die Regulierung der Aktivierung von Bax und Bak zuständig sind. Die Gruppe der „Regulatoren“ kann zusätzlich in sogenannte „Aktivatoren“ (Bim, Bid und Puma) und den „Sensitizern“ (Bad und Noxa) unterteilt werden (Adams & Cory, 2007a; Chipuk et al., 2010).

Adams und Cory entwickelten zwei Modelle für die Aktivierung von Bax und Bak (Adams & Cory, 2007a).

Im direkten Aktivierungsmodell aktivieren Bim und Bid die Effektorproteine Bax und Bak, indem sie direkt an diese Effektorproteine binden (Kim et al., 2006). Deswegen werden Bim und Bid (Adams&Cory, 2007a; Chipuk et al., 2010), sowie auch Puma (Cartron et al., 2004; Kim et al, 2006) als Aktivatoren bezeichnet. Bid muss davor jedoch von Caspase-8 zu tBid (**truncated Bid**) gespalten und damit aktiviert werden. Die Sensitizer Bad und Noxa binden nach einem Stresssignal anti-apoptotische Proteine und hindern diese daran direkte Aktivatoren zu inhibieren (Adams&Cory,2007a; Chipuk et al., 2010). Durch Sensitizer freigesetztes tBid bzw. Bim kann dann wieder an Bax und Bak binden und diese aktivieren.

Im indirekten Aktivierungsmodell aktivieren alle „BH3-only“ Proteine Bax und Bak nicht, indem sie diese direkt aktivieren, sondern indem sie die anti-apoptotischen Proteine binden, welche Bax und Bak inhibieren (Adams&Cory,2007a).

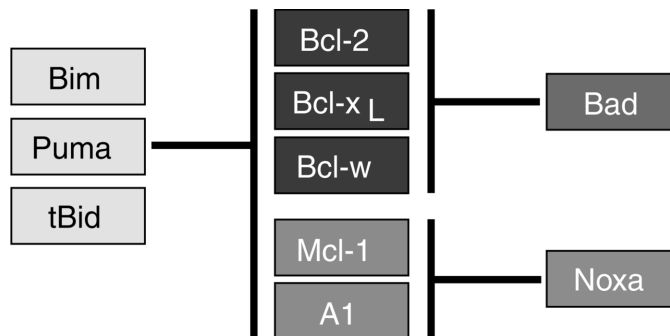


Abb.3: Verschiedene Bindungsprofile der Proteine aus der Bcl-2-Gruppe. Während Bim, Puma und tBid (truncated Bid) alle anti-apoptotischen Proteine binden, können andere nur selektiv mit einigen anti-apoptotischen Proteinen assoziieren. Bad bindet an Bcl-2, Bcl-x_L und Bcl-w, Noxa hingegen an Mcl-1 und A1. (Adams & Cory, 2007)

Die Bindungsaffinität der verschiedenen pro-apoptotischen Proteine zu den anti-apoptotischen Proteinen ist jedoch unterschiedlich (Chen et al., 2005). Während Bim, Puma und tBid alle anti-apoptotischen Proteine binden, können andere nur mit einigen wenigen anti-apoptotischen Proteinen spezifisch assoziieren. Bad bindet an Bcl-2, Bcl-x_L und Bcl-w, Noxa hingegen an Mcl-1 und A1 (Abb.3).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die intrinsische Apoptose durch ein adäquates Zusammenspiel zwischen anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Proteinfamilie und ihren BH-3-Liganden reguliert wird.

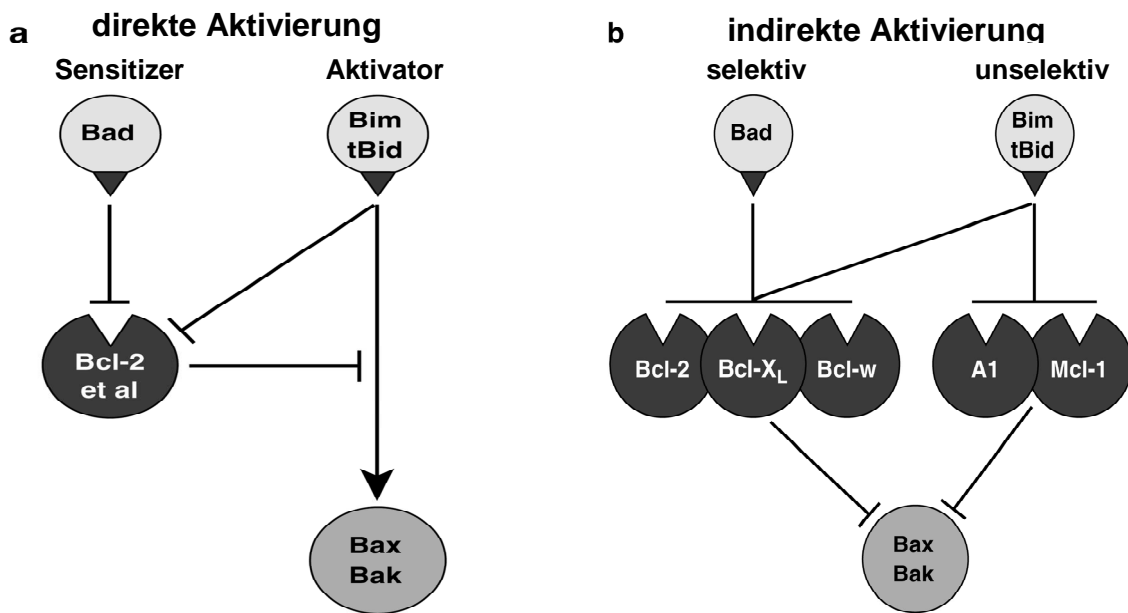


Abb.4: Aktivierungsmodelle von Bax und Bak. Bax und Bak können direkt sowie auch indirekt aktiviert werden. Während im direkten Aktivierungsmodell proapoptotische Proteine wie z.B. Bim und tBid Bax und Bak direkt binden und aktivieren, fungieren sie im indirekten Aktivierungsmodell als Inhibitoren der anti-apoptotischen Proteine, indem sie diese an der Bindung und Inaktivierung von Bax und Bak hindern. Im direkten Aktivierungsmodell können anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Gruppe durch Inhibierung der Aktivatoren die Aktivierung von Bax und Bak verhindern. Sensitizer können diesen Vorgang jedoch verhindern, indem sie diese anti-apoptotischen Proteine binden. (Aus Adams & Cory, 2007a)

3.8 Kenntnisstand der Forschung zu Mcl-1

3.8.1 Bedeutung des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 für die Apoptose

Mcl-1 ist ein anti-apoptotisches Protein der Bcl-2-Proteingruppe (Reynolds et al., 1994). Das Mcl-1-Gen wurde 1993 in einer Linie myeloischer Leukämiezellen identifiziert, die unter Phorbol ester-Exposition (TPA) zu Monozyten und Makrophagen ausdifferenzierten (Kozopas et al., 1993). Seine Expression wird durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren wie IL-3, IL-5, IL-6, IL-7 (Interleukine), GM-CSF (**G**ranulozyte **M**acrophage **C**olony-**S**timulating **F**actor), VEGF (**V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor), EGF (**E**pidermal **G**rowth **F**actor) und HGF (**H**epatocyte **G**rowth **F**actor) geregelt (Craig, 2002; Jourdan et al., 2003; Yang-Yen, 2006). Mcl-1 inhibiert die durch verschiedene zytotoxische Stimuli oder durch Wachstumsfaktor-Entzug ausgelöste Apoptose (Zhou et al., 1997). Mcl-1 kann nach zytotoxischem

Stress, wie z.B. Exposition gegenüber Colchizin oder ionisierender Strahlung, schnell induziert werden (Craig, 2002). Nach zytotoxischem Stress beobachtet man einen rapiden Anstieg der Expression von Mcl-1 innerhalb von 1-3 Stunden. Der anti-apoptotische Effekt hingegen dauert einige Tage nach der Stressinduktion an. Eine Überexpression des Proteins kann zur Immortalisierung und nach zusätzlichen genetischen Veränderungen zu Tumorentstehung führen (Craig, 2002). Ebenso wie die anderen anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Proteingruppe ist Mcl-1 also ein potentielles Protoonkogen. Mcl-1 wird in vielen Tumoren überexprimiert (Steelmann et al., 2011) und ist essentiell für die Embryogenese (Rinkenberger et al., 2000). Untersuchungen haben ergeben, dass mit Mcl-1 transfizierte murine Vorläuferzellen unter verschiedenen zytotoxischen Stimuli eine erhöhte Viabilität aufweisen (Zhou et al., 1997).

Andererseits zeigen weitere Studien, dass Mcl-1 nach Stresssignalen wie, z.B. einer Virusinfektion, proteasomal abgebaut wird und sich hierbei die Halbwertszeit des Proteins verringert (Cuconati et al., 2003; Nijhawan et al., 2003). Im Gegensatz zu Bcl-2 und Bcl-x_L wird Mcl-1 während der Apoptose in vielen Zellsystemen abgebaut (Craig, 2002; Michels et al., 2005). Man geht davon aus, dass in einigen Systemen die schnelle Herunterregulierung von Mcl-1 für die Apoptoseinduzierung notwendig ist (Nijhawan et al., 2003). Die Regulierung dieser proteasomalen Degradierung bleibt jedoch weiterhin ungeklärt (Stewart et al., 2010). Entzug von Wachstumsfaktoren und UV-Licht führen zu einer Inhibition der Mcl-1-Synthese, beeinflussen jedoch nicht den Abbau des Proteins (Chao et al., 1998; Nijhawan et al., 2003). Eine wichtige Rolle spielt das Protein auch für die Entwicklung und Erhaltung von B- und T-Lymphozyten (Opferman et al., 2003). Neuere Studien zeigen, dass Mcl-1 essentiell für die Bildung von Keimzentren und B-Gedächtniszellen in Lymphknoten ist (Vikstrom et al., 2010). Überexpression von Mcl-1 in transgenen Mäusen führt zu einer erhöhten Inzidenz für die Entwicklung von Lymphomen (Zhou et al., 2001). Dies zeigt, dass Mcl-1 direkt zu der Entstehung von Malignomen des hämatopoetischen Systems beitragen kann (Michels et al., 2005). Auch weitere anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Proteingruppe spielen

eine große Rolle bei der Tumorentstehung und werden ebenso in Lymphomen überexprimiert. Diese können durch die Substanz ABT-737 gehemmt werden. ABT-737 ist ein BH3-Mimetikum, das die Proteine Bcl-2, Bcl-x_L und Bcl-w inhibiert und somit die Viabilität der Zelle reduziert. Mcl-1 macht die Zellen hingegen gegenüber ABT-737 resistent (Konopleva, 2006; Opfermann und Green, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Lymphomzellen extrem empfindlich gegenüber ABT-737 reagieren, wenn diese gleichzeitig ein geringes Mcl-1-Level aufweisen. Untersuchungen zeigen, dass eine Bax/Bak vermittelte Apoptose durch ABT-737 nur nach Neutralisierung von Mcl-1 möglich ist (van Delft et al., 2006b). Reguliert man Mcl-1 in Zellen aus kolorektalen Karzinomen herunter, so können die Zellen für die Behandlung mit ABT-737 sensitiviert werden (Harrison et al., 2011).

3.8.2 Regulierung der Expression des Mcl-1 Proteins

Die Expression des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 wird auf mehreren Ebenen reguliert (Craig, 2002; Huber et al., 2011).

3.8.2.1. Transkriptionelle Regulierung von Mcl-1

Nach Stimulierung der Zelle durch verschiedene oben genannte Zytokine und Wachstumsfaktoren, wird die Transkription des Mcl-1-Gens über unterschiedliche Überlebenssignalwege wie dem MEK/ERK- (**Mitogen-Activated Protein Kinase ERK/ Extracellular Signal- Regulated Kinases**), p38/MAPK- (**Mitogen- Activated Protein Kinase**), PI3K/Akt- und JAK/STAT- (**Januskinase/ Signal Transducers and Activators of Transkription**) Signalweg induziert (Craig, 2002). Posttranskriptionell wird Mcl-1 durch alternatives Splicen reguliert (Abb.6). Neben dem prototypischen Mcl-1L, das aus 350 Aminosäuren besteht, entsteht die Splicevariante Mcl-1S/ Δ TM, die aus 271 Aminosäuren aufgebaut ist (Kozopas et al., 1993). Dieses kürzere Protein wirkt wie BH3-only Mitglieder der Bcl-2-Proteingruppe pro-apoptotisch. Das anti-apoptotische Genprodukt Mcl-1L kann also durch Splicen in ein pro-apoptotisches konvertiert werden (Craig, 2002).

3.8.2.2. Translationelle Regulierung von Mcl-1

Mcl-1 kann nicht nur auf Transkriptions-, sondern auch auf Translationsebene (d.h. auf der Ebene der Protein-Synthese) genau reguliert werden. Diese Möglichkeit, abhängig von dem sie umgebendem Milieu den Phänotyp innerhalb kurzer Zeit zu ändern, ist ein wichtiger homöostatischer Mechanismus. Studien haben gezeigt, dass unter bestimmten Voraussetzungen (z.B. nach Bestrahlung der Tumorzellen mit UV-Licht oder nach Infektion mit Viren), zusätzlich zu einer erniedrigten Transkription, auch eine verminderte Translation eine Rolle bei der Herunterregulierung von Mcl-1 während der Apoptose spielen kann (Cuconati et al., 2003; Gojo et al., 2002; Iglesias- Serret et al., 2003; Nijhawan et al., 2003). Untersuchungen zeigen, dass die Herunterregulierung der Translation zu einer schnellen Abnahme des Mcl-1-Levels führt (Huber et al., 2011). Um die Regulierung des anti-apoptischen Proteins Mcl-1 besser verstehen zu können, soll zunächst der Prozess der Translation näher erläutert werden.

Mit jeder Zellteilung müssen Proteine neu synthetisiert werden, um die Proteinlevel der Zelle aufrecht zu erhalten. Folglich ist die Translation in proliferierenden Tumorzellen erheblich erhöht. Sie wird in drei Phasen, der Initiations-, Elongations- und Terminationsphase, eingeteilt und von verschiedenen Faktoren reguliert. Die Initiationsfaktoren ermöglichen die Vereinigung der Initiator-tRNA und mRNA mit der 40S-Untereinheit der Ribosomen, die Erkennung des Startcodons AUG und die Bindung der 40S- und 60S-Untereinheit zum 80S-Komplex, an welchem dann durch die Peptidyl-Transferase die Polypeptidketten während der Protein-Elongation geformt wird. Diese Ereignisse erfordern viel Energie in Form von ATP. Die eukaryotischen Initiationsfaktoren eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4G (auch eIF4G1 genannt), eIF4H und das **Poly-A-bindende Protein (PABP)** regulieren die Verbindung der mRNA mit dem Initiationskomplex. Der Initiationsfaktor eIF4E erkennt die 7-Methyl-GTP- Struktur (Cap-Struktur) am 5'-Ende der m-RNA, während PABP am 3'-Ende der mRNA bindet. Die Helikase eIF4A, zusammen mit eIF4B und eIF4H, entspiralisiert die mRNA am 5'-Ende. Der Initiationsfaktor eIF3 ist der größte und einer der komplexesten Initiationsfaktoren. Laut Studien besteht er

aus 12 Untereinheiten (eIF3a-k). Während eIF3a-b, -c, -g und -i einen Kern bilden, haben die restlichen Untereinheiten eher eine regulatorische Funktion (Harris et al., 2006). Der Faktor eIF3 interagiert mit der 43S-Untereinheit, die aus der 40S-Untereinheit und dem Initiationsfaktor eIF2 besteht, welcher für den Transfer der Initiator-tRNA auf die kleine ribosomale Einheit verantwortlich ist. Das Gerüstprotein eIF4G bindet direkt an die Initiationsfaktoren eIF3, eIF4A, eIF4E und PABP und koordiniert das Binden der verschiedenen Faktoren am Initiationskomplex (Stoneley & Willis, 2004; Graber & Holcik, 2007).

Die Entstehung des Initiationskomplexes und die Initiation der Translation werden ferner über verschiedenen übergeordnete Signalwege reguliert, welche bei optimalen Wachstumsbedingungen aktiviert werden. Ein solcher Weg ist der Akt/PKB-Signalweg (**P**rotei**k**inase **B**), welcher in vielen Tumoren dereguliert (Nicholson & Anderson, 2002; She et al., 2010; Nishioka et al., 2010; Steelman et al., 2011) und der Schlüssel zur translationellen Regulierung des Mcl-1-Proteins ist (Maurer et al., 2006). Er trägt, wie Mcl-1 auch, zur Resistenzentwicklung gegenüber ionisierender Strahlung und anderer Therapieansätze bei. PKB gehört, wie die PKA und PKC (**P**rotei**k**inase **A** und **C**), zu den Serin-/Threoninkinasen. Akt/PKB spielt eine wichtige Rolle in Signalwegen, die über Wachstumsfaktoren sowie Insulin oder anderen extrazellulären Stimuli aktiviert werden und reguliert über verschiedene Mechanismen die Proliferation, das Überleben und die Apoptose in der Zelle (Nicholson & Anderson, 2002; Song et al., 2005b).

In Säugern wurden drei Akt/PKB-Gene identifiziert: Akt1/PKB α , Akt2/PKB β und Akt3/PKB γ (Song et al., 2005b). Während PKB α /Akt1 und PKB β /Akt2 ubiquitär exprimiert sind, findet man Akt3/PKB γ nur in wenigen Geweben (Nicholson & Anderson, 2002). Strukturell besitzen alle drei Isoformen von Akt/PKB eine N-terminale **P**leckstrin-**H**omologie-Domäne (PH-Domäne), ein katalytisches Zentrum mit einer Threoninsequenz (Threonin 308 in Akt1/PKB α) und C-terminal eine hydrophobe regulatorische Domäne mit einer Serinsequenz (Serin 473 in Akt1/PKB α).

Kommt es durch das Binden von Wachstumsfaktoren an Thyrosinkinase-Rezeptoren der Zellmembran zu einem Stimulus, so wird **P**hosphatidylinositol

3-Kinase (PI3-K) der Klasse I aktiviert. PI3-K phosphoryliert wiederum PIP2 (Phosphoinositol-4,5-Diphosphat) zu PIP3 (PI-3,4,5-Triphosphat), woraufhin die PH-Domäne von Akt/PKB mit dem Membranlipidprodukt PIP3 interagiert und Threonin 308 durch die PDK1 (**Phosphoinositide-Dependend-Kinase 1**), die ebenfalls zur Membran rekrutiert wurde, phosphoryliert werden kann. Die Phosphorylierung von Threonin 308 führt zu einer partiellen Aktivierung, die zusätzliche Phosphorylierung der Serin 473 zu einer vollständigen Aktivierung von Akt/PKB. Eine Phosphorylierung von Serin 473 allein hat nur einen geringen Effekt auf die Aktivierung von Akt/PKB (Song et al., 2005b; Nicholson & Anderson, 2002).

PTEN (**Phosphatase and Tensin** homologue) hemmt die Phosphorylierung von PIP2 zu PIP3 und führt somit zu einer Blockierung des Akt/PKB-Signalwegs. Ähnliche inhibitorische Wirkung kann der Inhibitor LY294002 in Zellen erzeugen (Vlahos et al., 1994), da er die PI3-Kinase hemmt.

Eine Genamplifizierung von Akt, eine anhaltende Aktivierung des Wachstumsfaktor-bindenden Rezeptors, Überexpression der PI3K-Untereinheit p110 oder Deletion der antagonistisch wirkenden Phosphatase PTEN kann eine konstitutive Phosphorylierung und Aktivierung von Akt bewirken (Nicholson & Anderson, 2002; Steelman et al., 2011).

Viele zelluläre Prozesse werden über den Akt/PKB-Signalweg reguliert. Akt/PKB kann die Glykogen-Synthase-Kinase 3- β (GSK-3 β) phosphorylieren und damit inaktivieren. Dieser Vorgang verhindert die Phosphorylierung von Proteinen wie z.B. Mcl-1 (siehe 3.8.3) und scheint die Zellen vor Apoptose zu schützen (Song et al., 2005b).

Der Akt/PKB-Signalweg kontrolliert außerdem die Protein-Translation über die Serin/Threonin-Kinase mTOR (**mammalian Target of Rapamycin**, siehe Abb.5). Es gibt zwei strukturell unterschiedliche mTOR-Komplexe in tierischen Zellen: mTORC1/Raptor (**mTOR Complex**) und mTORC2/Rictor (Sarbasov et al., 2005; Mills et al., 2008). mTORC1 besteht aus mTOR, Raptor (**Regulatory associated protein of mTOR**), mLST8 (**mammalian lethal with sec thirteen**) und KOG1 (**Kontroller Of Growth**). mTORC2 setzt sich aus mTOR, Rictor (**Rapamycin-insensitive companion of mTOR**), AVO1, 2 und 3 (**Adheres**

voraciously to TOR2) sowie mLST8 zusammen (Loewith et al., 2002). Eine gut untersuchte Funktion von mTORC1 ist die Regulierung der Proteinhomeostase in der Zelle. Unterhalb von mTORC1 (siehe Abb.5, oben) wird einerseits die S6, eine Untereinheit der Ribosomen, durch die p70S6Kinase phosphoryliert und aktiviert (Hidalgo & Rowinsky, 2000). Phosphoryliertes S6 erhöht die Translation von bestimmten mRNAs, welche ribosomale Proteine kodieren. Andererseits wird der Translationsinhibitor 4E-BP1 (eIF4E **B**inding **P**rotein) durch mTORC1 phosphoryliert und damit inaktiviert (Mamane et al., 2006). Normalerweise verhindert die Bindung von 4E-BP1 an eIF4E die Interaktion von eIF4E mit eIF4G1, einem der drei homologen eIF4G-Proteine. Durch Inaktivierung von 4EBP1 kommt es zur Freisetzung des Initiationsfaktors eIF4E. Dieser Schritt ermöglicht die Cap-abhängige Translation, da die Bildung von eIF4F (Komplex aus eIF4G, eIF4E und eIF4A) möglich wird (Graber & Holcik, 2007). Suboptimale Wachstumsbedingungen und Stress führen zu einer Dephosphorylierung von 4EBP1 und damit zu einer erhöhten Bindung mit eIF4E, so dass der Zusammenschluss von eIF4E mit eIF4G1 verhindert wird (Marcotrigiano et al., 1999). Akt kann folglich über mTORC1 die Translation verschiedener pro- und anti-apoptischer Proteine, darunter auch Mcl-1, beeinflussen (Mills et al., 2008; Bahaskar et al., 2009; Steelman et al., 2011). Im Gegensatz zum mTORC1-Komplex, dessen Aktivierung von Akt/PKB reguliert wird, aktiviert mTORC2 hingegen Akt/PKB durch Phosphorylierung am Serin 473 (siehe oben).

Eine schnelle Herunterregulierung der globalen Protein-Translation ist eine wichtige Stressantwort nach zellulärem Schaden. Es ermöglicht der Zelle Energie und Ressourcen für die Zelldefektreparatur einzusparen. Andererseits scheint es auch wichtig, das Level an Proteinen, welche für die Zellreparatur benötigt werden, zu erhalten oder sogar zu erhöhen (Powley et al., 2009). Zu diesem Zweck kann die Zelle zur Cap-unabhängigen Translation schalten und die Herunterregulierung der Cap-abhängigen Translation umgehen (siehe Abb.5, unten). Ungefähr 10% der mRNAs beinhalten sogenannte IRES (**I**nternal **R**ibosome **E**ntry **S**ites), welche auch unter Stressbedingungen weiterhin eine Translation der benötigten Proteine ermöglichen (Spriggs et al., 2010; Graber &

Holcik et al., 2007). Ein Hauptprotein der Cap-unabhängigen Translation ist DAP5/p97 oder, wegen der Homologien zu eIF4G1, auch eIF4G2 genannt (Nevins et al., 2003). Im Gegensatz zu eIF4G1 interagiert DAP5 nicht mit eIF4E, geht aber wie eIF4G1 eine Bindung mit eIF3A und eIF4A ein. Die DAP5-abhängige Translation kann durch caspaseabhängige Spaltung von DAP5 während der Apoptose erhöht werden (Henis-Korenblit et al., 2002; Marash & Kimchi, 2005). Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Spaltung von eIF4G1 zu einer Hemmung der Translation während der Apoptose führt (Marissen et al., 2000).

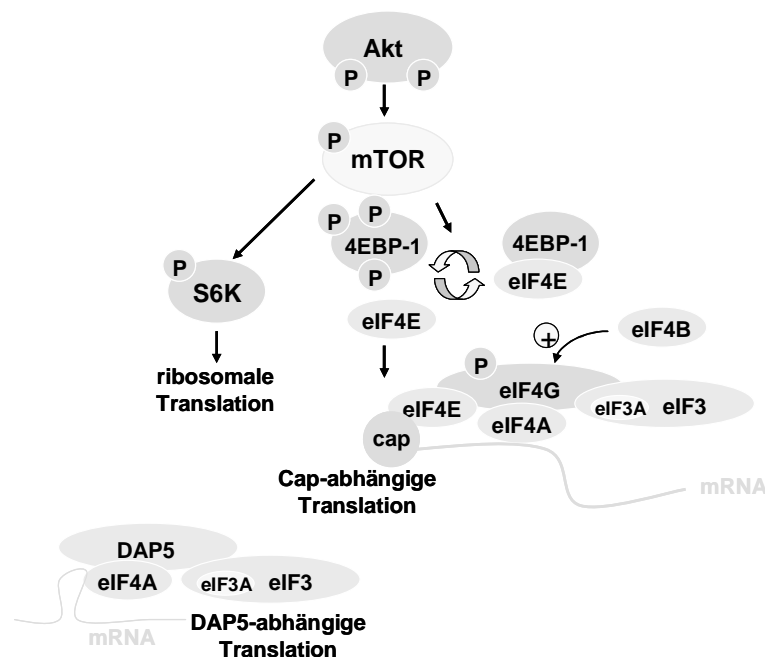


Abb.5: Schematische Zusammenfassung des Akt-Signalweges im Zusammenhang mit der Proteintranslation. In Jurkat-Zellen ist der Akt-Signalweg konstitutiv aktiviert. Phosphoryliertes und damit aktiviertes Akt phosphoryliert mTOR und aktiviert es somit ebenfalls. Aktiviertes mTOR kann auf der einen Seite S6K phosphorylieren und somit die ribosomale Translation hinaufregulieren. Auf der anderen Seite phosphoryliert es 4EBP1 und verhindert somit die Bindung des Proteins an den Initiationsfaktor eIF4E. Der Initiationsfaktor eIF4E kann somit, zusammen mit eIF4G1 (eIF4G in der Abbildung), eIF4A und eIF3 (welche die eIF3A Untereinheit beinhaltet) an der Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA binden. Ist dieser Komplex vollständig, so kann die Proteintranslation beginnen. Die Helikase eIF4B entspiralisiert die mRNA am 5'-Ende und hat somit einen positiven Effekt auf die Regulierung der Proteintranslation. Der Initiationskomplex des Cap-unabhängigen Initiationskomplexes ist ebenfalls dargestellt (unten in der Abbildung). DAP5 (auch eIFG2 genannt) geht dabei keine Bindung mit eIF4E ein, interagiert aber wie eIFG1 mit eIF3A und eIF4A (nach Trivigno et al., 2013).

3.8.3 Posttranslationelle Modifizierung des Proteins Mcl-1

Je nach Zelllinie und Studie kann die Halbwertszeit von Mcl-1 Werte von 20 min bis zu 3 Stunden betragen (Yang et al., 1995b, Akgul et al., 2000, Schubert & Duronio, 2001, Craig, 2002, Nijhawan et al., 2003, Stewart et al., 2010). Diese kurze Halbwertszeit ist einzigartig unter den anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Proteingruppe (Steward et al., 2010). Im Vergleich zu Mcl-1 beträgt z.B. die Halbwertszeit von Bcl-2 10-14 Stunden (Yang et al., 1995b). Ein weiterer Regulationsmechanismus, welcher das Mcl-1-Level in der Zelle reguliert, ist die proteasomale Degradierung. Mcl-1 wird nach zytotoxischem Stress sehr schnell polyubiquitiniert und proteasomal abgebaut (Domina et al., 2000; Inoshita et al., 2002; Domina et al., 2004; Nijhawan et al., 2003). Seine ubiquitinabhängige proteasomale Degradierung wird durch E3-Ligasen kontrolliert (Warr et al., 2005). Bisher wurden β -TrCP (**β -Transducin repeat-Containing Protein**), FBW7 (**F-box and WD repeat domain containing 7**) und Mule (**Mcl-1 ubiquitin ligase E3**) als Mcl-1-bindende E3-Ligasen identifiziert (Warr et al., 2005; Ding et al., 2007a; Zhong et al., 2005; Inuzuka et al., 2011). β -TrCP und FBW7 sind selber die Mcl-1-bindenden Komponenten eines multimeren E3-Ligasekomplex. Dagegen Mule selber eine HECT-Domäne (**H**omologous to the **E6-AP C**arboxyl-**T**erminus) E3-Ligase und besitzt eine BH3-Domäne, die der des proapoptotischen Proteins Bak ähnelt. Diese ermöglicht das Binden der Ubiquitinase an Mcl-1 (Opferman & Green, 2010). Interessanterweise haben Untersuchungen gezeigt, dass das Herunterregulieren der Ubiquitinase MULE durch RNA-Interferenz zwar den Mcl-1-Abbau abschwächen, jedoch nicht verhindern kann (Zhong et al., 2005). Es liegt also nahe, dass es andere Mechanismen geben muss, die den Abbau von Mcl-1 regulieren. Außerdem sind alle drei E3-Ligasen nicht spezifisch für Mcl-1, da sie auch andere Proteine ubiquitinieren können (Stewart et al., 2010).

Weiterhin kann Mcl-1-Stabilität durch Phosphorylierung beeinflusst werden. Aktiviertes GSK-3 β kann Mcl-1 am Serin 159 phosphorylieren. Dies begünstigt die Ubiquitinierung des anti-apoptotischen Proteins durch β -TrCP und FBW7 (Ding et al., 2007a; Inuzuka 2011) und führt zu einer verminderten Halbwertszeit durch erhöhten proteasomalen Abbau (Maurer et al., 2006). Eine

Inhibierung von GSK-3 β durch Akt/PKB würde demnach zu einer verminderten Degradierung und Akkumulierung von Mcl-1 führen und sich anti-apoptotisch auf die Zelle auswirken. Während Phosphorylierung am Serin 159 zu einer beschleunigten Degradierung führt, scheint die Phosphorylierung am Threonin 163 durch die Mitogen-aktivierten Kinasen MAPK-1/-2 Mcl-1 zu stabilisieren (Domina et al., 2000; Domina et al., 2004, Zhao et al., 2007). Nach verschiedenen Stresssignalen kann außerdem die Phosphorylierung von Mcl-1 am Serin 64 die anti-apoptotische Aktivität von Mcl-1 erhöhen (Kobayashi et al., 2007).

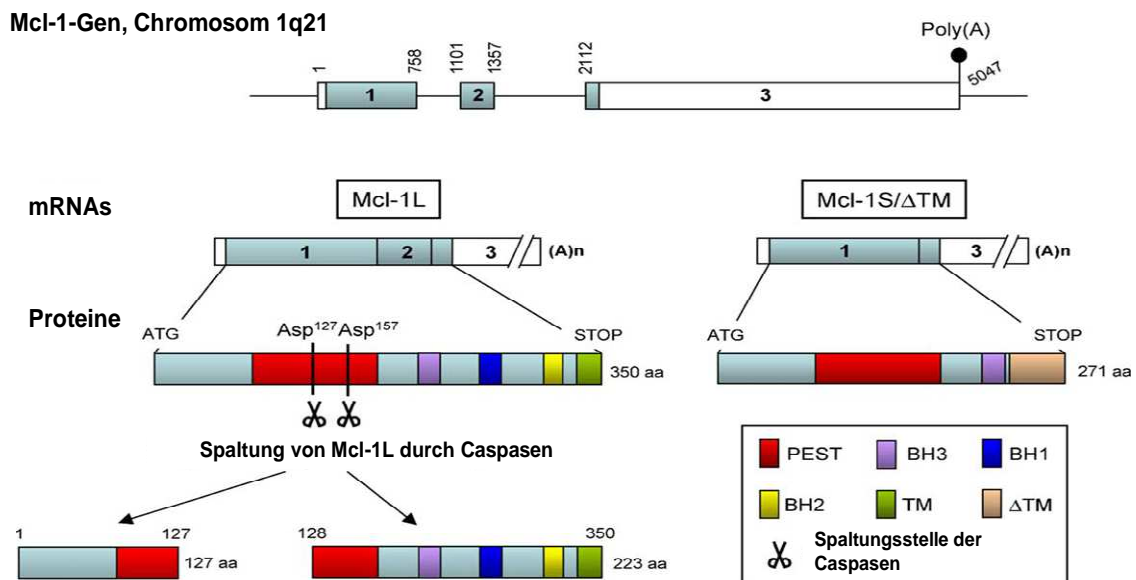


Abb.6: Molekularer Aufbau von Mcl-1. Das humane Mcl-1-Gen befindet sich auf Chromosom 1q21 und beinhaltet drei proteincodierende Exone. Durch posttranskriptionelles alternatives Splicing entstehen die zwei unterschiedlich langen Isoformen Mcl-1L und Mcl-1S/ Δ TM. Beim kürzeren Protein Mcl-1S/ Δ TM fehlt in der mRNA das Exon 2. Das prototypische, längere Protein Mcl-1L enthält 350 Aminosäuren, während Mcl-1S/ Δ TM aus 271 Aminosäuren aufgebaut ist. Während bei der Splicevariante Mcl-1S/ Δ TM das N-terminale Ende dem des prototypischen Mcl-1L gleicht, fehlen dieser kürzeren Splicevariante BH1 und BH2 sowie auch die transmembrane Domäne (Bae et al., 2000, Bingle et al., 2000). Die Abbildung stellt außerdem die Struktur des Mcl-1-Proteins mit einer PEST-Region, der Transmembrandomänen und der BH-Domänen dar (siehe Legende). Caspasen können das Protein posttranslational nach den Aspartatresten Asp127 und Asp157 schneiden. (Michels et al., 2005)

Ein weiteres bekanntes Substrat der GSK-3 β ist β -Catenin. Aktives GSK-3 β phosphoryliert neben Mcl-1 auch β -Catenin und führt auch hier zur Ubiquitin-

abhängigen Degradierung des Proteins. Die Inhibierung dieses Phosphorylierungsmechanismus führt zu einer Anreicherung von β -Catenin im Zellkern. Das Protein kann dort an Transkriptionsfaktoren binden, die wichtig für die Zellteilung sind. Ein verminderter Abbau des β -Catenins würde demnach für die Zelle eine vermehrte Zellteilung bedeuten. Die Deregulation des β -Catenin Signalwegs ist ebenfalls ein wichtiger Vorgang in der Genese vieler Tumoren (Morin, 1999) und spielt auf Grund des Mcl-1-ähnlichen Degradierungsmechanismus eine wichtige Rolle in dieser Arbeit.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass das Protein USP9X (**U**biquitin **S**pecific **P**eptidase **9 X**-linked), eine Deubiquitinase, die Ubiquitinierung und Degradierung von Mcl-1 beeinflussen kann. Deubiquitinasen antagonisieren den Effekt der Ubiquitin-Ligasen, indem sie die durch Ubiquitinligase gebildete Polyubiquitinkette wieder abhängen und damit den **proteasomalen** Abbau von Mcl-1 verhindern. USP9X wird in vielen Tumorzellen überexprimiert (Opferman & Green, 2010). Durch Heraufregulierung von USP9X wird die Wirkung von ABT-737 auf Tumorzellen verringert und umgekehrt durch Herunterregulierung ein erhöhtes Ansprechen der Zellen auf ABT-737 erreicht (Schwickart et al., 2010). Eine Herunterregulierung von USP9X durch RNA-Interferenz resultiert im niedrigeren Mcl-1-Level, ohne jedoch die mRNA-Expression des anti-apoptischen Proteins zu beeinflussen. Ebenso wie die oben beschriebenen Ligasen hat auch USP9X mehrere Substrate, an die es binden und die es deubiquitiniert kann und ist somit nicht spezifisch für Mcl-1 (Stewart et al., 2010). Die Rolle von USP9X in strahleninduzierter Apoptose wurde bisher nur unzureichend untersucht.

Zuletzt ist die Regulierung des Mcl-1-Proteins durch Proteasen zu nennen. Caspasen und Granzym B können Mcl-1 proteolytisch spalten und somit das Mcl-1-Level kontrollieren (Clohessy et al., 2004, Han et al., 2004, Herrant et al., 2004). Mcl-1 besitzt am N-terminalen Ende eine sogenannte PEST-reiche Region. Darunter versteht man eine Prolin- (**P**), Glutamin- (**E**), Serin- (**S**) und Threoninreiche (**T**) Sequenz. Diese steuert die Degradierung des Proteins und ist oft in kurzlebigen Proteinen zu finden (Rogers et al., 1986). Vor allem die Effektorcaspase-3 kann Mcl-1 nach den Aspartatresten Asp¹²⁷ und Asp¹⁵⁷

innerhalb der PEST-Domäne proteolytisch schneiden (Abb.6) und es somit inaktivieren (Michels et al., 2005).

3.9 Fragestellung

Pro- und anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Gruppe werden als Indikatoren für die Prognose und Therapieantwort bei onkologischen Erkrankungen immer wichtiger (Craig, 2002). Die protektiven Proteine der Bcl-2-Gruppe Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1 werden in verschiedenen Tumoren überexprimiert und stellen Resistenzfaktoren dar (Streffer et al., 2002; Adams & Cory, 2007; Kelly & Strasser, 2011). Daher ist es von großer Bedeutung, neue und effektivere Therapieansätze zu entwickeln, die Radioresistenzen auf molekularer Ebene überwinden und eine erhöhte Therapieantwort der Tumorzellen hervorrufen.

Mcl-1 wird häufig in Tumoren überexprimiert und limitiert den Therapieerfolg (Sieghart et al., 2006; Wirth et al., 2005). Der Verlust von Mcl-1 kann direkt zur Apoptose führen oder sensitiviert die Zellen gegenüber anderen Stressfaktoren (Michels et al., 2005). Eine verlängerte Halbwertszeit oder transkriptionelles bzw. translationelles Hochregulieren dieses anti-apoptotischen Proteins führt zur Ausbildung von Resistenzen gegenüber Apoptoseinduktoren. Obwohl alle anti-apoptotischen Proteine ähnliche Funktionen ausüben, ist ihre Regulierung verschieden. Ein Unterschied zu anderen anti-apoptotischen Proteinen ist die kurze Halbwertszeit von Mcl-1. Bisher konnte nicht geklärt werden, welche Mechanismen zu einer Herunterregulierung von Mcl-1 nach zytotoxischem Stress führen. In dieser Arbeit soll gezeigt werden, in welchen Aspekten sich die Regulierung von Mcl-1 in strahlensensitiven und -resistenten Jurkat-T-Lymphom- Zellen unterscheidet.

Hierfür soll die Translation und die proteasomale Degradierung von Mcl-1 untersucht werden. Analysiert wird der Akt/PKB-Signalweg mit seinen Substraten GSK-3 β , p70S6K und mTOR nach Bestrahlung, welche die proteasomale Degradierung und Translation steuern. Bisher ist der Zusammenhang zwischen Inhibierung der Translation, Verminderung des Mcl-1-Levels und Zytotoxizität während der Therapie mit ionisierender Strahlung noch nicht ausreichend erforscht. Die Deubiquitinase USP9X reguliert die Stabilität von Mcl-1 und somit das Mcl-1-Proteinlevel auf der

posttranslationalen Ebene. In der vorliegenden Arbeit soll auch der Einfluss von USP9X auf das Mcl-1-Level und die Apoptoseinduktion nach Bestrahlung in Jurkat- und zusätzlich in K562-Zellen untersucht werden. Interessant sind hierbei die Auswirkung der Mcl-1-Regulierung auf die strahleninduzierte Apoptose und Strahlensensitivität.

In dieser Arbeit soll folglich an T-Lymphomzellen als Zellmodell die Proteintranslation und das Mcl-1-Proteinlevel nach Bestrahlung untersucht werden. Die Identifikation dieser Mechanismen bietet neue Ansatzpunkte, die zur Verbesserung der Ansprechbarkeit auf Strahlentherapie genutzt werden könnten.

4. Material

4.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
β- Mercaptoethanol	Sigma
Acrylamid/ Bisacrylamid Rotiporese Gel 30	Roth
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth
Aprotinin	Roth
APS (Ammoniueroxidsulfat)	Roth
Bromphenolblau	Sigma
CHAPS (3-[3-Cholamidopropyl]- dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat	Roth
DMSO (Dimethyl Sulphoxide)	Sigma
ECL Western-Blotting detection reagents	GE Healthcare
EDTA (Ethylenediaminetetraacticacid)	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Gel 30	Roth
Glycerol	Merck
Glycin	Roth
HCl (Chlorwasserstoff)	Merck
HEPES4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazin-ethansulfonsäure	Invitrogen
KCl (Kaliumchlorid)	Merck
KH ₂ PO ₄ (Kaliumhydrogenphosphat)	Merck
Leupeptin	Sigma
Methanol	Merck
Milchpulver	Roth
Na ₂ HPO ₄ (Di- Natriumhydrogenphosphat)	Merck
Na ₃ VO ₄ (Natriumorthovandat)	Merck

NaCl (Natriumchlorid)	Merck
NaF (Natriumfluorid)	Sigma
Natriumcitrat	Sigma
Pepstatin	Sigma
Propidiumiodid	Sigma
Proteinmarker für SDS- Page	Fermentas
PMSF (Phenyl-methylsulfonyl-fluorid)	Sigma
Ponceau-S-Lösung	Sigma
NaPP (Natriumpyrophosphat)	Sigma
Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Protein Farbkonzentrat)	Biorad
SDS-Laufpuffer	Biorad
TEMED (Tetramethylrhodamin-ethylester-perchlorat)	Sigma
TMRE (Tetramethylrhodamin-ethylester-perchlorat)	Mobitech
Trizma Base	Sigma
Tris HCl	Roth
TritonX-100	Sigma
Tween20	Sigma

4.2 Spezielle Medien und Reagenzien

4.2.1 Medien für die Zellkultur

Medium	Hersteller
Zellkulturmedium für Kurz- und Langzeitkulturen, RPMI 1640 [+]L- Glutamin	PAA Laboratories GmbH
Zellkulturmedium für Kurz- und Langzeitkulturen, RPMI 1640 [+]L- Glutamin ohne Phenolrot	Invitrogen/ GIBCO ®
+ 10% FCS	Biochrom AG

4.2.2 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Chemikalien	Endkonzentration/ Volumen/ Masse
PBS (Waschlösung für die Zellkultur)	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ in destilliertem Wasser gelöst	137 mM 2,7 mM 6,5 mM 1,5 mM
SDS Probenpuffer für standard Western-Blots	Tris-HCl SDS Bromphenolblau Glycerin β- Mercaptoethanol in destilliertem Wasser gelöst	200 nM 8% 0,2% 40% 10%
Lysepuffer für standard Western-Blots	HEPES NaCl NaPP EDTA NaF Na ₃ VO ₄ Aprotinin Leupeptin Pepstatin PMSF TritonX-100 in destilliertem Wasser gelöst	50 mM 150 mM 10 mM 1 mM 10 mM 2 mM 5 µg/ml 5 µg/ml 3 µg/ml 1 mM 1 %
APS (Ammoniuperoxidsulfat)	APS in destilliertem Wasser gelöst	438 mM

Transferpuffer für Western-Blot	Trizma Base Glycin Methanol in destilliertem Wasser gelöst	3,03 g/l 14,40 g/l 200 ml/l 800 ml/l
TBS-Tween (Waschpuffer)	Tris HCl NaCl Tween20 in destilliertem Wasser gelöst pH 8,0 →	1,57 g/l 8,76 g/l 1 ml/l Einstellung mit 5 M NaOH
Blocklösung	Milchpulver in TBS-Tween	5 %
Sammelgelpuffer (Puffer zur Gelherstellung Western-Blot)	Trizma Base SDS (10%) in destilliertem Wasser gelöst pH 6,80 →	6,06 g/ 100 ml 4 ml/100 ml Einstellung mit 32%- iger HCl
Trennpuffer	Trizma Base SDS (10%) in destilliertem Wasser gelöst pH 8,80 →	18,17 g/ 100 ml 4 ml/ 100 ml Einstellung mit 32%- iger HCl
Färbelösung zur durchflusszytometrischen Bestimmung der DNA- Fragmentierung	Na-Citrat Triton X-100 Propidiumiodid in PBS gelöst	0,1 % 0,1 % 5 µg/ml

Färbelösung zur durchflusszytometrischen Bestimmung des $\Delta\Psi_m$	TMRE in PBS gelöst	25 nm
--	-----------------------	-------

4.3 Antikörper

4.3.1 Antikörper zur Western-Blot-Analyse

4.3.1.1 Primärantikörper

Die Antikörper wurden in der vom Hersteller angegebenen Menge in 5% Milchpulver in TBS-Tween verdünnt.

Antikörper	Firma	Quelle
4E-BP1	Cell signalling	Kaninchen
Akt	Cell signalling	Kaninchen
Bak	Upstate	Kaninchen
Bcl-x _L	Cell signalling	Kaninchen
Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology	Maus
Bid	Cell signalling	Kaninchen
Bim	Epitomics	Kaninchen
Caspase-3	Cell signalling	Kaninchen
Caspase-9	Upstate	Kaninchen
eIF3A	Cell signalling	Kaninchen
eIF4B	Cell signalling	Kaninchen
eIF4E	Cell signalling	Kaninchen
eIF4G	Cell signalling	Kaninchen
GAPDH	Amnion	Maus
GSK-3 β	Cell signalling	Kaninchen
Mcl-1	Cell signalling	Kaninchen

NOXA	Calbiochem	Maus
p-4EBP1-T70	Cell signalling	Kaninchen
p-Akt- (T308)	Cell signalling	Kaninchen
p-Akt- (S473)	Cell signalling	Kaninchen
p-eIF4E	Cell signalling	Kaninchen
p-eiF4G	Cell signalling	Kaninchen
p-GSK-3 β (S21/9)	Cell signalling	Kaninchen
p β - Catenin	Cell signalling	Kaninchen
p97/DAP5	Cell signalling	Kaninchen
PARP	Cell signalling	Kaninchen
Puma	Epitomics	Kaninchen
β -Aktin	Sigma	Maus
Ubiquitin (P4D1)	Cell signalling	Maus
USP9X	Novus Biologicals	Kaninchen
β -Catenin	Cell signalling	Kaninchen

4.3.1.2 Sekundärantikörper

Die Sekundärantikörper anti-rabbit IgG (gekoppelt an Meerrettichperoxidase) sowie anti-mouse IgG (gekoppelt an Meerrettichperoxidase) wurden von der Firma GE Healthcare bezogen und 1:2000 in 5% Milchpulver in TBS-Tween verdünnt.

4.4 Inhibitoren

Inhibitor	Firma
ZVAD-fmk	Bachem
GSK-3 β -Inhibitor XV	Calbiochem
LY294002	Cell signalling

4.5 siRNA für die Transfektion

Die in dieser Arbeit aufgeführten Mcl-1, Puma, USP9X ON-TARGET SMART POOL-siRNAs inklusive der grün fluoreszierenden siRNA für die Bestimmung der Transfektionseffizienz und die siCONTROL NON-TARGETING pool siRNA wurden von Dharmacon bezogen.

4.6 Verbrauchsmaterial

Material	Firma
Einfrierröhrchen	Sarstedt
Eppi 1,5 ml	Sarstedt
FACS-Röhrchen	Sarstedt
Filterpapier Whatman	Roth
Kopierfolien	Impega
Küvetten (4mm) für die Elektroporation	Bio-Rad
Neubauer Einwegzählkammer	Biochrom
PVDF- Membran	Roche
Film zur Auswertung der Western- Blots	GE Healthcare
Zellkulturflaschen	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen (15 ml/50 ml)	Sarstedt

4.7 Geräte

Gerät	Firma
Mr. Frosty (Mit Isopropanol gefüllter Container zur Cryoconservierung von Zellen)	Nalgene® Labware
Anthos 2010 Microplate Reader	Anthos Labtec Instruments GmbH
Begasungsbrutschrank	Heraeus- Kendro/ HERACell 240
Bestrahlungsgerät	Siemens/ Linearbeschleuniger LINAC G
Elektroporator EPI2500	Fischer
FACSCalibur™ Durchflusszytometer	Becton Dickinson

Magnetrührer MR 3001	Heidolph
Microplate reader für den Aktivitätsassay	Infinite 200, Tecan
Mikroskop	Hund Wetzlar/ Wilovert S
pH-Meter	Knick/ pH-Meter 761, Calimatic
Pipetboy	Integra Biosciences/ Pipetboy acu/ Pipetboy comfort
Pipette	Eppendorf/ Research Pipette
SDS-Gelelektrophoresekammer	Bio Rad
Spannungsgenerator	Bio- Rad/ PowerPac 300, Biometra/ Standard Powerpack P25
Sterile Werkbank	Labotect/ SterilGARD III, Modell SG 403DIN
Thermoschüttler	Eppendorf/ Thermomixer compact
Transferkammer	Trans- Blot ® Electrophoretic Transfer Cell
Waage	Kern/ Präzisionswaage
Wasserbad	Thermo Scientific/ Haake DC10-P21
Wipptisch	Biometra/ Mini- Taumel- Wipptisch WT17
Zentrifugen	<ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf/ Centrifuge 5417R, Centrifuge 5804R • Hettich/Rotanda RPC Laborzentrifuge • Sorvall® SUPER T21, Rotor SL- 50T

4.8 Zelllinien

Die strahlensensitiven Jurkat E6.1-T-Lymphom-Zellen sowie K562-Zellen wurden von der **American Type Culture Collection (ATCC)**, Bethesda, MD, USA bezogen. Der in dieser Arbeit benutzte strahlenresistente Subklon entwickelte sich über einen langen Kultivierungszeitraum spontan aus den Jurkat E6.1-Zellen.

5. Methoden

5.1 Zellkultur

5.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen in einem Zellinkubator bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphärengehalt kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) 1640 mit 10% FCS (Fetal Calf Serum)-Zusatz verwendet.

5.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden 15 Millionen Zellen 5 Minuten lang bei 500xg zentrifugiert. Das Zellpellett wurde anschließend in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert und in Einfrierröhrchen überführt. Das Einfriermedium bestand aus RPMI-Zellkulturmedium ergänzt mit 20% FCS und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid).

Die Zellen wurden dann im „Mr. Frosty“ Gefriergefäß bei -80°C über Nacht eingefroren, bevor sie im flüssigen Stickstoff gelagert wurden.

Das Auftauen der kryokonservierten Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Die Zellen wurden einmal mit dem RPMI-Zellkulturmedium gewaschen, um das toxische DMSO zu entfernen. Anschließend wurden sie über Nacht in 10 ml RPMI-Zellkulturmedium mit weiterem Zusatz von 10% FCS aufgenommen. Die Zellen wurden schließlich wie oben beschrieben weiter kultiviert.

5.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zählkammer besteht aus vier Feldern, die jeweils aus 16 Quadranten zusammengesetzt sind. Die Proben wurden 1:1 mit Trypanblau gemischt und 10 µl hiervon in die Injektionsöffnung pipettiert.

Berechnung der Zellzahl:

Zellen pro ml = Durchschnittswert pro Feld (16 Quadranten) x Verdünnungsfaktor x Volumenfaktor (10 000)

5.2 Transfektion von Zellen

Zur Transfektion wurden 3×10^6 Zellen in einem Zentrifugierröhrchen abzentrifugiert (172,1 xg, 5 min). Das Zellpellett wurde in 300 µl RPMI-1640 Medium ohne Phenolrot+ 10% FCS aufgenommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Folglich wurden den Zellen die entsprechenden Mengen an siRNA hinzugegeben und in 0,4 cm-breite Küvetten pipettiert. Die Elektroporation erfolgte bei den sensitiven Jurkat-Zellen bei 370 V für 10 ms und beim resistenten Klon bei 370 V für 8 ms. Die Elektroporation der K562-Zellen erfolgte bei 340 V für 5 ms. In beiden Fällen wurde ein Rechteckimpuls verwendet. Dabei handelt es sich um einen Impuls, für dessen Dauer ein konstanter Volt-Wert eingestellt wird. Elektroporierte Zellen wurden in kleinen Zellkulturflaschen mit Zellkultur-Medium ohne Phenolrot überführt. Das Phenolrot, das als Farbindikator für den pH-Wert dient, würde auf die durch die Elektroporation gestressten Zellen toxisch wirken und wurde deswegen in den ersten 24 Stunden nach Elektroporation durch das Medium ohne Phenolrot ersetzt. Als Kontrolle dienten mit nt-siRNA (**n**on **t**argeting) elektroporierte Zellen. Hierbei handelt es sich um eine siRNA, die gegen keine mRNA des Zellsystems gerichtet ist. Eine eventuelle Bestrahlung der Zellen erfolgte 48 Stunden nach der Elektroporation.

5.3 Stimulierung der Zellen

Zellen wurden bei Raumtemperatur mit 6 MV-Photonen an dem Linearbeschleuniger LINAC bei einer Dosis/ Leistung von 10 Gy/min bestrahlt.

5.4 Bestimmung der Apoptose

5.4.1 Durchflusszytometrie/ FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)

Während der Apoptose verändern Zellen ihre Zellmorphologie. Bei der Durchflusszytometrie (Zytometrie = Zell-Vermessung) werden Zellen anhand ihrer Streulicht- oder Fluoreszenzeigenschaften nach Markierung der Zellen mit einem geeigneten Farbstoff charakterisiert. Diese Methode ermöglicht es, die morphologischen Eigenschaften der Zellen vor und nach Bestrahlung zu

ermitteln, zu quantifizieren und zu vergleichen. Es ist somit möglich, geschädigte von gesunden Zellen zu unterscheiden.

Die Zellen passieren dabei einzeln einen Lichtstrahl, der in Abhängigkeit von den Eigenschaften der Zellen verändert wird. Das vorwärts durchgehende Licht (FSC= **F**orward **S**catter) entspricht der Größe der Zelle. Das seitwärts eingestrahlte Licht (SSC= **S**ideways **S**catter) ist ein Maß für die Granularität der Zelle. Diese zwei Werte werden für jede Zelle ermittelt und in einem sogenannten Dot-Plot dargestellt. Da Zellen, die sich in der Apoptose befinden kleiner und granulärer sind, können mit dieser Methode vitale und apoptotische Zellen durch Bildung zweier Punktpopulationen voneinander getrennt betrachtet werden.

Neben den Streulichteigenschaften können Zellen auch, wie unten folgend, nach weiteren Eigenschaften, wie z.B. der DNA-Fragmentierung und dem mitochondrialen Membranpotential, beurteilt werden. Mit einem Fluoreszenzstoff markierte Zellen können mit einem Laserstrahl bei geeigneter Wellenlänge des Lichts angeregt werden. Nach Anregung emittiert die Zelle unterschiedliche Intensitäten von Licht, welche nach Passage durch entsprechende Filter mittels Detektoren untersucht werden können.

5.4.1.1 Quantifizierung der DNA- Fragmentierung

Apoptotische Zellen gehen unter anderem eine Zell-Fragmentierung ein. Mit Hilfe einer etablierten Methode lassen sich Zellen mit diploiden und hypodiploiden Kernen quantifizieren (Nicoletti et al., 1991). Dabei wurde im Rahmen dieser Arbeit ein etwas abgeändertes Protokoll nach Nicoletti verwendet.

Nach Färbung mit Propidiumiodid in einem isotonischen Puffer und durchflusszytometrischer Messung wurde der prozentuale Anteil hypodiploider Zellen (subG1-Anteil) bestimmt. Während der Messung wurden die Zellen mit einem Laserstrahl (monochromatisches Licht, 488 nm) angeregt, wonach das emittierte Licht durch den roten Emissionsfilter passierte. Dieses Licht konnte daraufhin gemessen und durch eine spezielle Software (BD CellQuest Pro) dargestellt werden. Da die Propidiumjodid-Lösung detergenzhaltig ist, dringt sie in alle Zellkerne ein, um dort mit der DNA zu interkalieren. Je nach DNA-Gehalt

fluoresziert die DNA nach Behandlung mit dem Fluoreszenzfarbstoff unterschiedlich stark. Die Intensität des emittierten Lichts und der DNA-Gehalt in der Zelle stehen in einem direkten Verhältnis. Die Zellpopulation wurde im FSC/SCS Dot-Plot identifiziert und der kleinteilige Zellschrott „herausgegated“. Die Fluoreszenz-Intensitätsverteilung der Zellpopulation wurde in Histogrammen über einen Bereich der relativen Fluoreszenzintensitäten von 10^0 bis 10^4 dargestellt (Abb.7, B). Aus dieser Darstellung ergibt sich ein Zell-Verteilungsmuster, das abhängig vom DNA-Gehalt der Zelle ist. Die Peaks stellen die Zellzyklusphase G1 (einfacher Chromosomensatz) und G2/M (doppelter Chromosomensatz) dar. Die Zellen unterhalb der Fluoreszenzintensitäten von G1 weisen DNA-Fragmentierung auf (subG1), jene oberhalb von G2 (HyperG) sind polyploid (siehe Abb.7, B).

Bei der Messung nach Nicoletti wurde der Anteil der Zellen gemessen, der sich im sub G1-Bereich befand. Dazu wurden 100 000 Zellen/ml auf 24-Well-Platten verteilt und mit 10 Gy bestrahlt. Die Zellen wurden in FACS-Röhrchen abzentrifugiert und je mit 200 μ l Propidiumjodid-Lösung 30 min lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Hiernach erfolgte die Messung am FACS-Gerät.

Um die Transfektionseffizienz und die Viabilität der Zellen nach Transfektion (siehe 5.2) mit siRNA zu überprüfen, wurden die Zellen mit 400 nM grün fluoreszierender siGLO-siRNA transfiziert. Diese mit Farbstoff markierte siRNA wird bekanntlich im Nukleus der Zelle aufgenommen und signalisiert die Transfektionseffizienz. Mittels durchflusszytometrischer Messung wurde durch Propidiumjodid-Ausschlussfärbung die Zelltodrate festgestellt, indem vitale, fluoreszierende und die durch die Spannungsimpulse abgetöteten Zellen getrennt quantifiziert wurden. Bei dieser Methode enthält die Propidiumjodid-Färbelösung kein Detergenz. Das Propidiumjodid dringt somit nicht durch intakte Membranen gesunder Zellen, sondern färbt nur tote Zellen, welche bereits permeable Membranen aufweisen.

5.4.1.2 Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$)

Eine weitere Eigenschaft, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, ist das mitochondriale Membranpotential. Es wird durch den in der Atmungskette

produzierten elektrochemischen Gradienten erzeugt. Während der Apoptose kommt es zu einem Zusammenbruch dieses Potentials, während es in gesunden Zellen intakt bleibt.

TMRE (Tetramethylrhodamin-ethyl-ester-perchlorat) ist ein membranpermeabler und für das mitochondriale Potential spezifischer Farbstoff. Bei intaktem mitochondrialem Membranpotential akkumuliert der Farbstoff in den Mitochondrien, während er bei Zusammenbruch desselben aus den Mitochondrien diffundiert. Gesunde Zellen mit intaktem mitochondrialem Membranpotential weisen eine höhere Fluoreszenzintensität auf (TMRE high= $\Delta\Psi_mH$) als solche mit zusammengebrochenem mitochondrialem Membranpotential (TMRE low= $\Delta\Psi_mL$).

Das Emissionsspektrum von TMRE wurde im Durchflusszytometer durch den orange-roten Filter (FL-2; Emissionsmaximum 590nm) detektiert und gegen das Seitwärtsstreulicht aufgetragen.

Dazu wurden 100 000 Zellen/ml auf 24-Well-Platten verteilt und mit 10 Gy bestrahlt. Die Zellen wurden in FACS-Röhrchen abzentrifugiert und je mit 200 μ l TMRE-Färbelösung (Endkonzentration 25 nM) behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Hiernach erfolgte die Messung am FACS-Gerät.

5.5 Western-Blot zum Nachweis der Proteinexpression

Zur Überprüfung der Expression verschiedener Proteine wurden Lysate hergestellt und Western-Blots durchgeführt. Dazu wurden Zellen lysiert und die Lysate per SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran transferiert. Für die Detektion wurde diese zuerst mit einem spezifischen Erstantikörper inkubiert und danach mit einem gegen den Erstantikörper gerichteten Sekundärantikörper, an dem das Enzym HRP (engl. **H**orse **R**addish **P**eroxidase, Meerrettichperoxidase) gekoppelt war. Das bei der Umsetzung der anschließend zugegebenen Substratlösung emittierte Licht wurde als Banden auf einem Röntgenfilm nachgewiesen.

5.5.1 Herstellung von Lysaten

Für die Herstellung der Lysate wurden 2×10^6 Zellen 10 min mit 172 xg bei Raumtemperatur in einem 50 ml Zentrifugierröhrchen abzentrifugiert. Nachdem das Medium abgesaugt wurde, erfolgte ein Waschschrift des Zellpellets mit 200 μ l PBS. Danach wurden die in PBS suspendierten Zellen mit einer Pipette aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zentrifugation mit 172 xg wurde das PBS abgesaugt. Auf die Zellpellets wurden 200 μ l / 2×10^6 Zellen des Lysepuffers hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen 30 min lang auf Eis inkubiert. Zur Gewinnung der Proteinextrakte wurden die lysierten Zellen 15 min mit 20000 xg bei 4°C zentrifugiert und der Überstand (das Lysat) in ein neues Gefäß überführt.

5.5.2 Proteinbestimmung

Um eine gleichmäßige Beladung der Geltaschen zu gewährleisten wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Dazu wurden in einer 96-well-Platte 1 μ l des Lysats in 200 μ l des mit destilliertem Wasser 1:5 verdünnten Protein-Farbstoffkonzentrats von BioRad gegeben. Außerdem wurde als Referenz auf derselben Platte eine BSA-Standardverdünnungsreihe pipettiert. Kurz danach wurde die Extinktion mit dem Spektralphotometer, das von der zugehörigen Software von Anthos gesteuert wurde, bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen.

Es ergaben sich verschiedene Werte für die optische Dichte, die durch die Software in einer Tabelle dargestellt wurden. Anhand der Extinktionswerte und der angefertigten BSA-Eichgeraden wurden die Konzentrationen der einzelnen Proben ausgerechnet. Die Punkte auf der Eichgeraden ergaben zunächst einen linearen und bei großen X-Werten (pipettiertes Volumen) einen abflachenden Verlauf. Als Y-Wert diente die errechnete BSA-Konzentration. Durch den linearen Bereich konnte eine Regressionsgerade gelegt werden. Mit Hilfe der zugehörigen Geradengleichung konnte die Proteinkonzentration der Proben in den einzelnen Vertiefungen bestimmt werden. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte stets dreifach, wodurch ein Mittelwert ermittelt wurde.

5.5.3 Probenvorbereitung

Die Lysate wurden mit Lysepuffer und 4x SB (**S**ample **B**uffer; Probenpuffer) auf die gleiche Proteinmenge eingestellt. Die Zugabe des 2-Mercaptoethanols (5% im Lysat) diene der Reduktion der Disulfidbrücken, SDS (**S**odium **D**odecyl **S**ulfate) der Denaturierung. Negativ geladenes SDS lagert sich stöchiometrisch an die Aminosäuren einer Polypeptidkette an. Dadurch erhält man eine negative Gesamtladung des Proteins, die proportional zu dessen molekularen Masse ist. Bei der Elektrophorese (siehe 5.5.4) wandert so das Protein im elektrischen Feld zum Pluspol. Für die vollständige Denaturierung der Proteine wurden die Proben 15 Minuten lang bei 99 °C im Thermoschüttler inkubiert. Die Lysate wurden für den mehrmaligen Gebrauch bei –20 °C aufbewahrt.

5.5.4 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese)

Die denaturierten Proteine wurden nach dem Molekularsiebprinzip des Polyacrylamid-Gels nach der Größe aufgetrennt. Hierfür wurden mit einer Hamilton-Spritze eine bestimmte Menge des Lysats bzw. Proteinmarkers in die Geltaschen gefüllt. Anschließend wurden die Gelelektrophoresekammern an ein Netzgerät angeschlossen. Die Proteine wurden zunächst mit einer Spannung von 60 V an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel fokussiert. Danach wurde zum Auftrennen der Proteine eine Spannung von 160 V angelegt. Es wurden, je nach Proteingröße, verschiedenprozentige Gele benutzt. Als Puffer wurde der SDS-Puffer von BioRad verwendet, der für den Gebrauch 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde.

5.4.1 Zusammensetzung der Gele:

Für ein Gel:

	Trenngel 8%	10 %	12%	14 %	Sammelgel 6%
Destilliertes Wasser	7,25 ml	6,25 ml	5,25 ml	4,25 ml	1875,0 µl
Trennpuffer	3750 µl	3750 µl	3750 µl	3750 µl	-
Sammelpuffer	-	-	-	-	875,0 µl
Gel 30	4,00 ml	5,00 ml	6,00 ml	7,00 ml	750,0 µl

APS 10%	75,0 µl	75,0 µl	75,0 µl	75 µl	35,0 µl
TEMED	7,5	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	3,5 µl
SDS (20%)	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	-

5.5.5 Detektion der Proteine

Nach der Auftrennung der Proteine erfolgte der Transfer auf eine PVDF-Membran. Zu diesem Zweck wurde das Gel mit der PVDF-Membran, Filterpapier und Schwämmchen zur Polsterung in eine Transferkassette überführt und bei 0,8 A in einer mit Transferpuffer gefüllten Trans-Blot®-Transferkammer 90 min lang geblottet. Falls Proteine im größeren Bereich detektiert werden mussten, wurde die Transferdauer auf 120 min erhöht. Nach dem Transfer wurden die auf die PVDF-Membran übertragenen Proteine mit Ponceau S Lösung (1:20 in destilliertem Wasser verdünnt) angefärbt.

Für den immunologischen Nachweis der Proteine auf der Membran wurde die PVDF-Membran zunächst für 1 Stunde mit 5 % Milchpulver in TBS-Tween inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran, an die die Antikörper unspezifisch binden könnten, abzudecken. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4°C auf einem Wipptisch mit dem Erstantikörper inkubiert. Der Antikörper lag in der vom Hersteller angegebenen Konzentration in einer 5%-igen Milchpulver-TBS-Tween-Lösung vor. Um die Membran von nicht gebundenen Antikörpern zu befreien, wurde sie 3 Mal für je 5 Minuten und 2 Mal für je 10 Minuten in TBS-Tween gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper in Blocklösung (1:2000) inkubiert und danach erneut 3 Mal für je 5 Minuten und 2 mal für je 10 Minuten in TBS-Tween gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran einige Sekunden lang mit ECL (**E**nhanced **C**hemoluminescence)-Lösung inkubiert und anschließend zwischen zwei Folien in einer Filmkassette glatt gestrichen. Das Entwickeln der Filme erfolgte nach dem Chemolumineszenzprinzip.

Das Sichtbarwerden der Banden nach dem Auflegen eines Films auf die Membran wird durch die katalytische Reaktion durch die Meerrettichperoxidase

verursacht, die Luminol in seine oxidierte Form umsetzt. Hierbei werden Lichtquanten frei, die eine lokale Belichtung des Films verursachen.

5.5.6 Densitometrie

Die Darstellung der Proteinmenge wurde mit Hilfe des Image J-Programms durchgeführt. Die Bildauswertung mit Image J basiert auf eine quantitative Intensitätsmessung der dunklen Farbmenge pro Fläche (Farbdichte).

5.7 Datenanalyse

Alle Experimente wurden mindestens drei Mal durchgeführt. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten repräsentieren entweder den Mittelwert (Durchflusszytometrie) und die Standardabweichung oder ein repräsentatives Ergebnis (Western-Blot). Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde anhand des two-way ANOVA Tests mit der GraphPad Software (www.graphpad.com) errechnet.

6. Ergebnisse

6.1 Apoptose in Jurkat- Zellen

6.1.1 Ionisierende Strahlung induziert den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, DNA-Degradierung und Caspasenaktivierung in Jurkat-Zellen

Die DNA-Fragmentierung und der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) mit der daraus folgenden Freisetzung von Cytochrom c und Aktivierung von Caspasen sind wichtige Merkmale des Apoptosevorgangs. Um diese Phänomene in den vorhandenen Zelllinien zu untersuchen, wurden Jurkat-Zellen mit 10 Gy bestrahlt und die DNA-Fragmentierung sowie der Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ durchflusszytometrisch untersucht.

Bei der Messung des $\Delta\Psi_m$ berücksichtigte man die Zellen mit niedrigen $\Delta\Psi_m$ ($\Delta\Psi_mL$), während bei der Untersuchung nach Nicoletti die Zellen im SubG1-Bereich quantifiziert wurden.

Abb.7 zeigt $\Delta\Psi_m$ -Messungen von Jurkat-Zellen 48 h nach Bestrahlung und der dazu gehörigen unbestrahlten Kontrollen (Abb.7, A) sowie Messungen zur Quantifizierung der DNA-Fragmentierung nach 72 h (Abb.7, B). Die Ergebnisse zeigen nach Bestrahlung einen wesentlich höheren Anteil der Zellen mit zusammengebrochenem $\Delta\Psi_m$ und degradiertem DNA als bei den unbestrahlten Kontrollen.

Die Analyse der Caspasenaktivierung nach Bestrahlung erfolgte mittels Western-Blot-Technik (Abb.8). Hierbei wurden Jurkat-Zellen bestrahlt und daraus nach 4, 8, 12 und 24 h Ganzzelllysate hergestellt. Nach Bestrahlung sah man eine deutliche Caspasenaktivierung (Abb.8, links). Bereits 4 h nach Bestrahlung war eine Aktivierung der Caspase-9, nach 8 h eine Prozessierung von Caspase-3 zu erkennen. Gleichzeitig wurde die Spaltung des Caspase-3 Substrats PARP detektiert. Nach 8 h wurde eine deutliche Spaltung dieses Proteins festgestellt. Nach 12 und 24 h nahm das Level an unprozessiertem PARP weiterhin ab.

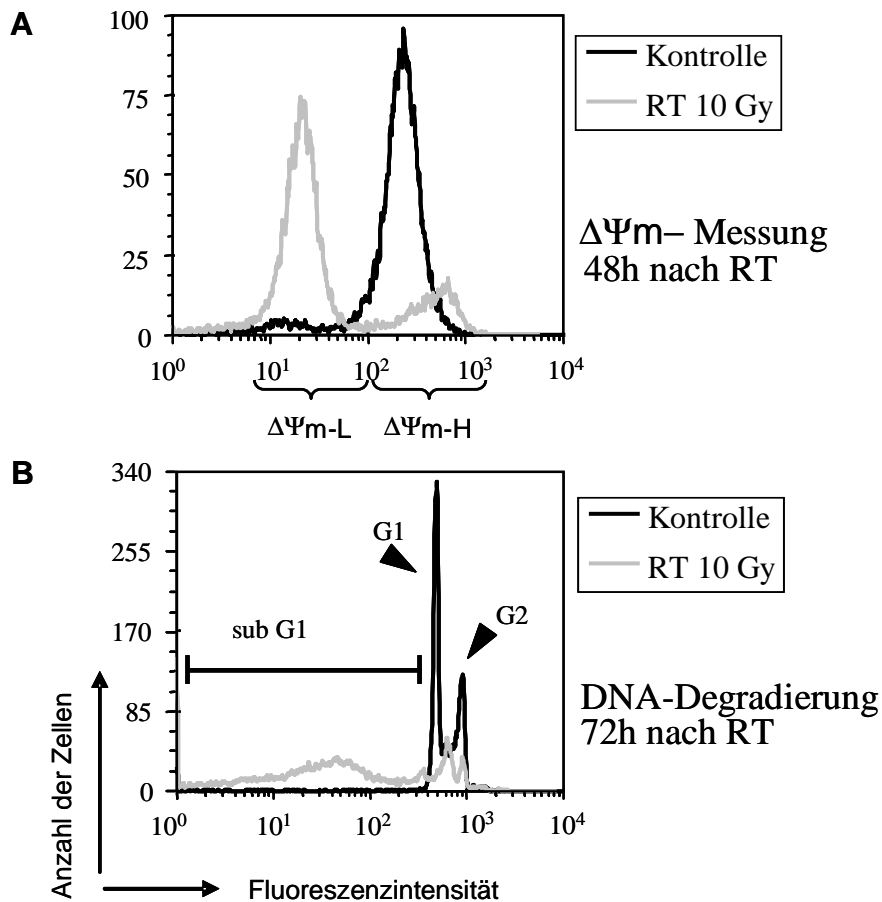


Abb.7: Einfluss ionisierender Strahlung auf Jurkat E6.1 Zellen. Jurkat E6.1-Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt. $\Delta\Psi m$ (A) und die DNA-Degradierung (B) wurden 48 h bzw. 72 h nach Bestrahlung durchflusszytometrisch quantifiziert. Dabei wurde die Anzahl der untersuchten Zellen in Beziehung zur relativen Fluoreszenzintensität gesetzt. Als Kontrolle dienten unbestrahlte Zellen. Die Abbildungen machen eine Anhäufung von Zellen mit niedrigem mitochondrialem Membranpotential ($\Delta\Psi m$ L) deutlich sowie eine Ansammlung von Zellen im subG1-Bereich. Die Ergebnisse zeigen somit, dass ionisierende Strahlung den Zusammenbruch von $\Delta\Psi m$ und die DNA-Degradierung in Jurkat-Zellen induziert.

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass ionisierende Strahlung den Zusammenbruch des mitochondrialen Potentials sowie die DNA-Degradierung induziert. Außerdem werden in Jurkat-Zellen für die Apoptose notwendige Caspasen wie Caspase-3 und -9 prozessiert.

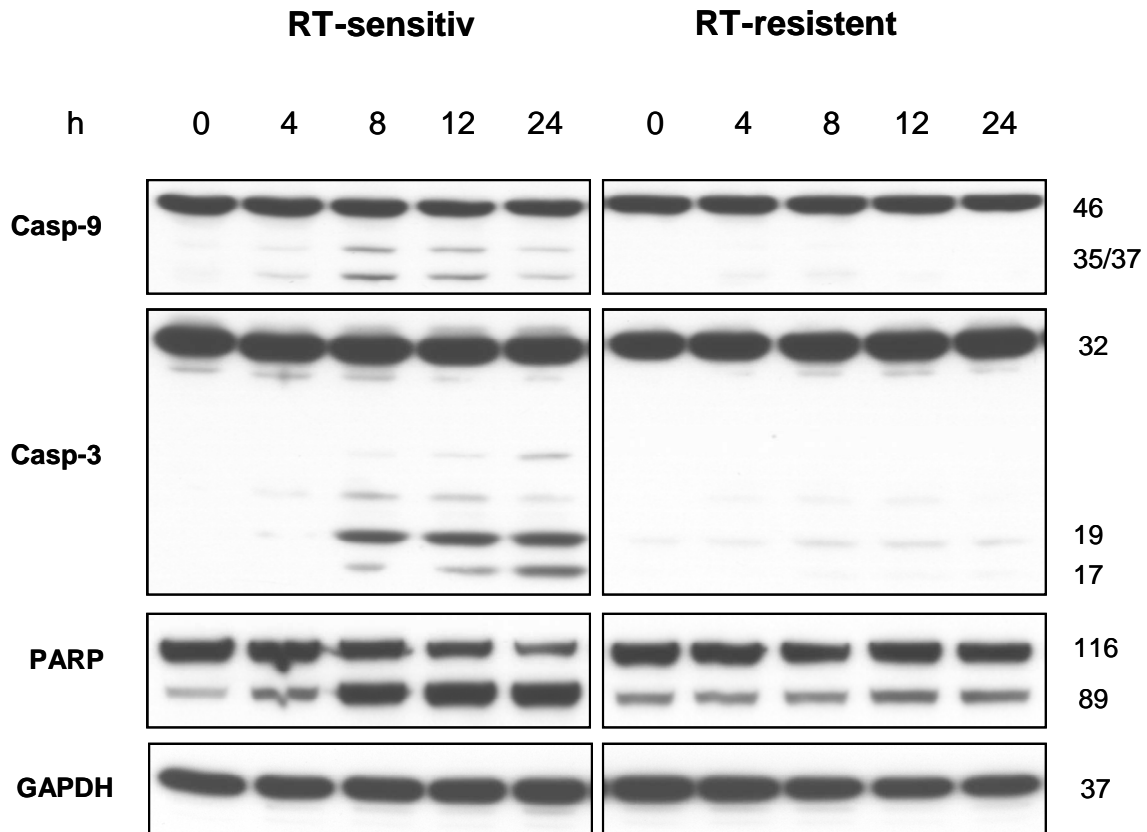


Abb.8: Caspasenaktivierung in strahlensensitiven und -resistenten Jurkat Zellen. Strahlensensitive und -resistente Jurkat E6.1-Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt. Ganzzelllysate wurden 0, 4, 8, 12 und 24 h nach Bestrahlung hergestellt und mittels Western-Blots analysiert. GAPDH diente als Ladungskontrolle. Während in strahlensensitiven Zellen eine deutliche Caspasenaktivierung (Prozessierung von Caspase-9 (Casp-9) und Caspase-3 (Casp-3)) zu erkennen ist, kann man dies in strahlenresistenten Zellen nicht erkennen (nach Trivigno et al., 2012).

6.1.2 Einfluss ionisierender Strahlung auf Jurkat- Zellen

In der Folge wurden Effekte ionisierender Strahlung auf Jurkat E6.1-Zellen näher untersucht. Abb.9, A zeigt durchflusszytometrische Messungen des Zusammenbruchs des $\Delta\Psi_m$ und der DNA-Fragmentierung in Jurkat-Zellen und in einem sich daraus entwickelten Subklon nach Bestrahlung. Die Ergebnisse zeigen, dass in Jurkat-Zellen bereits 24 h nach Bestrahlung bei mehr als der Hälfte der Zellen $\Delta\Psi_m$ zusammengebrochen war, während dies bei dem Subklon auf wesentlich weniger Zellen zutraf. 48 h nach Bestrahlung wiesen mehr parenterale Jurkat E6.1-Zellen eine DNA-Fragmentierung auf als die Zellen des Subklons. Abb.9, B zeigt den prozentualen Anteil der Zellen, die nach Bestrahlung ein zusammengebrochenes $\Delta\Psi_m$ (links) und eine

fragmentierte DNA (rechts) aufwies im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen. Dabei wurde in einem Diagramm die Quantität der Zellen in Prozent im Verhältnis zur Zeit nach Bestrahlung erfasst. Der Zusammenbruch des mitochondrialen Potentials und die DNA-Fragmentierung verlief in beiden Zellklonen zeitabhängig, in den sensitiven Zellen jedoch bedeutend schneller als in den resistenten. Der Unterschied zwischen strahlensensitiven und -resistenten Zellen war stets hochsignifikant.

Die Caspasenaktivierung wurde im Subklon ebenfalls bestimmt (Abb.8, rechts). Western-Blot-Analysen ergaben, dass im Subklon kaum eine Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3 sowie nur eine schwache Spaltung von PARP zu detektieren war. Aufgrund dieser Unterschiede werden die parenteralen Jurkat-Zellen im weiteren Verlauf der Arbeit als RT-(Radiotherapie) sensitiv und der Subklon als RT-resistent bezeichnet.

Zusammenfassend kann von einer viel stärkeren und schnelleren Apoptoseinduktion nach Bestrahlung in strahlensensitiven Zellen als im strahlenresistenten Subklon gesprochen werden.

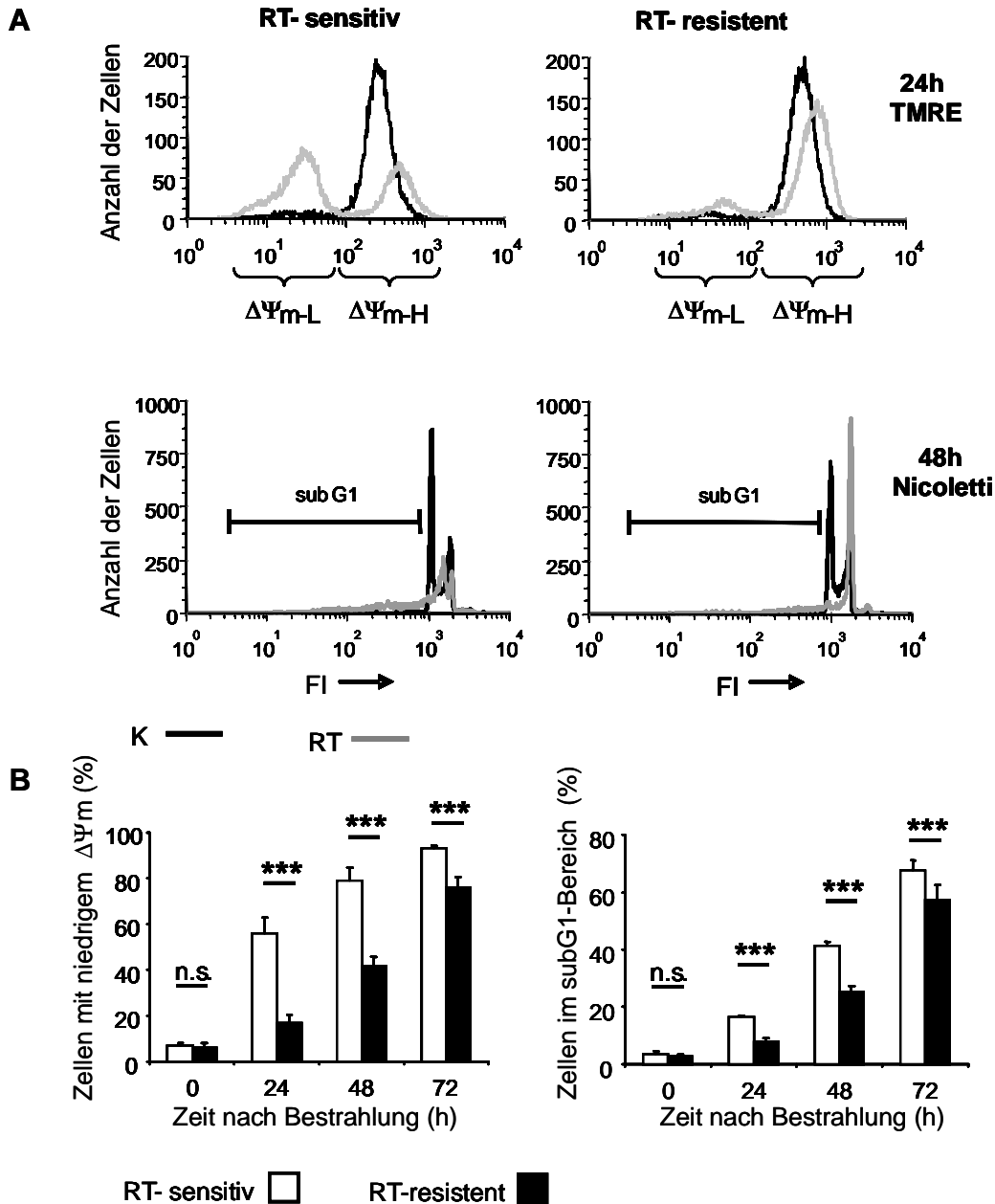


Abb.9: Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ und DNA-Fragmentierung in sensitiven und resistenten Jurkat-Zellen im Vergleich. RT-sensitiven und -resistenten Jurkat E6.1-Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt. Zusätzlich wurden unbestrahlte Proben hergestellt (K). $\Delta\Psi_m$ (A, oben) und DNA-Degradierung (A, unten) der RT-sensitiven und -resistenten Zellen wurden quantifiziert und miteinander verglichen. Dabei wurde die Anzahl der Zellen in Abhängigkeit von der relativen Fluoreszenzintensität (FI) dargestellt. B zeigt Ergebnisse RT-sensitiver und -resistenter Zellen im Zeitverlauf. Die Anzahl der Zellen mit niedrigem $\Delta\Psi_m$ und die Anzahl der Zellen, die sich im subG1-Bereich befanden, wurden in Relation zur Zeit nach Bestrahlung gesetzt. Die Induktion des mitochondrialen Zusammenbruchs und der DNA-Degradierung verlief in beiden Zellklonen zeitabhängig, in den sensitiven jedoch bedeutend schneller als in den resistenten (nach Trivigno et al., 2012). *** $p < 0.001$ n.s. > 0.05

6.1.3 Mcl-1 wird in sensitiven Zellen nach Bestrahlung herunterreguliert und ist essentiell für das Überleben von Jurkat-Zellen

Mcl-1 ist ein anti-apoptotisches Protein, das in vielen Tumorzellen überexprimiert wird und für Strahlenresistenz sorgen kann. Folglich wurde das Level des Proteins in strahlensensitiven und -resistenten Zellen mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Hierfür wurden Zellen mit 10 Gy bestrahlt und 0-24 h nach Bestrahlung lysiert. Die Ergebnisse zeigen eine rasche Herunterregulierung von Mcl-1 bereits 8 h nach Bestrahlung in strahlensensitiven Zellen, während das Level des anti-apoptotischen Proteins in strahlenresistenten Zellen nach Bestrahlung unverändert blieb (Abb.10).

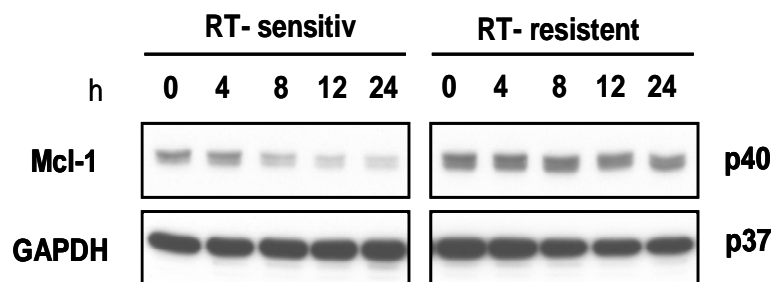


Abb.10: Mcl-1 wird in strahlensensitiven Zellen nach Bestrahlung herunterreguliert. Strahlensensitive und -resistente Jurkat-Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt. Ganzzelllysate wurden 0, 4, 8, 12 und 24 h nach Bestrahlung hergestellt. GAPDH diente als Ladungskontrolle. Nach Bestrahlung konnte eine deutliche Abnahme des Mcl-1-Levels in sensitiven Zellen beobachtet werden, während in resistenten Zellen das Mcl-1-Level unverändert blieb (nach Trivigno et al., 2012).

Um die Relevanz des anti-apoptotischen Proteins für das Überleben der Zellen zu untersuchen, wurden strahlensensitive und -resistente Jurkat-Zellen mit 500 nM Mcl-1-siRNA elektroporiert. Als Kontrolle dienten mit nt-siRNA (non targeting) elektroporierte Zellen. 3 und 6 h nach Bestrahlung wurden die Zellen lysiert. Die Western-Blot-Analysen zeigten 6 h nach Elektroporation eine deutliche Herunterregulierung von Mcl-1 im strahlensensitiven und -resistenten Subklon (Abb.11, A). Da Mcl-1 vor allem am Mitochondrium protektiv wirkt, wurden zusätzlich 6 h nach Elektroporation durchflusszytometrische Messungen des $\Delta\Psi_m$ durchgeführt. Diese Messungen ergaben bereits 6 h nach Elektroporation übereinstimmend mit der Herunterregulierung von Mcl-1

einen signifikanten Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ (Abb.11, B) sowohl in den strahlensensitiven als auch in den -resistenten Zellen.

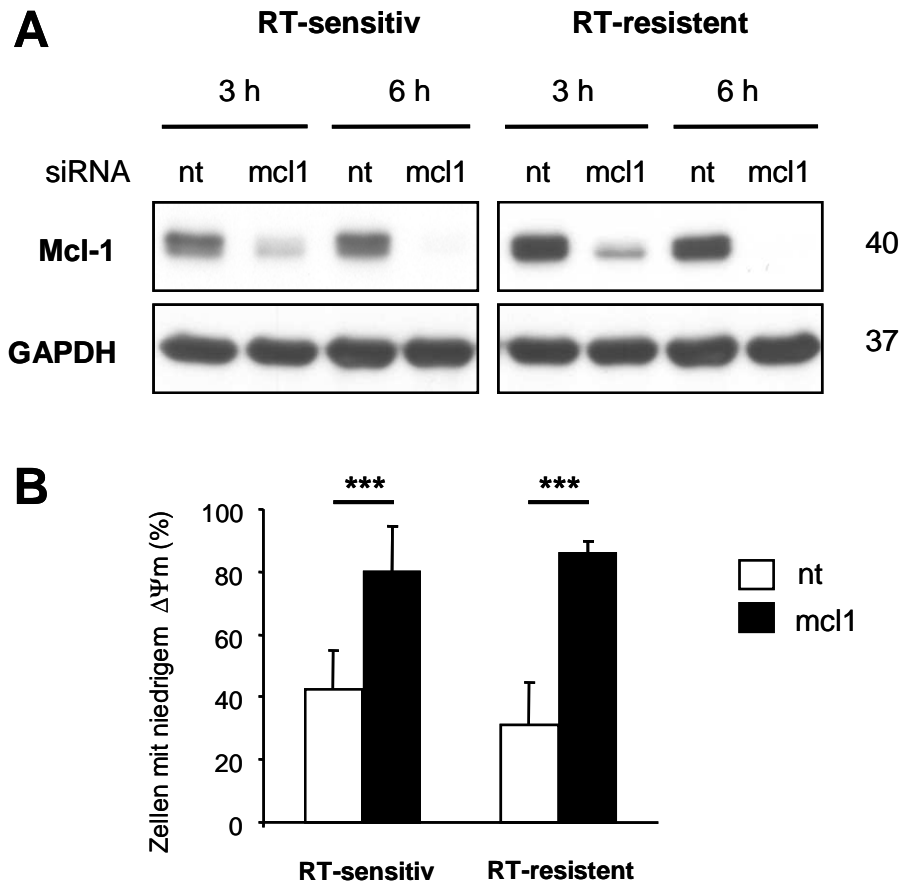


Abb.11: Herunterregulierung von Mcl-1 führt bei RT-sensitiven und -resistenten Zellen zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials
 Strahlensensitive Jurkat-Zellen wurden mit Mcl-1-siRNA (mcl1) oder mit non targeting-siRNA (nt) elektroporiert. **(A)** Lysate wurden 3 h und 6 h nach Elektroporation hergestellt. Die Herunterregulierung des Proteins wurde mittels Western-Blot untersucht. GAPDH diente als Ladungskontrolle. Bereits 3 h nach Elektroporation zeigte sich eine deutliche Herunterregulierung des anti-apoptischen Proteins. Nach 6 h war es kaum detektierbar. **(B)** 6 h nach Elektroporation wurde eine durchflusszytometrische Messung des $\Delta\Psi_m$ durchgeführt. Die Herunterregulierung von Mcl-1 durch siRNA induzierte den Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ in strahlensensitiven und -resistenten Zellen (nach Trivigno et al., 2012). *** $p < 0.001$

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass Mcl-1 sowohl in strahlensensitiven als auch in -resistenten Zellen essentiell für ihr Überleben ist.

6.2 Regulierung von Mcl-1

6.2.1 Regulierung der Translation von Mcl-1 nach Bestrahlung

6.2.1.1 Bestrahlung führt zu einer caspaseabhängigen Prozessierung von eIF4G1, eIF4B und eIF3A, wobei Mcl-1 caspaseunabhängig reguliert wird

Um zu überleben, müssen Jurkat-Zellen sicherstellen, dass ein ausreichend hohes Mcl-1-Level in den Zellen vorliegt. Das Proteinlevel von Mcl-1 kann unter anderem auf der translationellen Ebene kontrolliert werden. Die Translation von Mcl-1 wird hauptsächlich Cap-abhängig reguliert. Deshalb wurde im Folgenden die Proteintranslation nach Bestrahlung untersucht.

Um die Cap-abhängige Proteintranslation nach Bestrahlung zu untersuchen, wurden strahlensensitive und -resistente Jurkat-Zellen mit 10 Gy bestrahlt. Die Zellen wurden 0, 4, 8, 12 sowie 24 h nach Bestrahlung lysiert. Das Level der verschiedenen Proteine wurde mittels Western-Blot-Technik analysiert.

Während das Proteinlevel von eIF4A und eIF4E in sensitiven und resistenten Zellen innerhalb von 24 h nach Bestrahlung keine Änderung zeigte (Abb.12), war ab 12 h nach Bestrahlung nur in den sensitiven Zellen eine Spaltung von eIF3A zu beobachten. Außerdem war sowohl in den sensitiven als auch in den resistenten Zellen nach Bestrahlung eine stetige Abnahme von eIF4B zu sehen. Nach Bestrahlung wurde außerdem eIF4G1 in sensitiven Zellen proteolytisch gespalten. Gleichzeitig wurde eine Abnahme des phosphorylierten eIF4G detektiert. Diese Änderungen wurden jedoch nicht in den resistenten Zellen beobachtet. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass nach Bestrahlung viele Komponenten des translationellen Initiationskomplexes in den strahlensensitiven Zellen abgebaut oder inaktiviert wurden, während kaum Änderungen in den strahlenresistenten Zellen detektiert werden konnten.

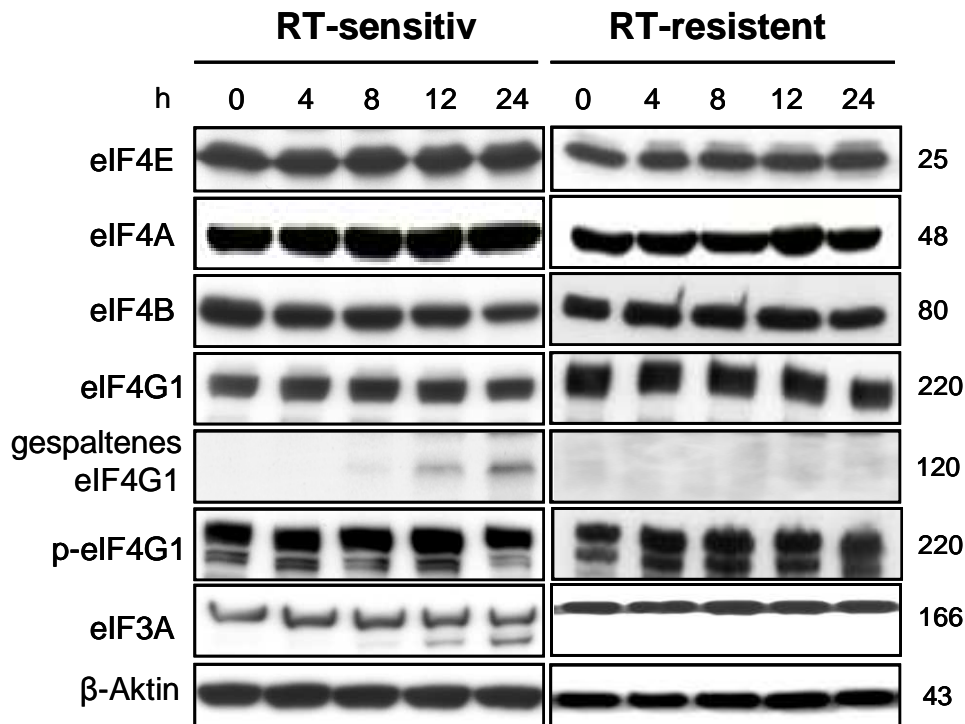


Abb.12: Regulierung der translationellen Initiationsfaktoren durch Bestrahlung. Jurkat-Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt. 0-24 h nach Bestrahlung wurden Lysate hergestellt. Als Ladungskontrolle wurde β -Aktin verwendet. Die Untersuchungen zeigen eine Spaltung von eIF4G1 und eIF3A sowie den Abbau von eIF4B nach Bestrahlung in den sensitiven, aber nicht in den resistenten Zellen (nach Trivigno et al., 2013).

Die Spaltung von Caspase-3 und PARP (siehe Abb.8) korreliert mit der Spaltung der Initiationsfaktoren, so dass ein Zusammenhang zwischen Caspasenaktivierung und Prozessierung der Initiationsfaktoren vermutet wurde. Um zu untersuchen, ob die Spaltung der Initiationskomplexe tatsächlich caspaseabhängig war, wurden Zellen mit 30 μ M des Pancaspase-Inhibitors zVAD 30 min vor Bestrahlung behandelt (Abb.13). Die Western-Blots zeigen, dass eine Vorbehandlung mit zVAD die strahleninduzierte Prozessierung von Caspase-3 und PARP in den sensitiven Zellen inhibierte.

Die Spaltung von eIF4G1 und eIF3A sowie die Abnahme des eIF4B-Levels nach Bestrahlung wurden in den sensitiven Zellen durch den Pancaspase-Inhibitor ebenso verhindert, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die Spaltung von eIF4G1 und eIF3A sowie die Abnahme des eIF4B-Levels nach Aktivierung der Caspasen geschah.

Im Gegensatz dazu konnte in strahlensensitiven Zellen die strahleninduzierte Dephosphorylierung von 4EBP1 und die Abnahme von Mcl-1 durch zVAD nicht

verhindert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass 4EBP1 und Mcl-1 caspaseunabhängig reguliert wurden.

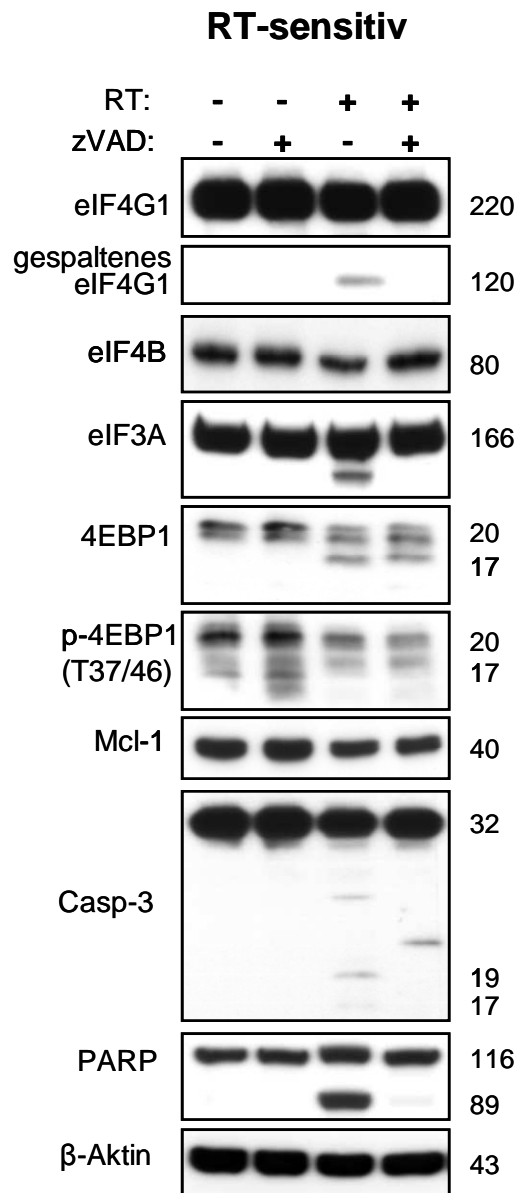


Abb.13: Caspaseunabhängigkeit der 4EBP1-Dephosphorylierung und des Mcl-1-Abbaus. Strahlensensitive Jurkat-Zellen wurden mit 30 µM des Caspase-Inhibitors zVAD oder der entsprechenden Menge des Lösungsmittels vorbehandelt und anschließend mit 10 Gy bestrahlt. Die Ergebnisse zeigen, dass zVAD die strahlungsinduzierte Spaltung von eIF4G1, eIF3A und PARP sowie den Abbau von eIF4B hemmte. Außerdem konnte nach Vorbehandlung mit zVAD und Bestrahlung keine Prozessierung von Caspase-3 (Casp-3) in die aktiven Spaltformen p19 und p17 detektiert werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Spaltung von eIFG1, eIF3A und eIF4B nach Aktivierung der Caspasenkaskade erfolgte. Die Dephosphorylierung von 4EBP1 und der Mcl-1-Abbau nach Bestrahlung konnten hingegen durch Caspaseinhibierung nicht gehemmt werden (nach Trivigno et al., 2013).

Zusammengefasst weisen die Ergebnisse dieser Experimente darauf hin, dass ionisierende Strahlung zu caspaseabhängiger Spaltung der Initiationsfaktoren eIF4G1, eIF3A und eIF4B führt, wohingegen der Translationsinhibitor 4EBP1 bereits vor Caspasenaktivierung dephosphoryliert wird.

6.2.1.2 Die Prozessierung von DAP5 findet caspaseabhängig statt

Durch die folgenden Experimente sollte geklärt werden, ob es Hinweise von einem Wechsel von Cap-abhängiger zu Cap-unabhängiger, d.h. zu DAP5-abhängiger Translation gibt. Es wurde bereits beschrieben, dass die Cap-unabhängige Translation über Spaltung von DAP5 durch Caspasen erhöht werden kann. In der Tat konnte in sensitiven Zellen eine Spaltung von DAP5 nachgewiesen werden, die jedoch in resistenten Zellen nicht zu detektieren war (Abb.14, A). Weiterhin konnte bewiesen werden, dass die Prozessierung von DAP5 caspaseabhängig stattfand. Die Behandlung sensitiver Zellen mit dem Caspaseninhibitor zVAD kurz vor Bestrahlung konnte die durch ionisierende Strahlung verursachte Spaltung von DAP5 verhindern (Abb.14, B). Diese Ergebnisse deuteten auf eine mögliche Aktivierung von DAP5 hin, die in eine vermehrte Cap-unabhängige Translation resultieren könnte.

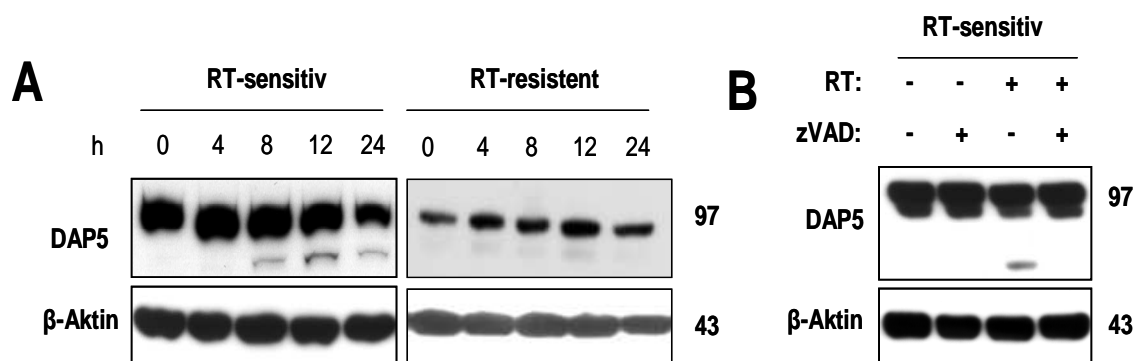


Abb.14: Caspaseinhibitoren können die Prozessierung von DAP5 nach Bestrahlung verhindern. Strahlensensitive und -resistente Jurkat-Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt. 0-24 h nach Bestrahlung wurden Lysate hergestellt. **(A)** Bereits 8 h nach Bestrahlung konnte in den strahlensensitiven Zellen eine Spaltung von DAP5 detektiert werden, die in den strahlenresistenten Zellen nicht detektierbar war. **(B)** Strahlensensitive Jurkat-Zellen wurden mit 30 µM des Caspaseinhibitors zVAD oder der entsprechenden Menge des Lösungsmittels behandelt und 30 min später mit 10 Gy bestrahlt. Aus diesen Zellen wurden Lysate hergestellt und durch Western-Blots analysiert. Die Western-Blots zeigen, dass zVAD die Prozessierung von DAP5 nach Bestrahlung verhinderte (nach Trivigno et al., 2013).

Deswegen wurde die Auswirkung der Cap-abhängigen und -unabhängigen Translation auf das Mcl-1-Level näher zu untersucht. Dazu wurden eIF4G1 und DAP5 mittels siRNA herunterreguliert und mittels Western-Blots analysiert (Abb.15). Außerdem wurden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt und der Zusammenbruch von $\Delta\Psi_m$ sowie die DNA-Degradierung nach Herunterregulierung der beiden Translationsfaktoren quantifiziert. Die Ergebnisse zeigen, dass eIF4G1 und DAP5 48 h nach Elektroporation erfolgreich herunterreguliert werden konnten (Abb.15, A). Die Herunterregulierung von eIF4G1, nicht aber die von DAP5, führte zu einer leichten Abnahme des Mcl-1-Levels. Dieses Resultat zeigt, dass eher eIF4G1 als DAP5 die Translation von Mcl-1 in unbestrahlten Jurkat-Zellen reguliert. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen zeigen jedoch, dass der Mcl-1-Abbau nach Bestrahlung durch Herunterregulierung von eIF4G1 und DAP5 nicht beeinflusst werden konnte (Abb.15, B). Zusätzlich zeigen die durchflusszytometrischen Analysen, dass die Herunterregulierung der einzelnen Translationsfaktoren eIF4G1 und DAP5 nicht ausreichend war, um den Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ und die DNA-Fragmentierung nach Bestrahlung zu erhöhen (Abb.15, C und D). Nur wenn beide Proteine simultan herunterreguliert wurden, konnte eine leichte, aber signifikante Zunahme des Zusammenbruchs von $\Delta\Psi_m$ und der DNA-Fragmentierung nach Bestrahlung beobachtet werden. Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass das Mcl-1-Level in gesunden Jurkat-Zellen von eIF4G1 abhängig ist. Für die strahleninduzierte Abnahme des Mcl-1-Levels sind die Translationsfaktoren eIF4G1 und DAP5 nur von geringer Bedeutung.

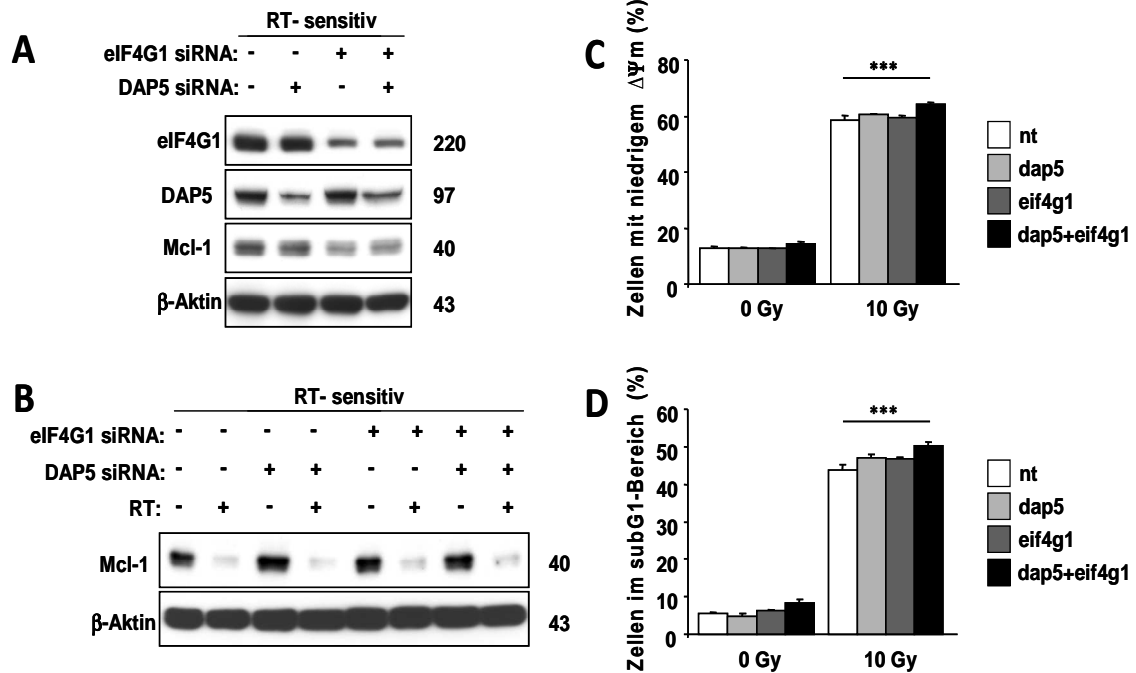


Abb.15: Die Auswirkung der Herunterregulierung von eIF4G1 und DAP5 auf Mcl-1-Level und Apoptoseinduktion. Strahlensensitive Jurkat-Zellen wurden mit 500 nM eIF4G1-siRNA oder 500 nM DAP5-siRNA bzw. gleichzeitig mit je 500 nM eIF4G1-siRNA und 500 nM DAP5-siRNA transfiziert. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit 1 μ M nt-siRNA transfiziert. **(A)** 48 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und mittels Western-Blot analysiert. Die Herunterregulierung von eIF4G1 bewirkte eine Abnahme des Mcl-1-Niveaus, während die Herunterregulierung von DAP5 das Mcl-1-Level nicht veränderte. Dieses Ergebnis deutet auf eine Cap-abhängige Translation von Mcl-1 hin. 48 h nach Elektroporation wurden die Zellen mit 10 Gy bestrahlt. **(B)** Das Mcl-1-Level wurde mittels Western-Blots analysiert. Diese zeigen, dass die Abnahme von Mcl-1 nach Bestrahlung weder durch Herunterregulierung von eIF4G1 noch von DAP5 beeinflusst wurde. Jeweils 24 h und 48 h nach Bestrahlung wurden der Zusammenbruch des mitochondrialen Potentials **(C)** und die DNA-Fragmentierung **(D)** durchflusszytometrisch analysiert. Einen leicht erhöhten Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ sowie eine vermehrte DNA-Fragmentierung konnte nur beobachtet werden, wenn eIF4G1 und DAP5 gleichzeitig herunterreguliert wurden, während die Herunterregulierung der einzelnen Initiationsfaktoren keinen signifikanten Einfluss auf die strahlungsinduzierte Apoptose hatte (nach Trivigno et al., 2013). *** $p < 0.001$

6.2.1.3 eIF4B hat keinen Einfluss auf die Regulierung des Mcl-1-Niveaus nach Bestrahlung

Das Proteinlevel des Initiationsfaktors eIF4B nahm nach Bestrahlung in den sensitiven Jurkat-Zellen ab (Abb.12). Um die Rolle von eIF4B in der strahlungsinduzierten Apoptose zu klären, wurde eIF4B mittels siRNA herunterreguliert und die Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt (Abb.16). Nach erfolgreicher Herunterregulierung des Initiationsfaktors, konnte kein Einfluss

von eIF4B auf den strahlungsinduzierten Mcl-1-Abbau festgestellt werden (Abb.16, A). Weiterhin wurden nach Herunterregulierung von eIF4B der Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ und die DNA-Degradierung durchflusszytometrisch quantifiziert (Abb.16, B und C). Die Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied zu den mit nt-siRNA transfizierten Kontrollzellen in der Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials und der DNA-Fragmentierung, so dass davon auszugehen ist, dass die Funktion von eIF4B für die Regulierung des Mcl-1-Levels nach Bestrahlung irrelevant ist.

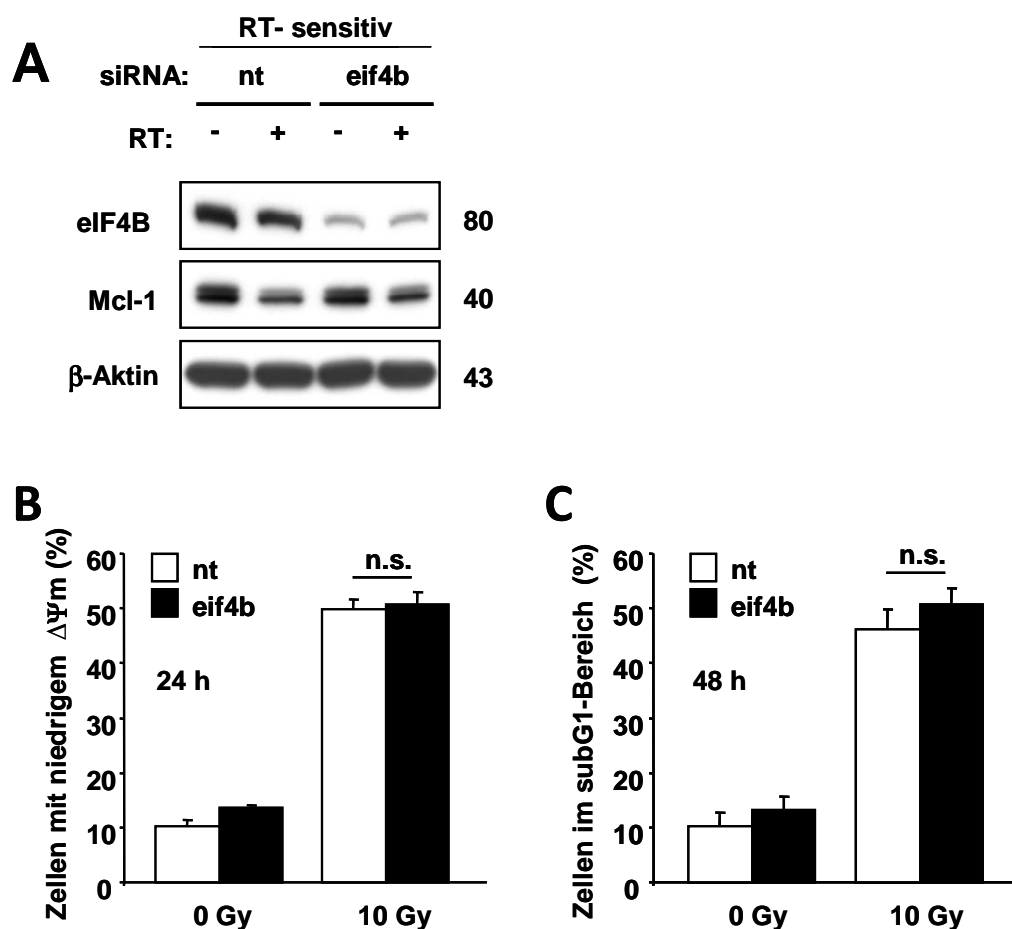


Abb.16: Herunterregulierung von eIF4B beeinflusst nicht die Abnahme des Mcl-1-Levels und der Apoptose nach Bestrahlung. Jurkat-Zellen wurden mit 1 μ M eIF4B-siRNA elektroporiert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit 10 Gy bestrahlt. **(A)** 24 h nach Bestrahlung wurden Lysate hergestellt und Western-Blots durchgeführt. Jeweils 24 h und 48 h nach Bestrahlung wurden der Zusammenbruch des mitochondrialen Potentials **(B)** und die DNA-Fragmentierung **(C)** durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrollen dienten unbestrahlte und mit siRNA behandelte Zellen. Die Herunterregulierung von eIF4B hatte keinen Einfluss auf die Abnahme des Mcl-1-Levels **(A)** und auf die Vitalität der Zellen **(B, C)**, (nach Trivigno et al., 2012). n.s. $p > 0.05$

6.2.1.4 Die Abnahme des Mcl-1-Levels nach Bestrahlung ist unabhängig vom Akt/mTOR- Signalweg

Der Akt/mTOR-Signalweg kontrolliert die Cap-abhängige Protein-Translation über die Aktivierung von p70S6K und die Inaktivierung von 4EBP1. Um die Bedeutung des Akt/mTOR-Signalwegs für die Regulierung von Mcl-1 besser zu verstehen, wurden Jurkat-Zellen mit 50 μ M oder 100 μ M des PI3K-Inhibitors LY294002 inkubiert (Abb.17, A). 6 h später wurden die Zellen lysiert und mittels Western-Blots analysiert. Diese zeigen eine verminderte Phosphorylierung von Akt und mTOR nach Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor. Die Substrate des Proteins mTOR p70S6K und 4EBP1 wurden ebenfalls nach Behandlung mit LY294002 dephosphoryliert. Interessanterweise führte die Behandlung der Jurkat-Zellen mit 50 μ M oder 100 μ M des Inhibitors zu einer Abnahme des Mcl-1-Levels.

Um die Regulierung der Proteintranslation über den Akt/mTOR-Signalweg nach Bestrahlung zu untersuchen, wurden Jurkat-Zellen mit 10 Gy bestrahlt und anschließend 0-24 h nach Bestrahlung lysiert (Abb. 17,B) Überraschenderweise zeigen die Western-Blot-Analysen nach Bestrahlung keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von Akt, mTOR und p70S6K. Der Signalweg blieb auch nach Bestrahlung aktiviert, obwohl das Mcl-1-Level abnahm. Die Resultate zeigen, dass der Akt/mTOR-Signalweg durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt wurde.

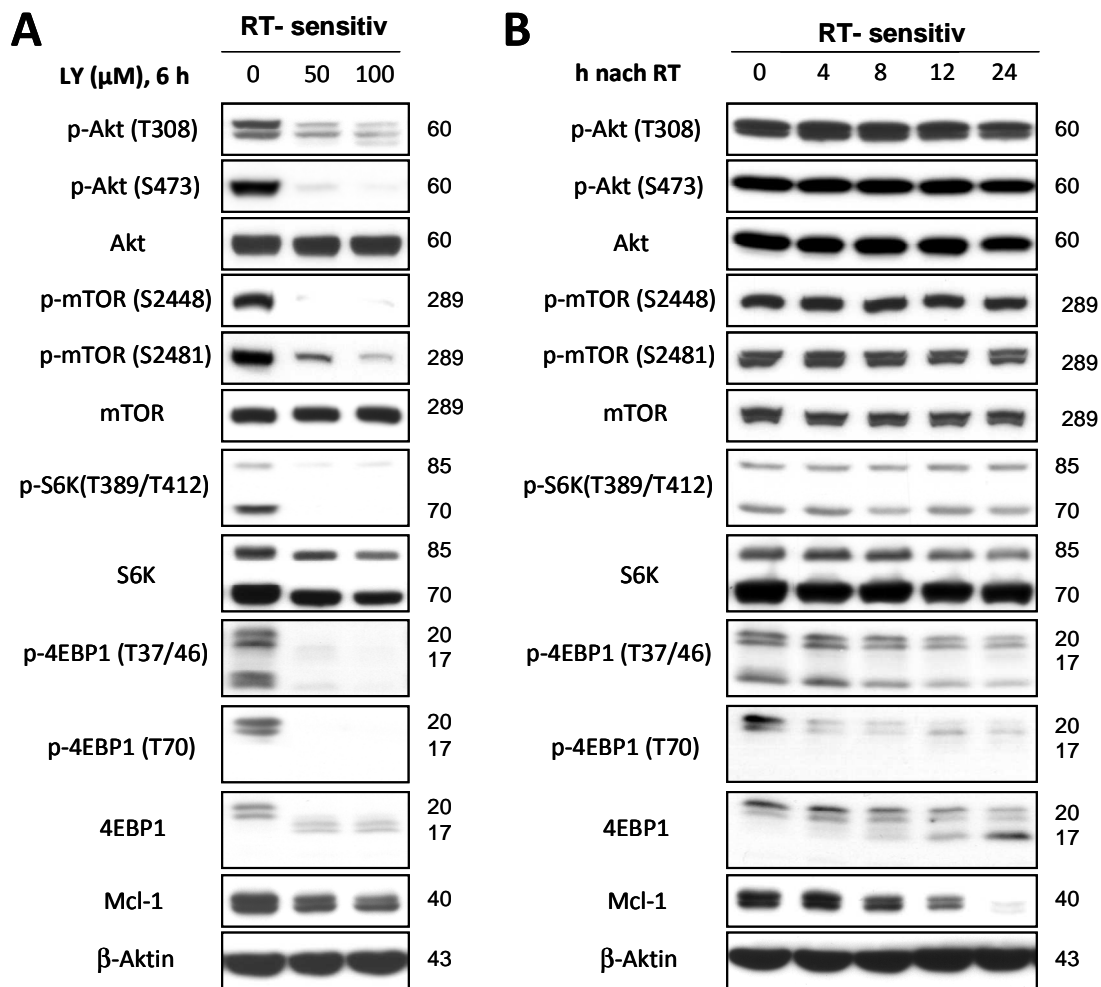


Abb.17: Dephosphorylierung von 4EBP1 und Abnahme von Mcl-1 nach Bestrahlung werden unabhängig vom Akt/mTOR-Signalweg reguliert. Strahlensensitive Jurkat-Zellen wurden mit 50 μM bzw. 100 μM LY294002 (LY) behandelt **(A)** oder mit 10 Gy bestrahlt **(B)**. 6 h nach Behandlung mit LY294002 bzw. 0 h, 4 h, 8 h, 12 h und 24 h nach Bestrahlung wurden Lysate hergestellt. **(A)** LY294002 bewirkte eine Dephosphorylierung von Akt an Threonin 308 (T308) und an Serin 473 (T473) sowie an mTOR am Serin 2448 und 2481 (S2448, S2481). Diese Ergebnisse beweisen die Hemmung des Akt/mTOR-Signalwegs durch LY294002. Auch die Dephosphorylierung von p70S6K an Threonin 389 (T389) und Threonin 412 (T412), sowie von 4EBP1 an Threonin 37/46 (T37/46) und Threonin 70 (T70) wurden nach Behandlung mit LY294002 beobachtet. **(B)** Bestrahlung beeinflusste nicht die Phosphorylierung von Akt, mTOR und S6K, verursachte jedoch die Abnahme der Mcl-1 und phospho-4EBP1, sowie einen Shift von 4EBP1 von p20 auf p17. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Dephosphorylierung von 4EBP1 nach Bestrahlung unabhängig vom Akt/mTOR-Signalweg geschah. Die strahleninduzierte Abnahme des Mcl-1-Niveaus wurde nicht durch den Akt/mTOR-Signalweg reguliert. Die Herunterregulierung von Mcl-1 nach Behandlung mit LY294002 und Bestrahlung korrelierte jedoch mit der Dephosphorylierung von 4EBP1 (nach Trivigno et al., 2013).

6.2.1.5 Die Dephosphorylierung von 4EBP1 nach Bestrahlung ist nicht verantwortlich für die gleichzeitige Abnahme des Mcl-1-Levels

Nach Bestrahlung mit 10 Gy zeigte sich in Jurkat-Zellen eine kontinuierliche Dephosphorylierung von 4EBP1 mit gleichzeitiger Abnahme des Mcl-1-Levels (Abb.17). Der Caspaseinhibitor zVAD konnte weder die Dephosphorylierung von 4EBP1 noch die Abnahme von Mcl-1 verhindern (Abb.13). Um den Einfluss von 4EBP1 auf die Protein-Translation und vor allem auf das Mcl-1-Level näher zu untersuchen, wurde 4EBP1 in Jurkat-Zellen mit siRNA herunterreguliert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 10 Gy bestrahlt und 24 h danach lysiert. Die Western-Blot Analyse zeigt eine erfolgreiche Herunterregulierung von 4EBP1 (Abb.18, A). Es konnte jedoch keine Änderung des Mcl-1-Levels nach Herunterregulierung von 4EBP1 detektiert werden. 24 h bzw. 48 h nach Bestrahlung wurden der Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ (Abb.18, B) und die DNA-Degradierung (Abb.18, C) durchflusszytometrisch bestimmt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ und in der DNA-Degradierung zwischen den mit 4EBP1-siRNA und nt-siRNA transfizierten Zellen. Interessanterweise induzierte die Herunterregulierung von Mcl-1 mittels siRNA innerhalb von 3-6 h nach Elektroporation eine Dephosphorylierung von 4EBP1 (Abb.18, D). Die 4EBP1-Dephosphorylierung zeigt sich in der Western-Blot Analyse im Shift der Bande von 20 zu 17 kDa. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Bestrahlung über Dephosphorylierung von 4EBP1 auch caspasenunabhängig eine Inhibition der Translation verursacht. Die Reduktion des Mcl-1-Levels nach Bestrahlung wird jedoch nicht über die 4EBP1-vermittelte translationelle Inhibition verursacht.

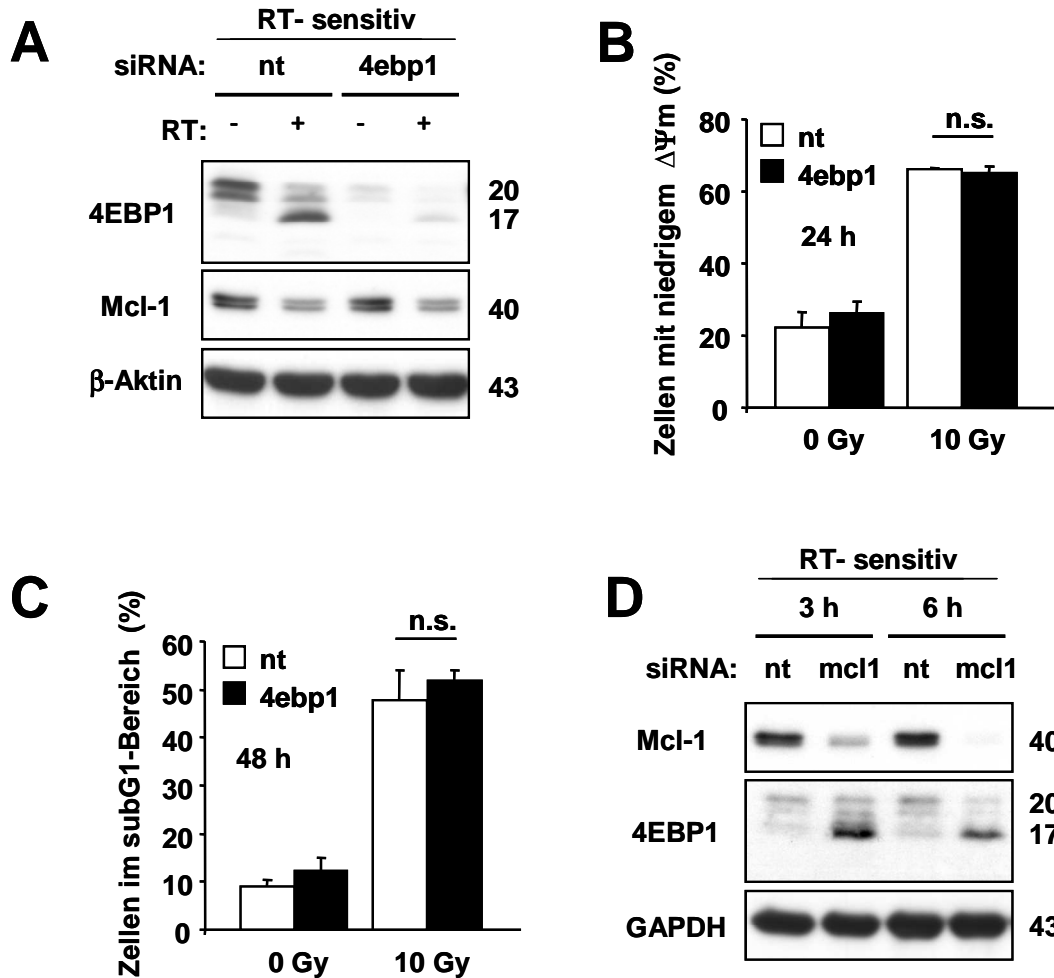


Abb.18: Herunterregulierung von 4EBP1 beeinflusst nicht die Abnahme des Mcl-1-Levels und Apoptose nach Bestrahlung. Jurkat-Zellen wurden mit 1 μ M 4EBP1-siRNA oder nt-siRNA elektroporiert. 48 h später wurden die Zellen mit 10 Gy bestrahlt. **(A)** 24 h nach Bestrahlung wurden 4EBP1 und Mcl-1 mittels Western-Blot untersucht. Jeweils 24 h und 48 h nach Bestrahlung wurden der Zusammenbruch des mitochondrialen Potentials **(B)** und die DNA-Fragmentierung **(C)** durchflusszytometrisch analysiert. **(D)** Jurkat-Zellen wurden mit 250 nM Mcl-1-siRNA transfiziert. 3 h und 6 h nach Elektroporation wurden Lysate hergestellt. Herunterregulierung von 4EBP1 beeinflusste weder $\Delta\Psi_m$ noch die DNA-Degradierung noch das Mcl-1-Level. Im Gegensatz dazu führte die Herunterregulierung von Mcl-1 zu einer rapiden Dephosphorylierung von 4EBP1 (nach Trivigno et al., 2013). n.s. $p > 0.05$

6.3 Einfluss von Proteinen der Bcl-2-Proteingruppe auf Vitalität von Jurkat-Zellen

6.3.1 Level pro- und anti-apoptotischer Proteine in strahlensensitiven und –resistenten Jurkat-Zellen vor und nach Bestrahlung

Bisherige Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Translation für die Regulation des Mcl-1-Levels in bestrahlten Jurkat-Zellen von geringer Bedeutung ist. Da Mcl-1 essentiell für das Überleben der Zelle ist, wurden nun posttranslationelle Mechanismen untersucht, die das Mcl-1-Level beeinflussen können. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass die BH3-only-Proteine Bim, Puma und Noxa Mcl-1 stabilisieren können (Gomez- Bougie et al., 2011; Warr et al., 2005). Es stellt sich deswegen die Frage, ob die Herunterregulierung von Bim, Puma und Noxa auch eine verbesserte Herunterregulierung von Mcl-1 nach Bestrahlung und damit vermehrte Apoptose hervorruft. Ebenso können auch das Level anderer anti- und pro-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Gruppe durch Bestrahlung reguliert werden. Da die oben aufgeführten BH3-only-Proteine auch mit diesen anderen Mitgliedern der Bcl-2-Proteingruppe interagieren könnten, würde sich dadurch auch die Interaktion der BH3-only-Proteine mit Mcl-1 verändern. Deswegen wurde zunächst das Level pro- und anti-apoptotischer Proteine in strahlensensitiven und –resistenten Zellen 0-24 h nach Bestrahlung untersucht (Abb.20). Es konnte festgestellt werden, dass die Level zentraler Proteine wie z.B. Bak und Bim in beiden Subklonen keine Änderung nach Bestrahlung erfuhren. Die Level der anti-apoptotischen Proteine Bcl-x_L und Bcl-2 änderten sich ebenfalls nicht durch Bestrahlung. Bestrahlung hatte auch keinen Effekt auf das Noxa-Level. Überraschenderweise konnte eine strahleninduzierte Abnahme des Puma-Level in strahlensensitiven Zellen, jedoch nicht in strahlenresistenten Zellen beobachtet werden.

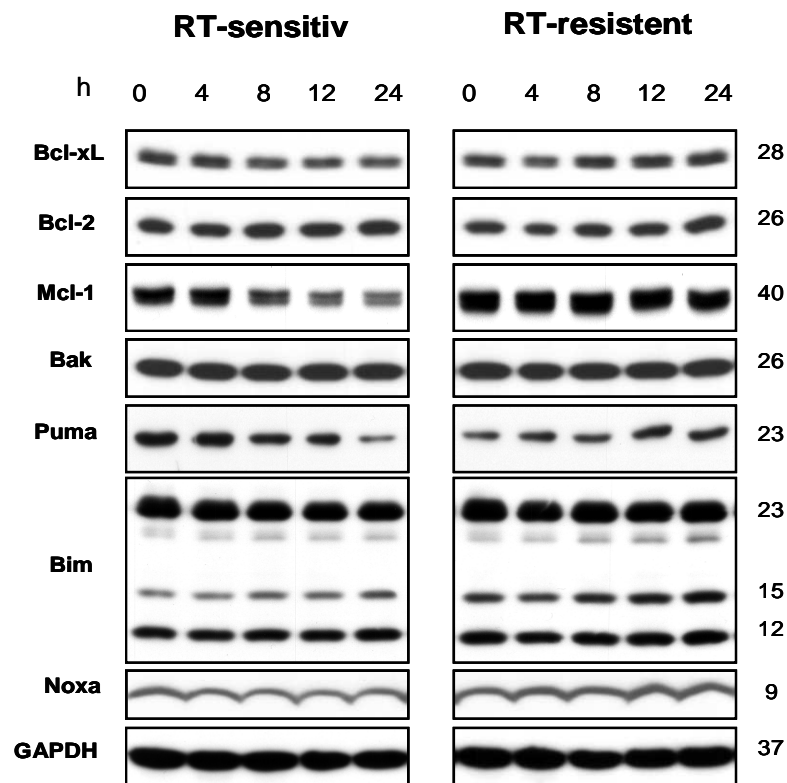


Abb.19: Protein-Level pro- und anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Proteingruppe. Strahlensensitive und -resistente Zellen wurden bestrahlt und Lysate wurden nach 4, 8, 12 und 24 h hergestellt. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH verwendet. Nach Bestrahlung mit einer Dosis von 10 Gy zeigte sich in sensitiven und resistenten Zellen keine Änderung des Levels pro- und anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Gruppe. Lediglich das Proteinlevel von Puma nahm 24 h nach Bestrahlung in sensitiven Zellen etwas ab (nach Trivigno et al., 2012).

6.3.2 Herunterregulierung von Bim, Puma und Noxa haben keinen Einfluss auf das Mcl-1-Level

Obwohl das Proteinlevel der untersuchten Mitglieder der Bcl-2-Proteingruppe nach Bestrahlung in der Regel unverändert blieb, können sich trotzdem die Interaktionspartner dieser Proteine geändert haben. Um herauszufinden, ob Bim, Puma und Noxa in den verwendeten Zellen eine Rolle bei der Regulierung von Mcl-1 und Steuerung der Apoptose spielen, wurden die Proteine in strahlensensitiven Zellen herunterreguliert (Abb.20, A, B und C oben). Dabei wurden für Bim und Puma verschiedene Konzentrationen an siRNA getestet. Für Noxa war dies nicht nötig, da die notwendige siRNA-Konzentration bereits aus früheren Veröffentlichungen bekannt war (Rudner et al., 2010b). 72 h nach Elektroporation wurde die Herunterregulierung der entsprechenden Proteine

überprüft und densitometrisch quantifiziert. Die Herunterregulierung von Bim, Puma und Noxa war abhängig von der Konzentration der jeweiligen siRNA. Trotz erfolgreicher Herunterregulierung der drei BH3-only Proteine, blieb das Mcl-1-Level jedoch unverändert.

Die Apoptoseinduktion wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Für die FACS-Analysen wurden 500 nm siRNA für die Herunterregulierung von Bim und 1000 nm der jeweiligen siRNA für die Herunterregulierung von Puma oder Noxa verwendet. Die Zellen wurden 48 h nach Elektroporation mit 10 Gy bestrahlt. $\Delta\Psi_m$ -Verlust und DNA-Degradierung wurden 24 h (Abb.20, A, B und C mitte) bzw. 48 h (Abb.20, A, B und C unten) nach Bestrahlung gemessen. Nach Herunterregulierung von Bim, Puma und Noxa konnte kein signifikanter Unterschied in der strahleninduzierten $\Delta\Psi_m$ -Depolarisierung und in DNA-Fragmentierung zwischen mit nt-siRNA behandelten und mit spezifischer siRNA behandelten Zellen festgestellt werden. Somit kann geschlossen werden, dass die Herunterregulierung von Puma, Bim und Noxa durch siRNA keinen relevanten Einfluss auf die Regulierung des Mcl-1-Levels und die Vitalität der verwendeten Zellen hat, da sich dadurch weder das Mcl-1-Level änderte noch ein erhöhter Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ oder eine vermehrte DNA-Degradierung festgestellt werden konnte. Die untersuchten BH3-only Proteine regulieren folglich nicht die Strahlensensitivität in Jurkat-Zellen.

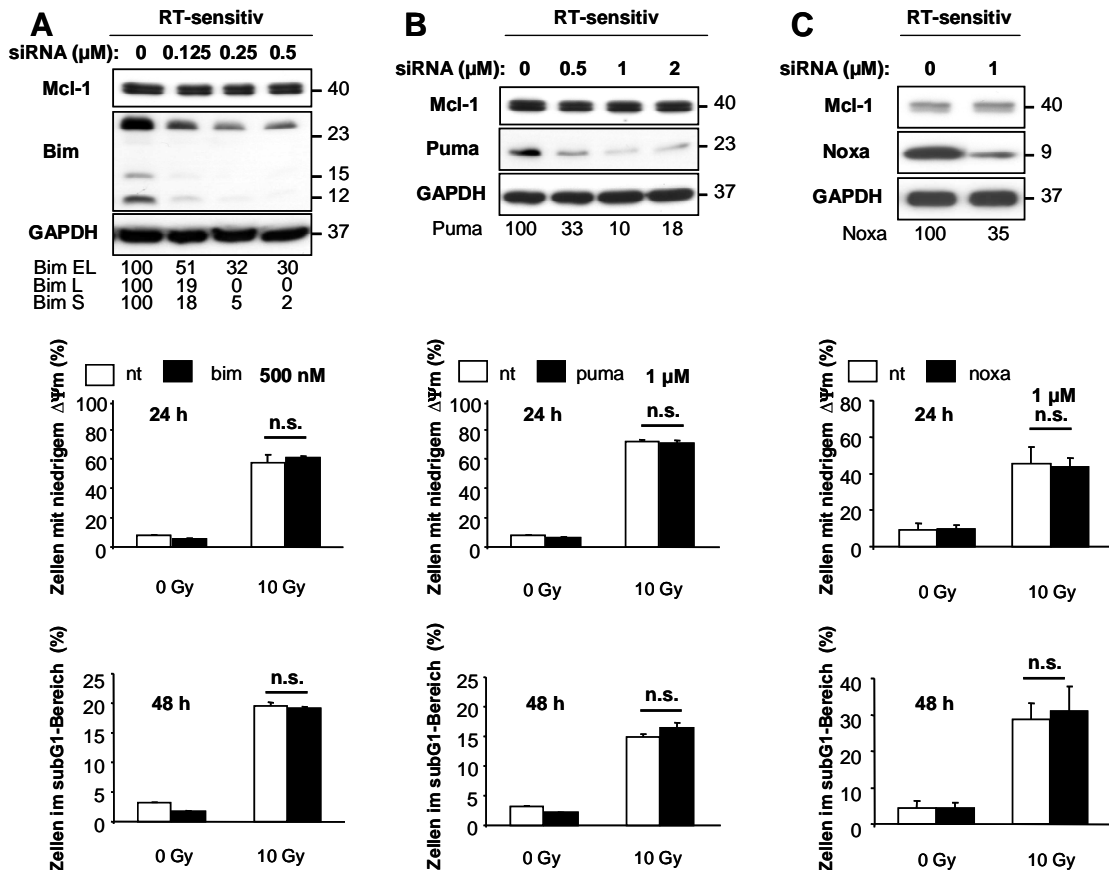


Abb.20: Herunterregulierung von Bim, Puma und Noxa zeigt keine Veränderung des $\Delta\Psi_m$ und der DNA-Fragmentierung. Strahlensensitive Jurkat T-Lymphom-Zellen wurden jeweils mit Bim, Puma und Noxa-siRNA behandelt. Als Kontrollen dienten mit unspezifischer siRNA (nt) transfizierte Zellen. Die Herunterregulierung von Bim, Puma und Noxa sowie die Auswirkung auf das Mcl-1-Level wurden nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an siRNA mittels Western-Blot 72 h nach Elektroporation überprüft und densitometrisch quantifiziert (**A,B,C oben**). 48 h nach Elektroporation mit 1000 nM Puma- bzw. Noxa-siRNA und 500 nM Bim-siRNA oder der respektiven Menge an nt-siRNA wurden die Zellen mit 10 Gy bestrahlt. Als Kontrolle dienten unbestrahlte Proben. 24 h und 48 h nach Bestrahlung wurden (**A,B,C mitte**) bzw. DNA-Degradierung (**A,B,C unten**) durchflusszytometrisch gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Herunterregulierung der genannten BH3-only Proteine vor und nach Bestrahlung weder das Mcl-1-Level noch $\Delta\Psi_m$ und DNA-Degradierung beeinflusst wurden (nach Trivigno et al., 2012). n.s. >0.05

6.4 Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Degradierung von Mcl-1

6.4.1 GSK-3 β hat keinen Einfluss auf Mcl-1-Stabilität und Apoptose

Die Phosphorylierung von Mcl-1 am Serin 159 durch GSK-3 β und die dadurch hervorgerufene vermehrte Ubiquitinierung über β -TrCP und FBW7 kann zu einer beschleunigten Degradierung des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 führen und dadurch zu einem vermehrten Zelltod durch Apoptose. Deshalb

wurden sensitive Jurkat-Zellen für 6 h mit 30 nM des GSK-3 β -Inhibitors XV oder dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels DMSO (0 nM GSK3-Inh) behandelt, um den Einfluss von GSK-3 β auf Mcl-1 und auf die strahleninduzierte Apoptose zu ermitteln. Die Level des bekannten GSK-3 β -Substrates β -Catenin, Mcl-1 und als Ladungskontrolle GAPDH wurden durch Western-Blots überprüft. $\Delta\Psi_m$ -Depolarisierung und DNA-Fragmentierung wurden durchflusszytometrisch 24 h bzw. 48 h nach zusätzlicher Bestrahlung mit 10 Gy untersucht.

Die Inhibierung von GSK-3 β durch den Inhibitor führte zur Akkumulierung von β -Catenin, aber nicht von Mcl-1 (Abb.21, A). Zusätzliche Bestrahlung führte zu einer Abnahme von Mcl-1 mit ähnlicher Effektivität in den mit dem Inhibitor wie auch mit DMSO behandelten Zellen. Das β -Catenin-Level hingegen blieb nach Bestrahlung unverändert. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigen keinen Unterschied in $\Delta\Psi_m$ -Depolarisierung und DNA-Fragmentierung zwischen den mit Lösungsmittel und GSK-3 β -Inhibitor behandelten Zellen. Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ und DNA-Fragmentierung konnten auch bei den mit GSK-3 β -Inhibitor behandelten Zellen nicht verhindert werden (Abb.21, B und C). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass GSK-3 β keinen Einfluss auf die Stabilität von Mcl-1 hat.

In einem weiteren Versuch wurden sensitive Jurkat-Zellen wie in 6.2.1.4 mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 behandelt. In 6.2.1.4 wurde der Akt/mTOR-Signalweg bezüglich der Auswirkung auf die Translation untersucht.

Als nächstes soll der Effekt des Akt/mTOR-Signalwegs auf GSK-3 β und somit auf die Mcl-1-Stabilität analysiert werden. Akt reguliert die GSK-3 β -Aktivität durch Phosphorylierung am Serin 21. Für den Versuch wurden die Zellen ebenfalls mit 50 μ M oder 100 μ M des Akt-Inhibitors behandelt oder mit 10 Gy bestrahlt. Sechs Stunden nach Behandlung mit LY294002 wurden mittels Western-Blot-Technik die Phosphorylierung von Akt an Threonin 308 und Serin 473 (p-Akt T308; p-Akt S473) untersucht sowie die Level an Akt, p-GSK-3 β , GSK-3 β und Mcl-1 (Abb.22, rechts). Erwartet wurden eine Dephosphorylierung von GSK-3 β sowie eine Destabilisierung, d.h. reduzierte Proteinlevel von Mcl-1 und β -Catenin.

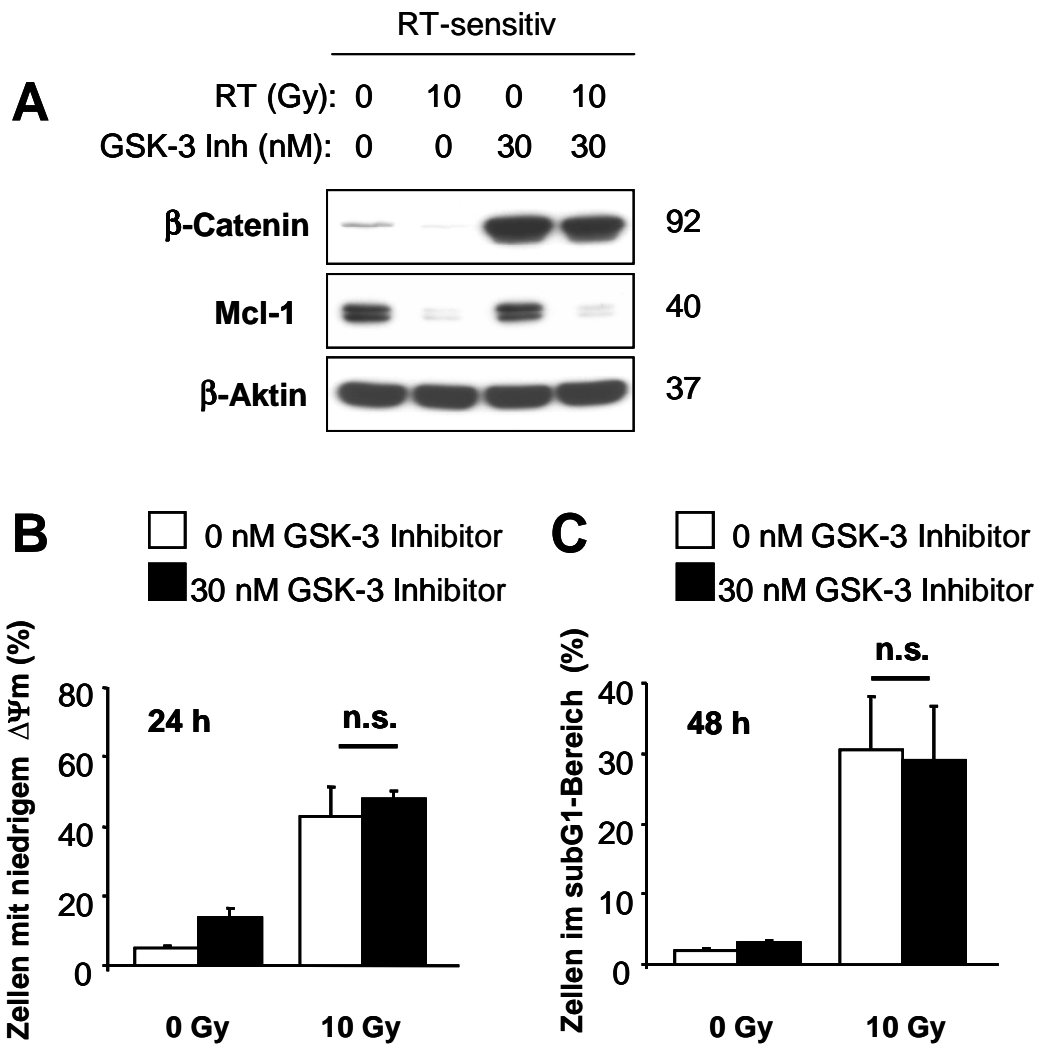


Abb.21: GSK-3 β hat keinen Einfluss auf die Mcl-1-Stabilität und Vitalität von Jurkat-Zellen. Strahlensensitive Jurkat-Lymphomzellen wurden mit dem GSK-3 β Inhibitor XV behandelt. Ganzzelllysate wurden 6 h später hergestellt. Inhibierung von GSK-3 β führte zur Akkumulierung von β -Catenin, beeinflusste aber nicht die Proteinstabilität von Mcl-1 (**A**) und verhinderte nicht den strahleninduzierten Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ (**B**) und die DNA- Degradierung (**C**) 24 h bzw. 48 h nach Bestrahlung. n.s. >0.05

Wie bereits in 6.2.1.4 beschrieben, führt die Behandlung der Zellen mit dem PIK3-Inhibitor, nicht jedoch Bestrahlung, zur Dephosphorylierung und somit Hemmung von Akt. Das Level der Zielproteine von GSK-3 β , Mcl-1 und β -Catenin nahm nach Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor ab, jedoch blieben GSK-3 β und p-GSK-3 β unverändert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Inhibierung des Akt-Signalweges zur Reduktion des β -Catenin- und Mcl-1-

Levels in Jurkat-Zellen führte, ohne einen sichtbaren Einfluss auf die GSK-3 β -Aktivität zu haben.

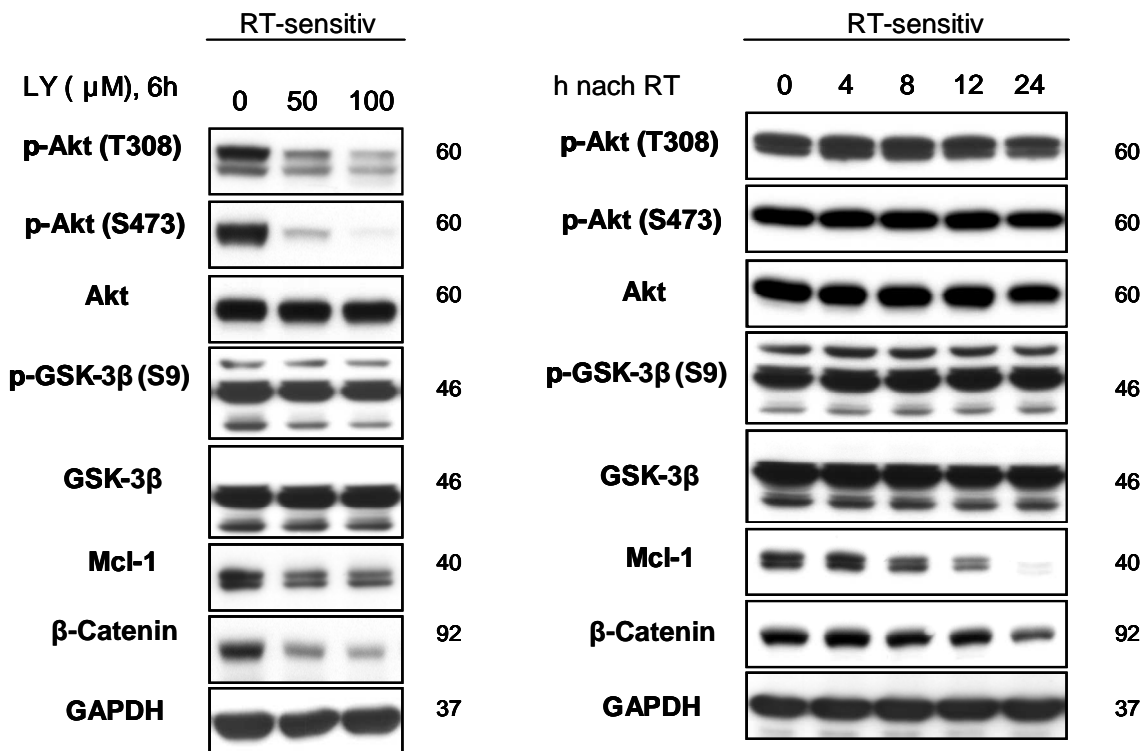


Abb.22: Die strahleninduzierte Herunterregulierung von Mcl-1 wird nicht über Akt und GSK-3 β reguliert. RT-sensitive Zellen wurden entweder mit 50 μ m oder 100 μ m des PI3K-Inhibitors LY294002 inkubiert oder mit 10 Gy bestrahlt. 6 h nach Behandlung mit dem Inhibitor bzw. 0-24 h nach Bestrahlung wurden die Zellen lysiert und mittels Western-Blots analysiert. Die Behandlung von Jurkat-Zellen mit dem P3I-K-Inhibitor LY294002 führte zur Reduktion von p-Akt und der Zielproteine der GSK-3 β , Mcl-1 und β -Catenin, hatte aber keine Auswirkung auf den Phosphorylierungsstatus von GSK-3 β (links). Somit wurde gezeigt, dass Akt das Mcl-1-Level nicht über GSK-3 β reguliert. Nach Bestrahlung zeigte sich eine Abnahme des Mcl-1- und β -Catenin-Levels, ohne dabei den Phosphorylierungsstatus von Akt und GSK-3 β zu verändern (rechts), (nach Trivigno et al., 2012).

Folglich stellte sich die Frage, ob GSK-3 β von ionisierender Strahlung beeinflusst wird und somit zu einer Änderung der Stabilität von Mcl-1 führt. Dabei wurden sensitive Zellen mit 10 Gy bestrahlt. 4, 8, 12 und 24 h nach Bestrahlung wurden Ganzzelllysate hergestellt und das Proteinlevel von p-Akt T308, p-Akt S473, Akt, p-GSK-3 β , GSK-3 β , Mcl-1 und β -Catenin untersucht (Abb.22, rechts). Die Ergebnisse zeigen, dass ionisierende Strahlung keinen Einfluss auf Akt und GSK-3 β hat, obwohl eine Abnahme der β -Catenin und Mcl-1-Level detektiert wurde.

Zusammenfassend zeigen die Resultate, dass die strahleninduzierte Herunterregulierung von Mcl-1 in den RT-sensitiven Zellen weder durch Akt noch durch GSK-3 β reguliert wird.

6.4.2 Ubiquitinierung von Mcl-1

Ein weiterer Regulationsmechanismus der Mcl-1-Stabilität ist die Ubiquitinierung, die zur proteasomalen Degradierung des Proteins führt. Folglich wurde dieser Mechanismus untersucht. Um zunächst den Ubiquitinierungsstatus aller zellulärer Proteine unspezifisch zu prüfen, wurden strahlensensitive und -resistente Zellen mit 5 μ M des Proteasominhibitors MG132 behandelt oder mit 10 Gy bestrahlt (Abb.23). Durch die Behandlung mit MG132 soll die proteasomale Degradierung nach Ubiquitinierung der Proteine verhindert werden. Nach einer dreistündigen Behandlung mit MG132 wurden die Zellen lysiert und mittels Western-Blot-Technik analysiert. Die Ergebnisse zeigen eine Ansammlung von ubiquitinierten Proteinen sowie eine Anreicherung von Mcl-1 und USP9X in strahlensensitiven und -resistenten Zellen nach Behandlung mit MG132 (Abb.23, links). 24 h nach Bestrahlung konnte keine vergleichbare Ansammlung von ubiquitinierten Proteinen, Mcl-1 oder USP9X beobachtet werden (Abb.23, rechts).

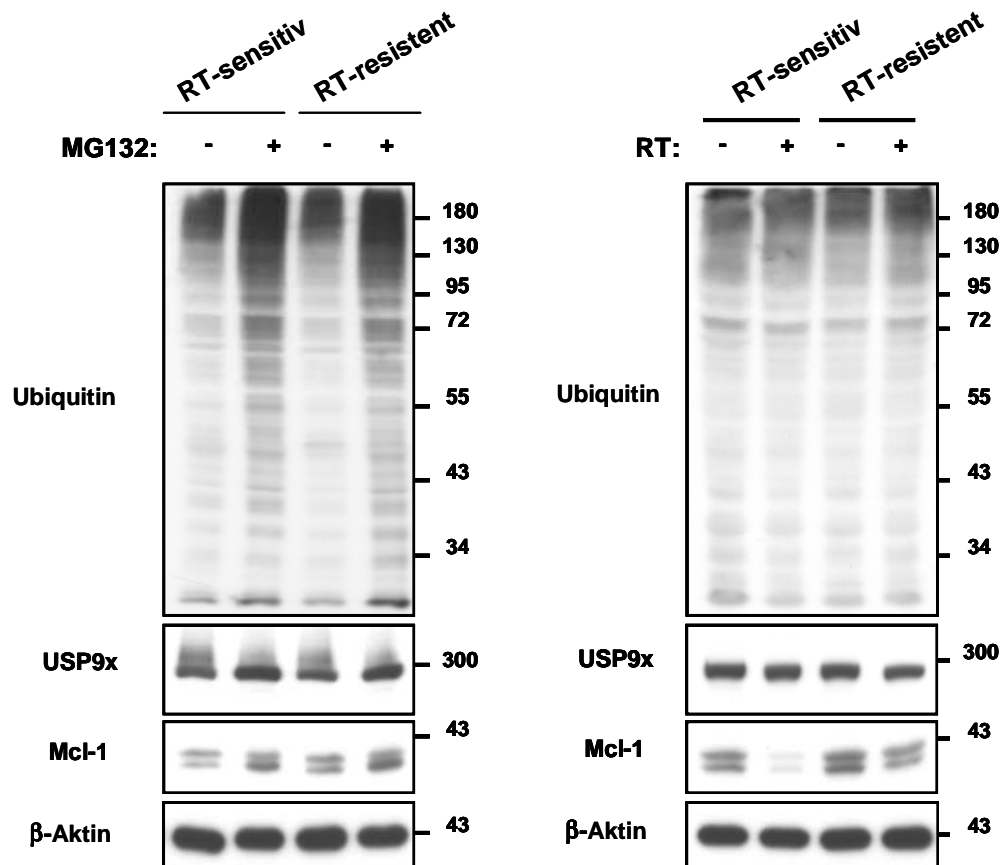


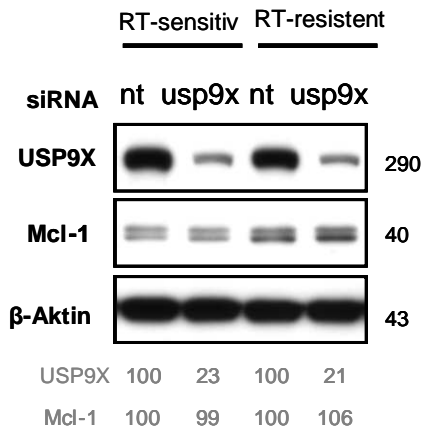
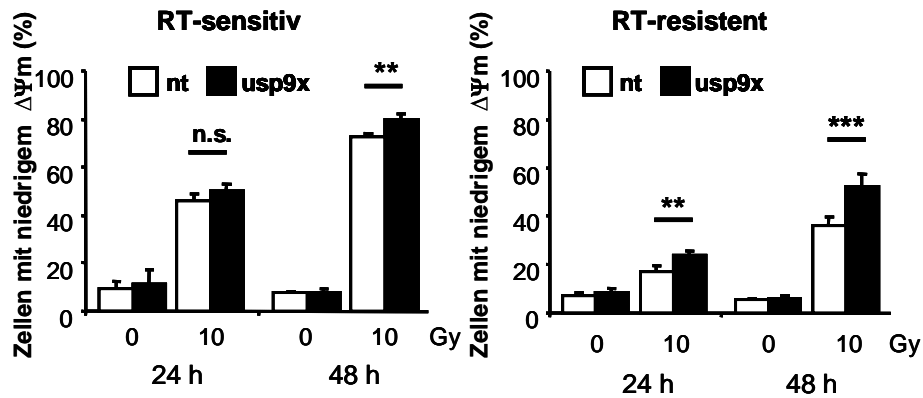
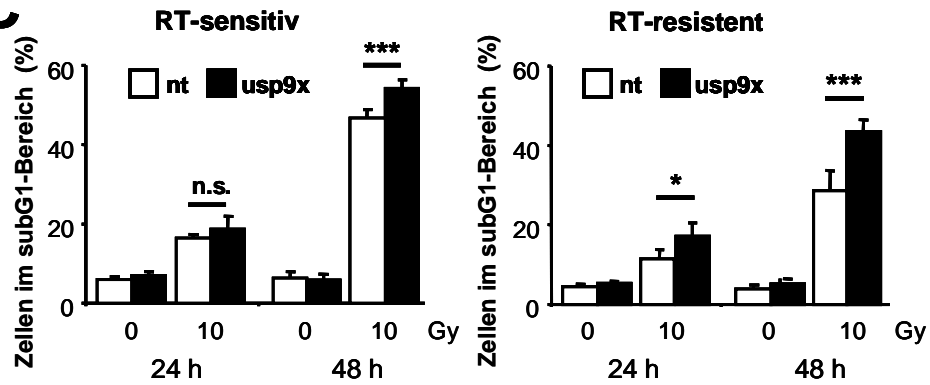
Abb.23: Bestrahlung von Jurkat-Zellen ändert nicht den Ubiquitinierungsstatus von Proteinen. Strahlensensitive und -resistente Zellen wurden nach dreistündiger Behandlung mit MG132 oder 24 h nach Bestrahlung lysiert. Western-Blot-Analysen dieser Lysate mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen Ubiquitin, USP9X und Mcl-1 zeigen eine Ansammlung ubiquitiniertes Proteine und ebenfalls von Mcl-1 in strahlensensitiven und -resistenten Zellen nach Behandlung mit MG132 (links). Dieses Phänomen zeigt sich nach Bestrahlung nicht (rechts). Außerdem zeigt sich eine Zunahme des USP9X-Niveaus nach Behandlung mit MG132, welche nach Bestrahlung nicht zu sehen ist (nach Trivigno et al., 2012).

6.4.3 Herunterregulierung von USP9X führt zu strahlungsinduziertem Abbau von Mcl-1 und zu Apoptose

Frühere Untersuchungen zeigten bereits, dass USP9X mit Mcl-1 interagieren kann (Schwickart et al., 2010). Eine verstärkte Deubiquitinierung durch USP9X würde eine Stabilisierung des Mcl-1-Proteins bedeuten. In einem solchen Fall sollte die Herunterregulierung von USP9X strahlenresistente Zellen gegenüber Bestrahlung sensitivieren. Um dies zu überprüfen, wurden Jurkat-Zellen mit 1 μ M USP9X-siRNA oder der unspezifischen nt-siRNA elektroporiert. Die Herunterregulierung von USP9X und die Auswirkung auf das Mcl-1-Level

wurden 48 h nach Elektroporation mittels Western-Blot und anschließender densitometrischen Auswertung überprüft (Abb.24, A). Während USP9X erfolgreich herunterreguliert werden konnte, änderte sich das Mcl-1-Level nicht. 48 h nach Elektroporation mit der entsprechenden siRNA oder USP9X-spezifischer siRNA wurden strahlensensitive und -resistente Zellen mit 10 Gy bestrahlt. 24 h und 48 h nach Elektroporation wurden $\Delta\Psi_m$ (Abb.24, B) bzw. die DNA-Degradierung (Abb.24, C) durchflusszytometrisch untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine schwache, 48 Stunden nach Bestrahlung jedoch signifikante Zunahme des $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruchs und der DNA-Degradierung in strahlensensitiven Zellen. In den resistenten Zellen waren diese Unterschiede jedoch stärker ausgeprägt und in beiden Untersuchungen hochsignifikant (Abb.24, B und C rechts). Durch die Herunterregulierung von USP9X reagierten die strahlenresistenten Zellen sensitiver mit Apoptoseinduktion nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung.

Um die Resultate zu bestätigen, wurden strahlensensitive Jurkat-Zellen und der resistente Subklon erneut mit nt-siRNA und USP9X-spezifischer siRNA elektroporiert und 48 Stunden später bestrahlt. Von den sensitiven Zellen wurden Lysate 24 h nach Bestrahlung, von den resistenten Zellen 30 h nach Bestrahlung hergestellt. Die Western-Blot-Analyse mit nachfolgender densitometrischer Quantifizierung zeigt, dass die Herunterregulierung von USP9X zu einer besseren strahleninduzierten Reduktion von Mcl-1 führte. Dies wurde in den strahlenresistenten Zellen besonders ausgeprägt beobachtet. Gleichzeitig wurde auch die strahleninduzierte Aktivierung von Caspase-3 sowie die proteolytische Spaltung des Caspase-3-Substrates PARP nach Herunterregulierung von USP9X in den resistenten Zellen verstärkt (Abb.24, D rechts). In den sensitiven Jurkat-Zellen war die strahleninduzierte Spaltung der Caspase-3 sowie von PARP bereits sehr gut detektierbar, sodass nach USP9X-Herunterregulierung keine verbesserte Caspase-3-Aktivierung detektiert werden konnte (Abb.24, D links).

A**B****C**

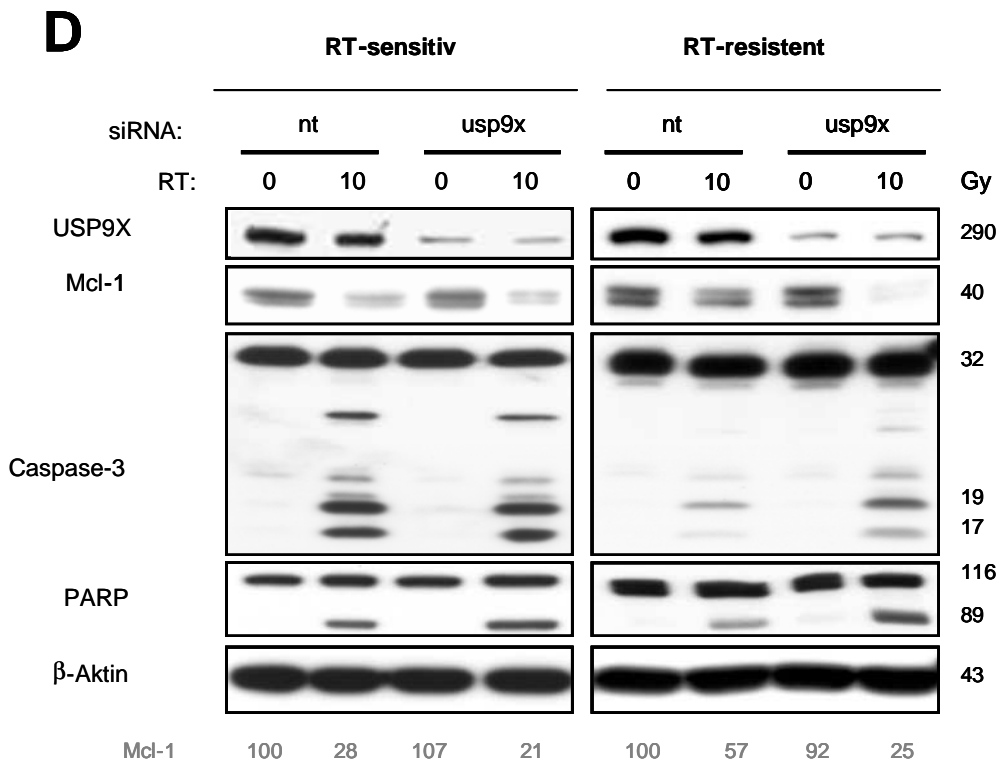


Abb.24: Herunterregulierung von USP9X führt zum vermehrten Abbau von Mcl-1 und erhöhter Apoptose nach Bestrahlung. Strahlensensitive und -resistente Jurkat-Zellen wurden mit 1 μ M nt-siRNA oder USP9X-siRNA transfiziert. **(A)** 48 h nach der Elektroporation wurden Lysate hergestellt. Die Herunterregulierung von USP9X und die Auswirkung auf das Mcl-1-Level wurden mittels Western-Blot analysiert und nachfolgend densitometrisch quantifiziert. **(B,C,D)** 48 h nach Elektroporation wurden die Zellen mit 10 Gy bestrahlt. Messungen des $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruchs **(B)** und der DNA-Degradierung **(C)** zeigen nach Herunterregulierung von USP9X durch siRNA in strahlenresistenten Zellen eine deutlichere Sensitivierung gegenüber ionisierender Strahlung als in strahlensensitiven Zellen. **(D)** Lysate von strahlensensitiven und -resistenten Zellen wurden 24 h bzw. 30 h nach Bestrahlung hergestellt und mittels Western-Blot analysiert. Nach Transfektion mit USP9X-siRNA zeigten strahlenresistente Zellen einen erhöhten Abbau von Mcl-1 nach Bestrahlung im Vergleich zu den mit nt-siRNA transfizierten Zellen (D, rechte Abbildung). Die verbesserte Mcl-1-Abnahme korrelierte mit verbesserter Caspase-3- und PARP-Spaltung, die die Aktivierung von Caspase-3 indizieren. Die bereits starke strahlungsabhängige Aktivierung von Caspase-3 und PARP-Spaltung wurde in strahlensensitiven Zellen nach Herunterregulierung von USP9X nicht weiter verstärkt (D, linke Abb.), (nach Trivigno et al., 2012). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ n.s. > 0.05

Die Resultate bestätigen die Hypothese, dass die Herunterregulierung von USP9X in strahlenresistenten Jurkat-Zellen diese Zellen gegenüber Bestrahlung sensitiviert.

6.5 Radioresistenz in K562-Zellen ist ebenfalls abhängig von USP9X

6.5.1 Apoptose in K562-Zellen

Um einen zellspezifischen Effekt von USP9X auf Mcl-1 auszuschließen, wurde die Rolle von USP9X für die strahleninduzierte Apoptose in einer weiteren Zelllinie überprüft.

Dazu wurden K562-Zellen, eine chronisch myeloische Leukämie-Zelllinie, verwendet. Diese Zellen wurden zunächst mit 10 Gy bestrahlt. 24 h, 48 h sowie 72 h nach Bestrahlung wurde die DNA-Degradierung durchflusszytometrisch überprüft. Zellen wurden zusätzlich 24 h und 48 h nach Bestrahlung lysiert. Mittels Western-Blot-Analyse wurde die Spaltung von Caspase-9, Caspase-3 und PARP sowie die Proteinlevel von USP9X und Mcl-1 untersucht.

Die FACS-Analyse zeigte eine zeitabhängige DNA-Degradierung, die 72 h nach Bestrahlung am deutlichsten ausgeprägt war (Abb.25, A). Die Western-Blot-Analysen offenbarten eine spärliche Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3 innerhalb von 48 h, aber eine deutliche Abnahme von Mcl-1 48 h nach Bestrahlung. Das USP9X-Level blieb nach Bestrahlung unverändert. Apoptose ist in K562-Zellen somit schlechter induzierbar als in strahlensensiblen und -resistenten Jurkat-Zellen.

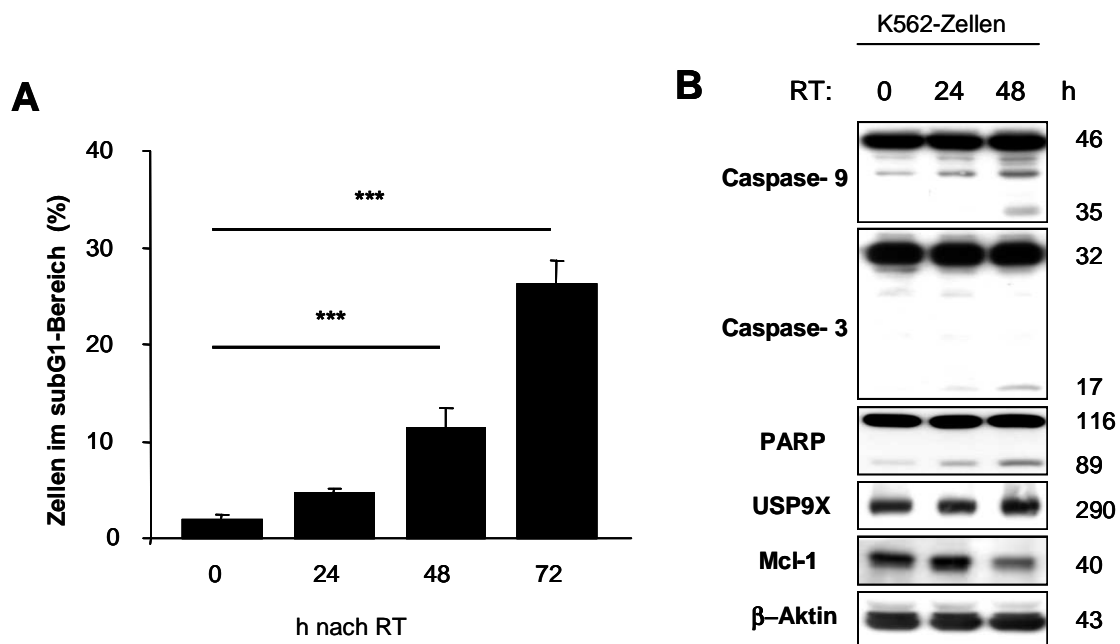


Abb.25: Radioresistenz von K562-Zellen. K562-Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt. 0-72 h nach Bestrahlung wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die durchflusszytometrischen Analysen der K562-Zellen ergaben eine moderate Apoptoseinduktion innerhalb der ersten 48 h nach Bestrahlung, welche 72 h nach Bestrahlung deutlich zunahm (**A**). K562-Zellen wurden 24 h und 48 h nach Bestrahlung lysiert. Die Lysate wurden mittels Western-Blot-Technik analysiert. Die Western-Blots zeigen eine leichte Spaltung von Caspase-9, Caspase-3 und PARP sowie eine späte Abnahme des Mcl-1-Levels 48 h nach Bestrahlung. Eine Änderung des USP9X-Levels nach Bestrahlung ist nicht zu sehen (**B**), (nach Trivigno et al., 2012). *** $p < 0.001$

6.5.2 Herunterregulierung von USP9X sensitiviert K562-Zellen gegenüber ionisierender Strahlung

Um zu überprüfen, ob die strahlenresistenten K562-Zellen durch Herunterregulierung von USP9X gegenüber ionisierender Strahlung sensibilisiert werden konnten, wurden die Zellen bei 340 V und 5 msec lang mit 1 μ M USP9X-siRNA oder nt-siRNA elektroporiert und 48 h später bestrahlt. 48 h und 72 h nach Bestrahlung wurde die DNA-Degradierung durchflusszytometrisch bestimmt. Obwohl 48 h nach Bestrahlung kein Unterschied in der DNA-Fragmentierung zwischen den mit nt- und mit USP9X-siRNA transfizierten Zellen festgestellt wurde, verursachte die Herunterregulierung von USP9X 72 h nach Bestrahlung eine signifikante Zunahme der DNA-Degradierung im Vergleich zu den mit nt-siRNA transfizierten Zellen (Abb.26, A).

Um die Resultate zu bestätigen, wurden K562-Zellen erneut mit USP9X-siRNA oder unspezifischer nt-siRNA transfiziert. 48 h nach Elektroporation wurden die Zellen mit 10 Gy bestrahlt. 30 h und 48 h nach Bestrahlung wurden Lysate hergestellt und mittels Western-Blots analysiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde das USP9X-Level durch die spezifische siRNA deutlich herunterreguliert (Abb.26, B). 30 h nach Bestrahlung war keine Änderung des Mcl-1-Levels und keine Caspasenaktivierung detektierbar (Abb.26, B links). 48 Stunden nach Bestrahlung wurde in Zellen mit niedrigem USP9X-Level ein deutlich geringeres Mcl-1-Level detektiert als in Zellen mit hohem USP9X-Level. Ebenso wurde zu diesem Zeitpunkt eine stärkere Spaltung von Caspase-3 und des Caspase-3-Substrates PARP in den mit USP9X-siRNA transfizierten detektiert (Abb.26, B rechts).

Eine Herunterregulierung von USP9X konnte, ebenso wie die Jurkat-Zellen, auch die K562-Zellen gegenüber ionisierender Strahlung sensitivieren. Somit konnte die radioprotektive Wirkung von USP9X nicht nur in Jurkat-Zellen, sondern auch in K562-Zellen gezeigt werden, so dass generell von einem USP9X-abhängigen Mechanismus auszugehen ist, der zu Radioresistenz beiträgt.

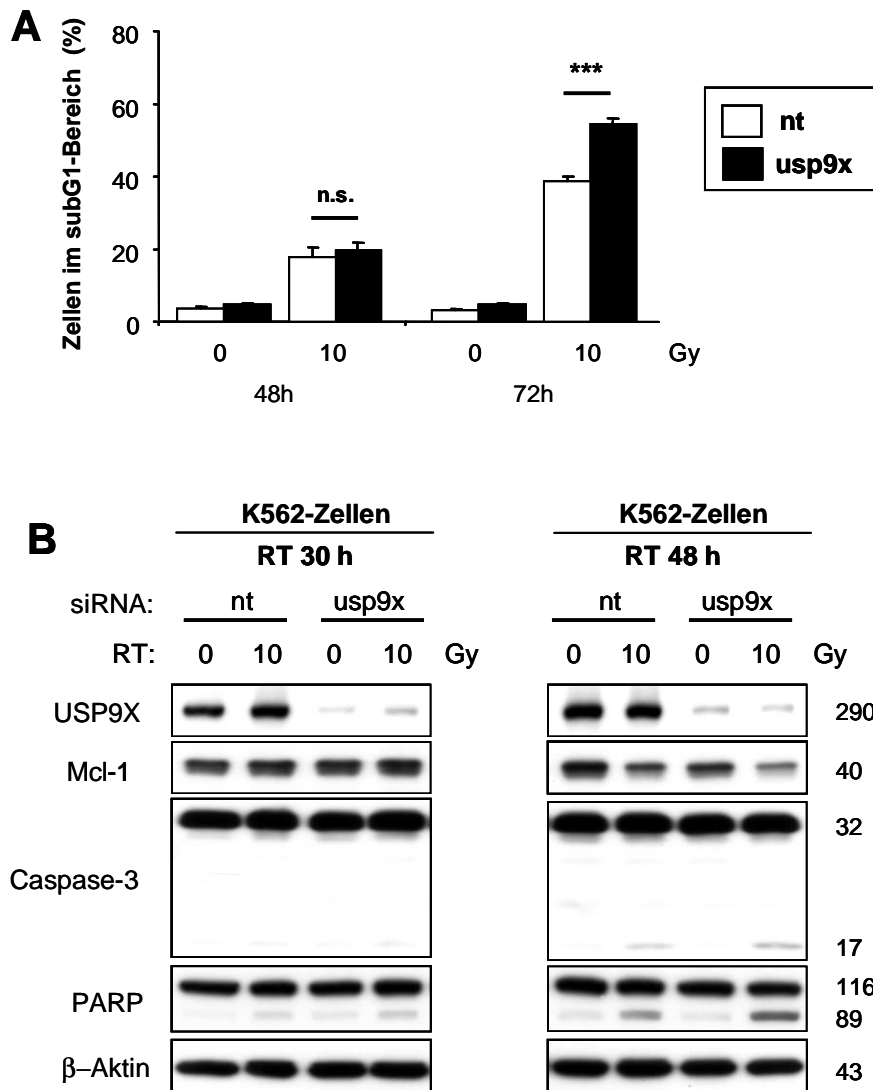


Abb.26: Herunterregulierung von USP9X in K562-Zellen verbessert strahleninduzierte Mcl-1-Degradierung und Apoptose in K562-Zellen. K562-Zellen wurden mit 1 μ M USP9X-siRNA oder unspezifischer nt-siRNA transfiziert. 48 h nach Elektroporation wurden die Zellen mit 10 Gy bestrahlt. 48 h und 72 h nach Bestrahlung wurde die DNA-Degradierung durchflusszytometrisch bestimmt (**A**). 30 h und 48 h nach Bestrahlung wurden Lysate hergestellt und mittels Western-Blots analysiert (**B**). Die Ergebnisse zeigen, dass eine Herunterregulierung von USP9X zu einer erhöhten DNA-Fragmentierung 72 h nach Bestrahlung führt sowie in einem erhöhten Abbau von Mcl-1 und einer stärkeren Prozessierung von Caspase-3 und PARP 48 h nach Bestrahlung resultiert. *** $p < 0.001$ n.s. > 0.05

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass USP9X ein neuer möglicher Resistenzfaktor ist, welcher zur Stabilisierung von Mcl-1 führt und damit auch zu erhöhter Strahlenresistenz.

7. Diskussion

Ionisierende Strahlung ist in der Tumorthherapie wegen ihres antiproliferativen und zytotoxischen Effekts weit verbreitet. Die Wirkung der Radiotherapie unterscheidet sich sehr in den unterschiedlichen Tumoren. Es ist notwendig, Faktoren, die für die Radioresistenz verantwortlich sind, zu identifizieren und gezielt zu neutralisieren, um die therapeutische Wirkung zu verbessern. Die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1 wurden bereits als Resistenzfaktoren identifiziert (An et al., 2007; Nix et al., 2005; Svara et al., 2005). Sie verhindern im Falle einer Überexpression die durch Bestrahlung induzierte Apoptose, unterstützen das Überleben der Zellen und beeinträchtigen den Effekt der Radiotherapie. Viele Tumorzellen überexprimieren Mcl-1 und/oder scheitern an der Herunterregulierung des anti-apoptotischen Proteins nach einer chemotherapeutischen Monotherapie (Sieghart et al., 2006; Wirth et al., 2005). Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf das anti-apoptotische Protein Mcl-1, das transkriptionell, translationell und posttranslationell z.B. durch Ubiquitinligasen und Deubiquitinasen genau reguliert wird. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass die Deubiquitinase USP9X bei der Entwicklung von Radioresistenz mitwirkt, indem sie Mcl-1 stabilisiert.

7.1 Resistenz in Jurkat T-Lymphomzellen geschieht durch verminderte Herunterregulierung von Mcl-1 nach Bestrahlung

Die Detektion der Spaltung von Caspasen sowie der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und die DNA-Degradierung können zum Nachweis von Apoptose verwendet werden (Duan et al., 2003; Chowdhury et al., 2006). Es wurden die parentalen Jurkat T-Lymphomzellen und ein daraus abgeleiteter Subklon untersucht. Diese Zellen unterschieden sich in ihrer Fähigkeit, Apoptose nach Bestrahlung einzuleiten und wurden deswegen als sensitiv (bzw. strahlensensitiv, RT-sensitiv) oder resistent (bzw. strahlenresistent, RT-resistent) bezeichnet. Nach Bestrahlung zeigten sensitive Jurkat T-Lymphomzellen einen bedeutend höheren prozentualen Anteil an Zellen mit zerstörtem mitochondrialen Membranpotential als die resistenten

Zellen. Auch die DNA-Degradierung war in strahlensensitiven Zellen nach Bestrahlung stärker ausgeprägt (Abb.9). Außerdem wurden in den sensitiven Zellen Caspasen aktiviert, während dies in resistenten kaum der Fall war (Abb.8). Untersuchungen in Jurkat T-Lymphomzellen zeigen im Rahmen dieser Arbeit eine fehlende Herunterregulierung von Mcl-1 in strahlenresistenten Zellen, während die strahlensensitiven Zellen Mcl-1 sehr effizient nach Bestrahlung herunterregulierten (Abb.19).

Es wurde daher vermutet, dass die misslungene Herunterregulierung von Mcl-1 nach Bestrahlung der Grund für das erhöhte Überleben strahlenresistenter Jurkat-Zellen ist. In der Folge konnte gezeigt werden, dass ein ausreichend hohes Mcl-1-Level essentiell für das Überleben von Jurkat-Zellen ist, da die Herunterregulierung von Mcl-1 mittels siRNA eine bedeutende Zunahme der Apoptose mit sich brachte (Abb.11). Diese Ergebnisse konnten durch eine frühere Untersuchung untermauert werden, die eine Korrelation zwischen strahlungsinduziertem Abbau von Mcl-1 und strahlungsinduzierter Apoptose zeigen konnte (Kubota et al., 2007). Die Vermutung, Mcl-1 stelle ein Resistenzfaktor gegenüber Bestrahlung dar, wurde damit erhärtet.

Andererseits konnte gezeigt werden, dass Apoptose auch ohne Beteiligung von Mcl-1 erfolgen kann (Lee et al., 2008). Es muss also davon ausgegangen werden, dass auch andere Faktoren in der Regulierung der Radiosensitivität von Jurkat-Zellen zusätzlich beteiligt sein könnten. Diese wurden in dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht.

7.2 Mcl-1-Abbau nach Bestrahlung wird nicht durch Herunterregulierung der Protein-Translation verursacht

7.2.1 Ionisierende Strahlung bewirkt eine Hemmung der Protein-Translation

Eine Möglichkeit für die Regulierung des Mcl-1-Levels ist die Protein-Translation. Sie ist in Tumorzellen oft fehlreguliert und begünstigt die Tumorgenese (Braunstein et al., 2009; Lee & Pelletier, 2012). Die caspaseabhängige Prozessierung von Translationsfaktoren ist ein zentraler Mechanismus nach Apoptoseinduktion (Marissen et al.1998; Bushell et al., 2001; Clemens et al., 2000; Fraser et al., 2004). Sie führt in der Regel zur

Inaktivierung dieser Translationsfaktoren. Andere dagegen, wie z.B. DAP5, zeigen nach einer proteolytischen Spaltung gesteigerte translationelle Aktivität (Marash et al., 2005; Marash et al., 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Bestrahlung zur Spaltung der Translationsfaktoren eIF4G1, eIF3A und DAP5 in sensitiven Jurkat-Zellen führte (Abb.12 und Abb.14). Gleichzeitig wurde eine Abnahme von eIF4B beobachtet. Sowohl die Spaltung von eIF4G1 und eIF3A als auch die eIF4B-Abnahme erfolgten nach Caspasenaktivierung, da beides durch den Caspasenblocker zVAD inhibiert wurde (Abb.13). Diese Ergebnisse führten zu einer Vermutung einer Hemmung der oben genannten Translationsfaktoren und somit einer Herunterregulierung der Cap-abhängigen Translation. Zum anderen führte die Prozessierung von DAP5 zur Frage, ob ein caspaseabhängiger Übergang von Cap-abhängiger zu Cap-unabhängiger Translation stattfindet. Ähnlich wie eIF4G1 kann DAP5 mit eIF3A und eIF4A interagieren. Ein Übergang von Cap-abhängiger zu Cap-unabhängiger Translation nach Bestrahlung würde eine verminderte Bindung von eIF3A und eIF4A mit eIF4G1 bedeuten und dafür eine erhöhte Bindung mit DAP5. Um zu klären, ob nach Bestrahlung ein Übergang von Cap-abhängiger zu Cap-unabhängiger Translation stattfindet, wurden innerhalb unserer Arbeitsgruppe jeweils DAP5 und eIF4G1 immunpräzipitiert und die Copräzipitierung von eIF3A und eIF4A mittels Western-Blot-Analysen untersucht (Trivigno et al., 2013). Weniger eIF3A und eIF4A copräzipitierten mit DAP5 und eIF4G1 in bestrahlten Zellen. Dies deutete darauf hin, dass die Interaktion von eIF3A und eIF4A sowohl mit DAP5 als auch mit eIF4G1 abnahm. Die Ergebnisse zeigen somit, dass in RT-sensitiven Zellen sowohl die eIF4G1-abhängige als auch die DAP5-abhängige Translation durch ionisierende Strahlung gehemmt wird. Mittels pull-down Assays mit 7-Methyl GTP Agarose, welche die Cap-Struktur der mRNA imitiert, konnte die nach Bestrahlung reduzierte Interaktion von eIF4G1 mit eIF4A und eIF3A bestätigt werden (Trivigno et al., 2013).

Insgesamt ergaben die aufgeführten Ergebnisse, dass in Jurkat-Zellen die strahlungsinduzierte Spaltung von eIF4G1, eIF4B, eIF3A und DAP5 zur Auflösung des Cap-/eIF4G1 und IRES-/DAP5-abhängigen Initiationskomplexes

führt. Daher ist der Wechsel von Cap-abhängiger zu Cap-unabhängiger Translation nach Bestrahlung mit Erhöhung der Cap-unabhängigen Translationsaktivität nach Prozessierung von DAP5, wie sie früher von Marash et al. vorgeschlagen wurde, sehr unwahrscheinlich (Marash et al., 2005; Marash et al., 2008). Da die gleichzeitige Herunterregulierung von eIF4G1 und DAP5 durch siRNA in einer verbesserten Apoptoseinduktion nach Bestrahlung resultierte, kann der Schluss gezogen werden, dass eine Hemmung der Translation die toxische Wirkung der ionisierenden Strahlung in Jurkat-Zellen verbessert. Allerdings war dieser toxische Effekt minimal, obwohl er signifikant war.

7.2.2 Die Regulierung der Cap-abhängigen Translation geschieht durch caspasenunabhängige Mechanismen

Ein zentraler Regulationsfaktor der Cap-abhängigen Translation ist 4EBP1 (Braunstein et al., 2009). Die Phosphorylierung von 4EBP1 wird durch den Akt/mTOR-Signalweg reguliert (Hidalgo & Rowinsky, 2000; She et al., 2010). Aufgrund einer Mutation im PTEN-Protein ist Akt in Jurkat-Zellen konstitutiv phosphoryliert und damit aktiv (Xie et al., 2014). Hemmt man den Signalweg durch LY294002 in Jurkat-Zellen, so führt dies zu einer Dephosphorylierung von 4EBP1 und S6K (Abb.17, A). Frühere Publikationen haben gezeigt, dass die Dephosphorylierung des Translationsinhibitors 4EBP1 in seiner Aktivierung resultiert. Dephosphoryliertes 4EBP1 bindet an eIF4E und unterbindet so eine Interaktion von eIF4E mit eIF4G1 (Marcotrigiano et al., 1999). Andererseits muss S6K phosphoryliert sein, um S6 zu phosphorylieren, das wiederum die Translation ribosomaler Proteine positiv reguliert. Folglich führt sowohl die Dephosphorylierung von 4EBP1 als auch die von S6K zur Hemmung der Translation.

LY294002 verursacht zusätzlich zur Dephosphorylierung von 4EBP1 und S6K eine Abnahme von Mcl-1 (Abb.17, A). Es wäre naheliegend zu vermuten, dass die Hemmung des Akt-Signalweges in der Inhibierung der Mcl-1-Translation und folglich in der Reduktion des Mcl-1-Proteinlevels und vermehrter Apoptose resultiert. Dies würde frühere Studien bestätigen, die gezeigt haben, dass die Inhibierung des Akt/mTOR-Signalwegs das Überleben der Zelle reduziert

(Rudner et al., 2010a). Überraschend war, dass Bestrahlung zwar ebenfalls zur Dephosphorylierung von 4EBP1 und Reduktion des Mcl-1-Levels führte, jedoch blieb der Phosphorylierungsstatus von Akt, mTOR und S6K unverändert (Abb.17, B). Es ist demzufolge unwahrscheinlich, dass die Dephosphorylierung von 4EBP1 und das Mcl-1-Level vom Akt-Signalweg reguliert wird. Die 4EBP1-Dephosphorylierung nach Bestrahlung muss durch andere Mechanismen reguliert werden. Da keine weiteren Kinasen außer mTOR bekannt sind, welche 4EBP1 phosphorylieren können, ist möglicherweise ionisierende Strahlung für eine erhöhte Phosphataseaktivität verantwortlich, die zu einer vermehrten Dephosphorylierung von 4EBP1 führt. Eine Phosphatase, die 4EBP1 dephosphoryliert, wurde bisher nicht identifiziert. Diese Phosphatase müsste caspaseunabhängig aktiviert werden, da 4EBP1 trotz Inhibierung der Caspaseaktivität mittels des Caspaseninhibitors zVAD-fmk nach Bestrahlung dephosphoryliert wird (Abb.13).

Weiterhin zeigen neuere Veröffentlichungen, dass die S6K nicht nur durch den Akt/mTOR-Signalweg, sondern auch durch die extrazellulär regulierte Kinase ERK-1/-2 aktiviert werden kann (She et al., 2010). Eine anhaltende ERK-1/-2-Aktivierung könnte auch zur anhaltenden Phosphorylierung von S6K in bestrahlten Jurkat-Zellen beitragen. Die nähere Untersuchung des ERK-1/-2-Signalwegs könnte in diesem Zusammenhang weitere Erkenntnisse über die Regulierung der Translation in Jurkat- Zellen bringen.

7.2.3 Die strahlungsabhängige Reduktion des Mcl-1-Levels wird weder Cap-/eIF4G1- noch IRES/DAP5-abhängig reguliert

Die gleichzeitige Abnahme des Mcl-1-Levels und die Hemmung der Translation durch Dephosphorylierung von 4EBP1 weisen eher auf eine Cap-abhängige Regulierung des Mcl-1-Levels hin. Die Herunterregulierung von eIF4G1 mittels siRNA sorgte für eine Reduktion des Mcl-1-Levels in gesunden Jurkat-Zellen und bestätigte diese Annahme (Abb.15). Überraschenderweise beeinflusste weder die Herunterregulierung von eIF4G noch von eIF4B oder DAP5 mittels siRNA die strahleninduzierte Herunterregulierung von Mcl-1 (Abb.15 und Abb.16). Dies bedeutet, dass die strahlungsabhängige Reduktion des Mcl-1-

Levels weder von der Cap-/eIF4G1- noch IRES/DAP5-abhängigen Translation reguliert wurde.

7.3 Einfluss der BH3-only-Proteine auf die Mcl-1-Stabilität

Da die bisherigen Resultate implizierten, dass das Mcl-1-Level nach Bestrahlung weder translationell noch durch Caspasen geregelt wurde, wurde vermutet, dass posttranslationelle Mechanismen die Stabilität des anti-apoptotischen Proteins kontrollieren.

Anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Proteingruppe spielen eine protektive Rolle während der Apoptose (Adams & Cory, 2007; Certo et al., 2006; Youle & Strasser, 2008). So kann die Herunterregulierung von Mcl-1 nur dann zur Apoptoseinduktion führen, wenn keine anderen anti-apoptotischen Proteine diese protektive Funktion ausüben können. Ein erhöhtes Proteinlevel von Bcl-x_L und Bcl-2 kann, trotz Herunterregulierung von Mcl-1, zu einer Hemmung der Apoptoseinduktion nach Bestrahlung führen (Rudner et al., 2011; Kubota et al., 2007; Rudner et al., 2010a; Song et al., 2005a). In einem solchen Fall könnten Bcl-2/Bcl-x_L-Inhibitoren, wie z.B. die BH3-Mimetika ABT-737 oder ABT-263, welche das BH3-only-Protein Bad imitieren und Bcl-x_L und Bcl-2 binden, die Zytotoxizität von Bestrahlung und Chemotherapie erhöhen (Harrison et al., 2011; Oakes et al., 2011; Oltersdorf et al., 2005).

BH3-only-Proteine sind grundsätzlich in der Lage, an anti-apoptotischen Proteinen zu binden, um diese zu neutralisieren. Es gibt jedoch auch Hinweise in der Literatur, wonach die BH3-only-Proteine Bim, Puma und Noxa das anti-apoptotische Protein Mcl-1 stabilisieren können (Nakajima et al., 2014; Czabotar et al., 2007; Mei et al., 2005). Weiterhin wurde beschrieben, dass alle drei BH3-only Proteine an der Regulierung der strahleninduzierten Apoptose beteiligt sind (Erlacher et al., 2005; Michalak et al., 2008). Es wurde bereits mehrmals eine Heraufregulierung von Puma und Noxa nach Bestrahlung beobachtet (Oda et al., 2000; Nakano & Voudsen, 2001). In diesem Zusammenhang werden Bim, Puma und Noxa nach Beschädigung der DNA durch Bestrahlung normalerweise über den Tumorsuppressor p53 heraufreguliert. Aufgrund einer Mutation exprimieren Jurkat-Zellen jedoch kein p53 (Vigorito et al., 1999).

Die Regulierung des Levels dieser Proteine erfolgt in Jurkat-Zellen somit unabhängig von p53.

Des Weiteren wurden die Proteinlevel von Bim und Noxa nach Bestrahlung nicht verändert, wohingegen Puma nach Bestrahlung sogar herunterreguliert wurde (Abb.19). Die Abnahme des Puma-Levels ereignete sich jedoch zeitlich nach Caspasen-Aktivierung in der Exekutionsphase (siehe 3.4) der Apoptose. Da die Herunterregulierung von Mcl-1 aber vor Caspasenaktivierung erfolgte, kann ein Einfluss des veränderten Puma-Levels auf die Mcl-1-Stabilität ausgeschlossen werden.

Zudem zeigte die Herunterregulierung von Bim, Puma und Noxa durch siRNA keine Auswirkung auf das Mcl-1-Level oder die Sensitivität gegenüber strahleninduzierter Apoptose (Abb.20).

Es kann somit gefolgert werden, dass Bim, Puma und Noxa keine essentielle Rolle in der strahleninduzierten Herunterregulierung von Mcl-1 und Apoptoseinduktion spielen.

Das BH3-only-Protein tBid kann, ebenso wie Bim und Puma, alle anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Proteingruppe mit ähnlich guter Affinität binden (Kim et al., 2006; Letai et al., 2002; Rudner et al., 2011). Da tBid in Jurkat-Zellen jedoch erst durch Caspasen prozessiert wird (Belka et al., 2000), ist es unwahrscheinlich, dass es caspaseunabhängige Prozesse wie z.B. die Herunterregulierung von Mcl-1 reguliert.

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass BH3-only-Proteine die Mcl-1-Stabilität und das Überleben der Jurkat-Zellen nach Bestrahlung nicht beeinflussen.

7.4 Regulierung von Mcl-1 durch Ubiquitinligasen und Deubiquitinasen

7.4.1 Regulierung der Mcl-1-Stabilität durch Ubiquitinligasen

Frühere Publikationen zeigten, dass Mcl-1 in der Regel schnell ubiquitiniert wird, was zur proteasomalen Degradierung des anti-apoptotischen Proteins führt. Eine schnellere Mcl-1-Ubiquitinierung könnte eine Erklärung dafür sein, dass RT-sensitive Jurkat-Zellen Mcl-1 erfolgreicher nach Bestrahlung herunterregulieren als RT-resistente Jurkat-Zellen. Es wurde bereits

beschrieben, dass die Kinase GSK-3 β Mcl-1 am Serin 159 phosphorylieren und dadurch die Ubiquitinierung durch die Ubiquitinligasen β -TrCP und FBW7 beschleunigen kann (Maurer et al., 2006; Ding et al., 2007a; Gomez-Bougie et al., 2011). Mcl-1-Phosphorylierung unterstützt zwar dessen Degradierung, ist jedoch nicht essentiell für den β -TrCP- und FBW7-abhängigen Abbau von Mcl-1 (Ding et al., 2007a; Wertz al., 2011).

Phosphorylierung von GSK-3 β durch Akt/PKB führt zur Hemmung des Proteins (Song et al., 2005b). Eine inhibierte GSK-3 β müsste demzufolge in einer Mcl-1-Stabilisierung resultieren. Ein hohes Mcl-1-Level wurde bereits mit dem phospho-GSK-3 β -Gehalt in Mammakarzinom-Zellen korreliert und führte zu einer schlechten Prognose in Mammakarzinom-Patienten (Ding et al., 2007b). In Jurkat-Zellen hatte Bestrahlung jedoch, wie der Phosphorylierungsstatus von Akt und GSK-3 β zeigte, keinen Effekt auf den Akt/GSK-3 β -Signalweg, obwohl die GSK-3 β -Substrate Mcl-1 und β -Catenin herunterreguliert wurden. Außerdem führte eine Hemmung von GSK-3 β durch einen spezifischen Inhibitor zu einer Akkumulation von β -Catenin, nicht jedoch von Mcl-1. Die Inhibierung der GSK-3 β -Aktivität blieb ebenfalls ohne Effekt auf die strahlungsinduzierte Apoptose (Abb.21, A). Des Weiteren konnte innerhalb unserer Arbeitsgruppe weder in den strahlensensitiven noch in den -resistenten Jurkat-Zellen eine Phosphorylierung an immunpräzipitiertem Mcl-1 detektiert werden (Trivigno et al., 2013). Anhand dieser Ergebnisse wurde folglich der Schluss gezogen, dass GSK-3 β weder die Mcl-1-Stabilität noch die Radiosensitivität in Jurkat-Zellen beeinflusst.

Obwohl eine Mcl-1-Regulierung durch GSK-3 β ausgeschlossen wurde, könnten die Ubiquitinligasen β -TrCP und FBW7 trotzdem zum proteasomalen Abbau von Mcl-1 nach Bestrahlung, insbesondere in den strahlensensitiven Zellen, beitragen. Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe zeigten, dass es spezielle Wege zur Regulierung der Mcl-1-Ubiquitinierung geben muss, da sich in strahlenresistenten Zellen der Ubiquitinierungsstatus von Mcl-1 nach Bestrahlung änderte (Trivigno et al., 2013), nicht jedoch der unspezifische Ubiquitinierungsstatus von allen Proteinen (Abb.23).

Eine weitere Mcl-1-erkennende Ubiquitinligase ist MULE. Sie bindet kompetitiv über ihre BH3-Domäne an Mcl-1 (Zhong et al., 2005). Noxa, Bim oder Puma könnten mit ihrer BH3-Domäne Mcl-1 binden und eine Bindung der Ligase an das protektive Protein verhindern. Die BH3-only-Proteine könnten somit MULE aus dem Komplex verdrängen und somit Mcl-1 stabilisieren, vermutlich durch Verhinderung der MULE-abhängigen Ubiquitinierung. Auf die Möglichkeit einer solchen Regulierung wurde bereits in der Literatur hingewiesen (Warr et al., 2005; Gomez- Bougie et al., 2011). Wie bereits oben beschrieben, hatte die Herunterregulierung von Noxa, Puma oder Bim durch siRNA jedoch keinen Einfluss auf das Mcl-1-Level weder in bestrahlten noch in unbestrahlten Jurkat-Zellen. Folglich ist auch eine Regulierung von Mcl-1 durch MULE, wie sie in der Literatur für möglich gehalten wurde, nicht wahrscheinlich.

7.4.2 USP9X wird nach Bestrahlung aktiviert und stabilisiert Mcl-1

Mcl-1-Stabilität kann auch durch eine angepasste Deubiquitinierung reguliert werden. Deubiquitinasen sind Enzyme, die an Proteinen vorhandene Ubiquitinketten entfernen und dadurch den proteasomalen Abbau des Proteins verhindern können. Somit können Deubiquitinasen zu einer Verlängerung der Proteinlebensdauer und zur Proteinstabilisierung beitragen. Erst vor Kurzem wurde USP9X als eine Deubiquitinase identifiziert, die Mcl-1 stabilisieren kann (Schwickart et al., 2010). Ein erhöhtes USP9X-Level korreliert in diffus großzelligen B-Zelllymphomen mit einem hohen Mcl-1-Proteinlevel und führt zu einer schlechten Prognose in Patienten mit multiplem Myelom (Schwickart et al., 2010). Außerdem führt die Herunterregulierung von USP9X durch siRNA zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber dem BH3-Mimetikum ABT-737 (Schwickart et al., 2010). Ein erhöhtes USP9X-Level scheint dabei für ein erhöhtes Mcl-1-Level verantwortlich zu sein, das zur Apoptoseresistenz gegenüber dem Bcl-2/Bcl-x_L-Inhibitor ABT-737 führt.

In den für diese Arbeit verwendeten strahlensensitiven und -resistenten Jurkat-Zellen wurden vergleichbar hohe USP9X-Level detektiert. Auch nach Bestrahlung änderte sich das USP9X-Level weder in strahlenresistenten noch in -sensitiven Zellen (Trivigno et al., 2013).

Daher müssen die strahlenresistenten Zellen einen Mechanismus entwickelt haben, der zur Stabilisierung von Mcl-1 nach Bestrahlung führt. Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Herunterregulierung von USP9X signifikante Auswirkung auf die Apoptose in strahlensensitiven und -resistenten Jurkat-Zellen hatte (Abb.24). Theoretisch wird durch Herunterregulierung von USP9X Mcl-1 vermindert deubiquitiniert und dadurch vermehrt proteasomal abgebaut. Dies sollte zu einem erniedrigten Mcl-1-Level führen. Obwohl eine Transfektion sowohl der strahlensensitiven als auch der -resistenten Jurkat-Zellen mit USP9X-siRNA keine Auswirkung auf das Mcl-1-Level in unbestrahlten Zellen hatte, zeigten insbesondere die strahlenresistenten Zellen bei einem niedrigen USP9X-Level eine bessere Mcl-1-Herunterregulierung und Apoptoseinduktion nach Bestrahlung (Abb.24). Der strahlensensitivierende Effekt nach Herunterregulierung von USP9X konnte auch in den strahlenresistenten K562-Zellen reproduziert werden (Abb.26).

Offensichtlich waren strahlenresistente Zellen im Gegensatz zu strahlensensitiven Zellen in der Lage USP9X nach Bestrahlung zu aktivieren. In der Folge konnte eine erhöhte Phosphorylierung von USP9X nach Bestrahlung gezeigt werden, die stärker in den strahlenresistenten als in den strahlensensitiven Zellen ausfiel (Trivigno et al., 2012). Phosphorylierung von Proteinen wird häufig mit einer veränderten Aktivität assoziiert. Messungen der USP9X-Aktivität zeigten insbesondere in strahlenresistenten Jurkat-Zellen in der Tat eine signifikante Zunahme der USP9X-Aktivität nach Bestrahlung (Trivigno et al., 2012). Die erhöhte Aktivität von USP9X nach Bestrahlung korrelierte mit einer erhöhten Interaktion zwischen Mcl-1 und USP9X, die ebenfalls innerhalb unserer Arbeitsgruppe detektiert wurde (Trivigno et al., 2013). Aus diesen Ergebnissen konnte darauf geschlossen werden, dass USP9X in den strahlenresistenten Jurkat-Zellen nach Bestrahlung aktiviert wurde. Dadurch wurde das anti-apoptotische Protein Mcl-1 verstärkt deubiquitiniert und stabilisiert, was schließlich im verbesserten Überleben der Zellen nach Bestrahlung resultierte. Wie es genau zur USP9X-Aktivierung in den bestrahlten Zellen kam, bleibt weiterhin ungelöst. Bisher sind keine

Mechanismen bekannt, welche die Aktivierung von USP9X und die Substraterkennung regulieren.

Außerdem ist USP9X ein 290 kDa großes Protein mit mehreren Domänen, das nicht nur Mcl-1, sondern auch β -Catenin und die Ubiquitinligase Itch bindet (Mouchantaf et al., 2006; Taya et al., 1999). Itch reguliert die Ubiquitinierung von Endophilin, einem Protein, das in der Endozytose und Degradierung von Wachstumsrezeptoren involviert ist. β -Catenin kontrolliert die Proliferation und das Überleben der Zelle durch Transkriptionsinduktion. Beide Proteine spielen in der zellulären Transformation eine Rolle. Interessanterweise nimmt das Level von β -Catenin nach Bestrahlung, ähnlich wie bei Mcl-1, nur in strahlensensitiven Jurkat-Zellen ab, während das Protein im resistenten Subklon stabil zu sein scheint (Trivigno et al., 2013). Das Proteinlevel von Itch wurde in in Jurkat-Zellen bisher nicht untersucht. Watson konnte mit seiner Arbeitsgruppe zeigen, dass β -Catenin über den GSK-3 β -Signalweg die Zytotoxizität in Pankrastumoren nach Bestrahlung modulieren kann (Watson et al., 2010). Sowohl die Herunterregulierung von β -Catenin als auch von Itch könnten zu einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber einer Strahlentherapie beitragen. Ob USP9X über eine verstärkte Deubiquitinierung auch andere Substrate stabilisiert und ob diese auch zur Strahlenresistenz beitragen, soll in der Zukunft untersucht werden.

7.4 Zusammenfassung und Fazit

Um ein Überleben der Zelle unter Stress zu gewährleisten, muss ein gewisses Level an protektiven Proteinen in der Zelle vorhanden sein. Mcl-1 ist ein anti-apoptotisches Protein der Bcl-2-Proteingruppe, das in vielen Tumoren überexprimiert wird und ein Resistenzfaktor gegenüber Tumorthérapien, wie z.B. Bestrahlung, darstellt. In vielen Tumorzellen ist eine Herunterregulierung von Mcl-1 ausreichend, um Apoptose zu induzieren (Rudner et al., 2010b; Wang et al., 2012). Findet diese Herunterregulierung nicht statt, könnte dies in einem verbesserten Überleben und schlechterer Apoptoseinduktion resultieren. Im Gegensatz zu den anti-apoptotischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-x_L ist Mcl-1 ein kurzlebige Protein. Nach Herunterregulierung der Proteintranslation kommt es zu einer schnellen Abnahme des Proteinlevels und zu Apoptoseinduktion

(Adams & Cooper, 2007; Huber et al., 2011). Bisher wurde der Zusammenhang zwischen Proteintranslation und strahlungsinduzierter Abnahme des Mcl-1-Levels noch nicht ausreichend erforscht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Jurkat-Zellen die Proteintranslation in Bezug auf das Mcl-1-Level nach Bestrahlung untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Bestrahlung sowohl die Cap-abhängige als auch die Cap-unabhängige Translation in Jurkat-Zellen inhibiert. Mechanismen, welche zur strahlungsinduzierten Regulierung der Translation führen, sind sowohl die caspaseabhängige Spaltung von eIF4G1, eIF4B und DAP5 als auch die caspaseunabhängige Dephosphorylierung von 4EBP1, einem Translationsinhibitor, der in dephosphorylierter Form die Aktivierung der Cap-abhängigen Translation verhindert. Die strahlungsinduzierte Abnahme des phosphorylierten 4EBP1 resultierte nicht aus der Inhibierung von Akt und mTOR, sondern war wahrscheinlich die Konsequenz einer erhöhten Phosphataseaktivität. Eine Herunterregulierung von eIF4G, DAP5 oder eIF4B führte nach Bestrahlung nicht zu einem verminderten Mcl-1-Level und erhöhter Apoptoseinduktion. Es konnte also geschlossen werden, dass die Proteintranslation nach Bestrahlung an verschiedenen Punkten reguliert wird. Der strahlungsinduzierte Abfall des Mcl-1-Levels wurde jedoch nicht durch die Inhibierung der Translation verursacht. Deswegen wurde die posttranslationelle Regulierung von Mcl-1 näher betrachtet. Die Ubiquitinligasen Mule, β -TrCP und FBW7 können Mcl-1 ubiquitinieren und damit für den proteasomalen Abbau kennzeichnen. Die Deubiquitinase USP9X hingegen kann an Mcl-1 gebundene Polyubiquitinketten entfernen und somit die proteasomale Degradierung von Mcl-1 verhindern. Studien innerhalb unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass ionisierende Strahlung zu einer Aktivierung von USP9X und somit zu einer erhöhten Deubiquitinierung von Mcl-1 in resistenten Zellen führt (Trivigno et al., 2012). Eine Herunterregulierung von USP9X durch siRNA führte in strahlenresistenten Jurkat- und K562-Zellen zu einer verbesserten strahleninduzierten Herunterregulierung von Mcl-1 und zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber strahleninduzierter Apoptose. Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht nur das Proteinlevel von USP9X, sondern auch die Fähigkeit der

Zellen zur strahlungsinduzierten Aktivierung von USP9X ausschlaggebend für die Regulierung von Mcl-1 ist.

Aus den beschriebenen Ergebnissen geht hervor, dass die Deubiquitinase USP9X ein neuer Radioresistenzfaktor ist, der nach Bestrahlung aktiviert wird und durch Stabilisierung von Mcl-1 die Apoptoseinduktion verhindert.

8. Ausblick

Die Erforschung von Mechanismen in Tumorzellen auf molekularer Ebene, welche Resistenzen in der Strahlentherapie bedingen, kann zur Therapieoptimierung bei onkologischen Erkrankungen beitragen. Experimentelle Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die strahlungsinduzierte Abnahme des Mcl-1-Levels keine Konsequenz der Translationshemmung in Jurkat-Zellen ist. Da das Mcl-1-Level nicht durch Translation reguliert wird, wurden posttranslationelle Aspekte der Mcl-1-Regulierung näher untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Deubiquitinase USP9X als neuer Radioresistenzfaktor identifiziert werden. In Zukunft wäre die Entwicklung eines USP9X-Inhibitors nützlich, um experimentell und später auch pharmakologisch neue Wege in der Tumorthherapie zu öffnen. Die Ergebnisse der vorliegenden Experimente basieren auf Zellen des lymphatischen Systems. Interessant wäre die Überprüfung der hier aufgeführten Ergebnisse in soliden Tumoren.

Andere Experimente haben gezeigt, dass Apoptose auch ohne die Degradierung von Mcl-1 stattfinden kann (Lee et al., 2008). Es kann deswegen nicht ausgeschlossen werden, dass andere Proteine in der Regulierung der Radiosensitivität in Jurkat-Zellen involviert sind. Es wäre deswegen nützlich, diese Proteine ebenfalls zu identifizieren. Weiterhin bindet USP9X nicht spezifisch an Mcl-1 und hat somit verschiedene Substrate. Die Regulierung anderer Proteine durch USP9X und deren Einfluss auf die Strahlensensitivität sind ebenfalls noch unbekannt und sollten untersucht werden.

9. Literaturverzeichnis

Adams, J. M. and S. Cory (2007a). "The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy." *Oncogene* 26;26(9):1324-37.

Adams, K. W. and G. M. Cooper (2007b). "Rapid turnover of mcl-1 couples translation to cell survival and apoptosis." *J Biol Chem* 282(9): 6192-6200.

Akgul, C., D. A. Moulding, et al. (2000) "In vivo localisation and stability of human Mcl-1 using green fluorescent protein (GFP) fusion proteins." *FEBS Lett.* 28;478(1-2):72-6.

An J, Chervin AS, Nie A, Ducoff HS, Huang Z. (2007). Overcoming the radioresistance of prostate cancer cells with a novel Bcl-2 inhibitor. *Oncogene.* 26(5):652-61.

André, N. (2003). Hippocrates of Cos and apoptosis, *Lancet.* 361(9365):1306.

Bae, J., C. P. Leo, et al. (2000) "MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain." *J Biol Chem.* 8;275(33):25255-61.

Bamberg, M., Molls, M., Sack, H. (2004). *Radioonkologie.* W. Zuckschwerdt Verlag GmbH, Germering/München

Begg AC, Stewart FA, Vens C. (2011) Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat Rev Cancer.* 11(4):239-53.

Belka, C., J. Rudner, et al. (2000). "Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis." *Oncogene.* 19(9):1181-90.

Bhaskar, P. T., V. Nogueira, et al. (2009) "mTORC1 hyperactivity inhibits serum deprivation-induced apoptosis via increased hexokinase II and GLUT1 expression, sustained Mcl-1 expression, and glycogen synthase kinase 3beta inhibition." *Mol Cell Biol.* 29(18):5136-47.

Bhide SA, Nutting CM. (2010). Recent advances in radiotherapy. *BMC Med.*28;8:25.

Bingle, C. D., R. W. Craig, et al. (2000). "Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death." *J Biol Chem.* 21;275(29):22136-46.

Bischof, O., A. Dejean, et al. (2009). "A review of cellular senescence: friend or foe of tumorigenesis?." *Med Sci* 25(2): 153-160.

Boise, L. H., M. Gonzalez-Garcia, et al. (1993). "bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death." *Cell.* 74(4):597-608.

Boyd, J. M., G. J. Gallo, et al. (1995). "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.* 11(9):1921-8.

Braunstein, S., M. L. Badura, et al. (2009). "Regulation of protein synthesis by ionizing radiation." *Mol Cell Biol* 29(21): 5645-5656.

Bushell, M., W. Wood, et al. (2001). "Disruption of the interaction of mammalian protein synthesis eukaryotic initiation factor 4B with the poly(A)-binding protein by caspase- and viral protease-mediated cleavages." *J Biol Chem* 276(26): 23922-23928.

Cartron, P. F., T. Gallenne, et al. (2004). "The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA." *Mol Cell* 16(5): 807-818.

Castedo, M., J. L. Perfettini, et al. (2004). "Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition." *Oncogene* 23(16): 2825-2837.

Certo, M., V. Del Gaizo Moore, et al. (2006). "Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members." *Cancer Cell*. 9(5):351-65.

Chao, J. R., J. M. Wang, et al. (1998). "mcl-1 is an immediate-early gene activated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) signaling pathway and is one component of the GM-CSF viability response." *Mol Cell Biol*. 18(8):4883-98.

Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, et al. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*. 17(3):393-403.

Chen, N. and V. Karantza-Wadsworth (2009). "Role and regulation of autophagy in cancer." *Biochim Biophys Acta* 9(23): 2.

Cheng, E. H., M. C. Wei, et al. (2001) "BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis." *Mol Cell. Sep*;8(3):705-11.

Chipuk, J. E., T. Moldoveanu, et al. (2010). "The BCL-2 family reunion." *Mol Cell* 37(3): 299-310.

Chittenden, T., E. A. Harrington, et al. (1995). "Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak." *Nature*. 374(6524):733-6.

Choi, S. S., I. C. Park, et al. (1995). "A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow." *Oncogene*. 11(9):1693-8.

Chowdhury, I., B. Tharakan, et al. (2006). "Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited." *Cell Mol Biol Lett*. 11(4):506-25.

Clohessy, J. G., J. Zhuang, et al. (2004). "Characterisation of Mcl-1 cleavage during apoptosis of haematopoietic cells." *Br J Haematol*. 125(5):655-65.

Conradt, B. and H. R. Horvitz (1998) "The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9." *Cell*. 93(4):519-29.

Craig, R. W. (2002). "MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis." *Leukemia*. 16(4):444-54.

Cuconati, A., C. Mukherjee, et al. (2003). "DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells." *Genes Dev*. 17(23):2922-32.

Czabotar PE, Lee EF, Thompson GV, Wardak AZ, Fairlie WD, Colman PM. (2011). Mutation to Bax beyond the BH3 domain disrupts interactions with pro-survival proteins and promotes apoptosis. *J Biol Chem*. 286(9):7123-31.

Czabotar PE, Lee EF, van Delft MF, Day CL, Smith BJ, Huang DC, et al. (2007). Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(15):6217-22.

Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M. (2005). The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer*. 15;104(6):1129-37.

Diamantis, A., E. Magiorkinis, et al. (2008). "A brief history of apoptosis: from ancient to modern times." *Onkologie*. 31(12):702-6.

Ding Q, He X, Hsu JM, Xia W, Chen CT, Li LY, et al. (2007a). Degradation of

Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. *Mol Cell Biol*. 27(11):4006-17.

Ding Q, He X, Xia W, Hsu JM, Chen CT, Li LY, et al. (2007b). Myeloid cell leukemia-1 inversely correlates with glycogen synthase kinase-3beta activity and associates with poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Res*. 67(10):4564-71.

Domina, A. M., J. A. Vrana, et al. (2004). "MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol." *Oncogene*. 23(31):5301-15.

Domina, A. M., J. H. Smith, et al. (2000) "Myeloid cell leukemia 1 is phosphorylated through two distinct pathways, one associated with extracellular signal-regulated kinase activation and the other with G2/M accumulation or protein phosphatase 1/2A inhibition." *J Biol Chem*. 275(28):21688-94.

Duan, W. R., D. S. Garner, et al. (2003). "Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts." *J Pathol* 199(2): 221-228.

Duprez, L., E. Wirawan, et al. (2009). "Major cell death pathways at a glance." *Microbes Infect* 11(13): 1050-1062.

Earnshaw, W. C., L. M. Martins, et al.(1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." *Annu Rev Biochem* 68,83-424.

Erlacher, M., E. M. Michalak, et al. (2005). "BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo." *Blood* 106(13): 4131-4138.

Eskes, R., S. Desagher, et al. (2000). "Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane." *Mol Cell Biol* 20(3): 929-935.

Fadok, V. A., D. R. Voelker, et al. (1992). "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." *J Immunol*. 148(7):2207-16.

Farrow, S. N., J. H. White, et al. (1995). "Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K." *Nature*. 374(6524):731-3.

Festjens, N., T. Vanden Berghe, et al. (2006). "Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response." *Biochim Biophys Acta*: 8.

Flemming, W. (1885). "Über die Bildung von Richtungsfiguren in Säugethiereiern beim Untergang Graaf'scher Follikel." *Arch Anat Physiol*. 221-244.

Fraser, C. S., J. Y. Lee, et al. (2004). "The j-subunit of human translation initiation factor eIF3 is required for the stable binding of eIF3 and its subcomplexes to 40 S ribosomal subunits in vitro." *J Biol Chem* 279(10): 8946-8956.

Freeley, M., J. Park, et al. (2007). "Loss of PTEN expression does not contribute to PDK-1 activity and PKC activation-loop phosphorylation in Jurkat leukaemic T cells." *Cell Signal* 19(12): 2444-2457.

Gibson, L., S. P. Holmgreen, et al. (1996). "bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival." *Oncogene*. 13(4):665-75.

Glücksmann A. (1951). "Cell deaths in normal vertebrate ontogeny". *Biol Rev* 26, 59-81.

Gojo, I., B. Zhang, et al. (2002) "The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol induces apoptosis in multiple myeloma cells through transcriptional repression and down-regulation of Mcl-1." *Clin Cancer Res.* 8(11):3527-38.

Gomez-Bougie, P., E. Menoret, et al. (2011). "Noxa controls Mule-dependent Mcl-1 ubiquitination through the regulation of the Mcl-1/USP9X interaction." *Biochem Biophys Res Commun* 413(3): 460-464.

Graber TE, Holcik M. (2007). Cap-independent regulation of gene expression in apoptosis. *Mol Biosyst.* 3(12):825-34.

Gräper, L. (1914). "Eine neue Anschauung Ober physiologische Zellausschaltung." *Arch Zellforsch* 1914, 12:373-394

Green, D. R. and G. I. Evan (2002). "A matter of life and death." *Cancer Cell* 1(1): 19-30.

Habermehl, D., B. Kammerer, et al. (2006). "Proapoptotic activity of Ukrain is based on Chelidonium majus L. alkaloids and mediated via a mitochondrial death pathway." *BMC Cancer.* 6:14.

Han, J., L. A. Goldstein, et al. (2004.) "Degradation of Mcl-1 by granzyme B: implications for Bim-mediated mitochondrial apoptotic events." *J Biol Chem.* 279(21):22020-9.

Han, J., P. Sabbatini, et al. (1996). "Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K." *Mol Cell Biol.* 16(10):5857-64.

Harris MH, Thompson CB (2000). The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ* 7,1182-91.

Harris, T. E., A. Chi, et al. (2006). "mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin." *EMBO J.* 25(8):1659-68.

Harrison LR, Micha D, Brandenburg M, Simpson KL, Morrow CJ, Denny O, et al. (2011) Hypoxic human cancer cells are sensitized to BH-3 mimetic-induced apoptosis via downregulation of the Bcl-2 protein Mcl-1. *J Clin Invest.* 121(3):1075-87.

Hengartner, M. O., R. E. Ellis, et al. (1992). "Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death." *Nature.* 356(6369):494-9.

Henis-Korenblit, S., G. Shani, et al. (2002) "The caspase-cleaved DAP5 protein supports internal ribosome entry site-mediated translation of death proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(8):5400-5.

Henis-Korenblit, S., N. L. Strumpf, et al. (2000) "A novel form of DAP5 protein accumulates in apoptotic cells as a result of caspase cleavage and internal ribosome entry site-mediated translation." *Mol Cell Biol.* 20(2):496-506.

Herrant, M., A. Jacquet, et al. (2004) "Cleavage of Mcl-1 by caspases impaired its ability to counteract Bim-induced apoptosis." *Oncogene.* 14;23(47):7863-73.

Hidalgo, M. and E. K. Rowinsky (2000). "The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy." *Oncogene* 19(56): 6680-6686.

Horvitz HR, Ellis HM, Sternberg PW. (1982). "Programmed cell death in nematode development." *Neurosci Comment.* 1:56-65.

Hsu, S. Y., A. Kaipia, et al. (1997). "Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective

anti-apoptotic Bcl-2 family members." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(23):12401-6.

Hsu, S. Y., P. Lin, et al. (1998). "BOD (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members." *Mol Endocrinol.* 12(9):1432-40.

Huber S, Oelsner M, Decker T, zum Buschenfelde CM, Wagner M, Lutzny G, et al. (2011). Sorafenib induces cell death in chronic lymphocytic leukemia by translational downregulation of Mcl-1. *Leukemia.* 25(5):838-47.

Iglesias-Serret, D., M. Pique, et al. (2003) "Transcriptional and translational control of Mcl-1 during apoptosis." *Arch Biochem Biophys.* 15;417(2):141-52.

Inohara, N., L. Ding, et al. (1997). "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.* 16(7):1686-94.

Inohara, N., T. S. Gourley, et al. (1998). "Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death." *J Biol Chem.* 273(49):32479-86.

Inoshita S, Takeda K, Hatai T, Terada Y, Sano M, Hata J, et al. (2002). Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress. *J Biol Chem.* 277(46):43730-4.

Inuzuka, H., S. Shaik, et al. (2011). "SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction." *Nature* 471(7336): 104-109.

Jourdan M, Veyrune JL, De Vos J, Redal N, Couderc G, Klein B. (2003). A major role for Mcl-1 antiapoptotic protein in the IL-6-induced survival of human myeloma cells. *Oncogene.* 22(19):2950-9.

Kelekar, A. and C. B. Thompson (1998) "Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis." *Trends Cell Biol.* (8):324-30.

Kelly PN, Strasser A. (2011). The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ.* 18(9):1414-24.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972a). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26,239-57.

Kiefer, M. C., M. J. Brauer, et al. (1995). "Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak." *Nature.* 374(6524):736-9.

Kim, H., M. Rafiuddin-Shah, et al. (2006). "Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies." *Nat Cell Biol* 8(12), 1348-58.

Kirito K, Watanabe T, Sawada K, Endo H, Ozawa K, Komatsu N. (2002). Thrombopoietin regulates Bcl-xL gene expression through Stat5 and phosphatidylinositol 3-kinase activation pathways. *J Biol Chem.* 277(10):8329-37.

Kobayashi, S., S. H. Lee, et al. (2007) "Serine 64 phosphorylation enhances the antiapoptotic function of Mcl-1." *J Biol Chem.* 282(25):18407-17. Epub 2007 Apr 25.

Konopleva, M., R. Contractor, et al. (2006). "Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia." *Cancer Cell* 10(5): 375-388.

Kozopas, K. M., T. Yang, et al. (1993). "MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(8):3516-20

Krammer PH. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: (1999). "live and let die". *Adv Immunol*. 71:163-210.

Kroemer, G. (2003) "Mitochondrial control of apoptosis: an introduction." *Biochem Biophys Res Commun*. 304(3):433-5.

Kroemer, G. and S. J. Martin (2005). "Caspase-independent cell death." *Nat Med*. 11(7):725-30.

Kroemer, G., N. Zamzami, et al. (1997) "Mitochondrial control of apoptosis." *Immunol Today*. 18(1):44-51.

Kubota Y, Kinoshita K, Suetomi K, Fujimori A, Takahashi S. (2007). Mcl-1 depletion in apoptosis elicited by ionizing radiation in peritoneal resident macrophages of C3H mice. *J Immunol*. 178(5):2923-31.

Kumar, S. and P. A. Colussi (1999). "Prodomains--adaptors--oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis." *Trends Biochem Sci* 24(1): 1-4.

Lee EF, Czabotar PE, van Delft MF, Michalak EM, Boyle MJ, Willis SN, et al. (2008). A novel BH3 ligand that selectively targets Mcl-1 reveals that apoptosis can proceed without Mcl-1 degradation. *J Cell Biol*. 180(2):341-55.

Lee, T. and J. Pelletier (2012). "Eukaryotic initiation factor 4F: a vulnerability of tumor cells." *Future Med Chem* 4(1): 19-31.

Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2(3):183-92.

Li LY, Luo X, Wang X. (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." *Nature*. 412(6842):95-9.

Li, P., D. Nijhawan, et al. (1997) "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." *Cell*. 91(4):479-89.

Lin, E. Y., A. Orlofsky, et al. (1996). "A1, a Bcl-2 family member, prolongs cell survival and permits myeloid differentiation." *Blood*. 87(3):983-92.

Lindsten, T., A. J. Ross, et al. (2000) "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." *Mol Cell*. 6(6):1389-99.

Lockshin, R. A. and C. M. Williams (1965). "Programmed Cell Death--I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkworm." *J Insect Physiol*. 11:123-33.

Loewith, R., E. Jacinto, et al. (2002). "Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control." *Mol Cell* 10(3): 457-468.

Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N. (2006). mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene*. 16;25(48):6416-22.

Marash, L. and A. Kimchi (2005) DAP5 and IRES-mediated translation during programmed cell death. *Cell Death Differ*. 12(6):554-62.

Marash, L., N. Liberman, et al. (2008). "DAP5 promotes cap-independent translation of Bcl-2 and CDK1 to facilitate cell survival during mitosis." *Mol Cell*. 30(4):447-59.

Marcotrigiano, J., A. C. Gingras, et al. (1999). "Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G." *Mol Cell* 3(6): 707-716.

Marissen, W. E. and R. E. Lloyd (1998). "Eukaryotic translation initiation factor 4G is targeted for proteolytic cleavage by caspase 3 during inhibition of translation in apoptotic cells." *Mol Cell Biol* 18(12): 7565-7574.

Marissen, W. E., A. Gradi, et al. (2000). "Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4GII correlates with translation inhibition during apoptosis." *Cell Death Differ* 7(12):1234-43.

Maurer, U., C. Charvet, et al. (2006) "Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1." *Mol Cell* 17;21(6):749-60.

Mei Y, Du W, Yang Y, Wu M. (2005). Puma(*)Mcl-1 interaction is not sufficient to prevent rapid degradation of Mcl-1. *Oncogene*. 24(48):7224-37.

Michalak, E. M., A. Villunger, et al. (2008). "In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute." *Cell Death Differ* 15(6): 1019-1029.

Michels, J., P. W. Johnson, et al.(2005) "Mcl-1." *Int J Biochem Cell Biol*.37(2):267-71.

Mills, J. R., Y. Hippo, et al. (2008) "mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(31):10853-8.

Minn, A. J., C. S. Kettlun, et al. (1999) "Bcl-xL regulates apoptosis by heterodimerization-dependent and -independent mechanisms." *EMBO J*. 18(3):632-43.

Morin, P. J. (1999). "beta-catenin signaling and cancer." *Bioessays* 21(12): 1021-1030.

Mouchantaf R, Azakir BA, McPherson PS, Millard SM, Wood SA, Angers A. (2006). The ubiquitin ligase itch is auto-ubiquitylated in vivo and in vitro but is protected from degradation by interacting with the deubiquitylating enzyme FAM/USP9X. *J Biol Chem*. 281(50):38738-47.

Müller, A. C., R. Handrick, et al. (2008). "Importance of Bak for celecoxib-induced apoptosis." *Biochem Pharmacol*. 76(9):1082-96.

Murray, R. Z., L. A. Jolly, et al. (2004). "The FAM deubiquitylating enzyme localizes to multiple points of protein trafficking in epithelia, where it associates with E-cadherin and beta-catenin." *Mol Biol Cell* 15(4): 1591-1599.

Nakajima, W., M. A. Hicks, et al. (2014). "Noxa determines localization and stability of MCL-1 and consequently ABT-737 sensitivity in small cell lung cancer." *Cell Death Dis* 13(5): 6.

Nakano, K. and K. H. Vousden (2001) "PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53." *Mol Cell*. 7(3):683-94.

Narita, M., S. Shimizu, et al. (1998) "Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(25):14681-6.

Nevins, T. A., Z. M. Harder, et al. (2003) "Distinct regulation of internal ribosome entry site-mediated translation following cellular stress is mediated by apoptotic fragments of eIF4G translation initiation factor family members eIF4GI and p97/DAP5/NAT1." *J Biol Chem*. 278(6):3572-9.

Nicholson, D. W. and N. A. (1997). Thornberry "Caspases: killer proteases."

TrendsBiochem Sci 22,299-306.

Nicholson, K. M. and N. G. Anderson (2002). "The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy." *Cell Signal*. 14(5):381-95.

Nicoletti, I., G. Migliorati, et al. (1991) "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." *J Immunol Methods*. 3;139(2):271-9.

Nijhawan, D., M. Fang, et al. (2003). "Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation." *Genes Dev*.15;17(12):1475-86.

Nishioka, C., T. Ikezoe, et al. (2010). "Inhibition of MEK/ERK signaling induces apoptosis of acute myelogenous leukemia cells via inhibition of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 and down-regulation of Mcl-1." *Apoptosis*. 15(7):795-804.

Nix P, Cawkwell L, Patmore H, Greenman J, Stafford N. (2005). Bcl-2 expression predicts radiotherapy failure in laryngeal cancer. *Br J Cancer*. 92(12):2185-9.

Oakes SR, Vaillant F, Lim E, Lee L, Breslin K, Feleppa F, et al. (2011). Sensitization of BCL-2-expressing breast tumors to chemotherapy by the BH3 mimetic ABT-737. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

O'Connor, L., A. Strasser, et al. (1998). "Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis." *EMBO J*. 17(2):384-95.

Oda, E., R. Ohki, et al. (2000) "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." *Science*. 288(5468):1053-8.

Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, et al. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*. 435(7042):677-81.

Oltvai, Z. N., C. L. Milliman, et al. (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." *Cell*. 74(4):609-19.

Opferman J. T, Green DR. (2010) DUB-le Trouble for Cell Survival. *Cancer Cell*.17;17(2):117-9.

Opferman, J. T., A. Letai, et al. (2003) "Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1." *Nature*. 11;426(6967):671-6.

Pattingre, S., A. Tassa, et al. (2005). "Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy." *Cell* 122(6): 927-939.

Powley, I. R., A. Kondrashov, et al. (2009). "Translational reprogramming following UVB irradiation is mediated by DNA-PKcs and allows selective recruitment to the polysomes of mRNAs encoding DNA repair enzymes." *Genes Dev* 23(10): 1207-1220.

Riedl SJ, Fuentes-Prior P, Renatus M, Kairies N, Krapp S, Huber R, et al.(2001). Structural basis for the activation of human procaspase-7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 18;98(26):14790-5.

Rinkenberger, J. L., S. Horning, et al. (2000) "Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality." *Genes Dev*. 14(1):23-7.

Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012. *Krebs in Deutschland 2007/2008*. 8. Ausgabe.

Rogers, S., R. Wells, et al. (1986). "Amino acid sequences common to rapidly

degraded proteins: the PEST hypothesis." *Science*. 17;234(4774):364-8.

Rudner J, Elsaesser SJ, Jendrossek V, Huber SM. (2011). Anti-apoptotic Bcl-2 fails to form efficient complexes with pro-apoptotic Bak to protect from Celecoxib-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 81(1):32-42.

Rudner J, Jendrossek V, Belka C. (2002) New insights in the role of Bcl-2 and the endoplasmic reticulum. *Apoptosis*.7(5):441-7.

Rudner, J., C. E. Ruiner, et al. (2010a). "The Akt-inhibitor Erufosine induces apoptotic cell death in prostate cancer cells and increases the short term effects of ionizing radiation." *Radiat Oncol* 5: 108.

Rudner, J., S. J. Elsaesser, et al. (2010b). "Differential effects of anti-apoptotic Bcl-2 family members Mcl-1, Bcl-2, and Bcl-xL on celecoxib-induced apoptosis." *Biochem Pharmacol*. 79(1):10-20.

Saraste, A. and K. Pulkki (2000). "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis." *Cardiovasc Res* 45,528-37.

Sarbasov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 307(5712):1098-101.

Sattler, M., H. Liang, et al. (1997) "Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis." *Science*. 275(5302):983-6.

Schmitt, C. A., C. T. Rosenthal, et al. (2000) "Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas." *Nat Med*. 6(9):1029-35.

Schubert KM, Duronio V. (2001). Distinct roles for extracellular-signal-regulated protein kinase (ERK) mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of Mcl-1 synthesis. *Biochem J* 356, 473-80.

Schultz DR, Harrington WJ, Jr (2003). Apoptosis: programmed cell death at a Molecular level. *Semin Arthritis Rheum* 32,345-69.

Schwickart M, Huang X, Lill JR, Liu J, Ferrando R, French DM, et al. (2010) Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature*. 7;463(7277):103-7.

Seglen, P. O. and P. Bohley (1992). "Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms." *Experientia* 48(2): 158-172.

Seglen, P. O., P. B. Gordon, et al. (1990). "Non-selective autophagy." *Semin Cell Biol* 1(6): 441-448.

Sentman, C. L., J. R. Shutter, et al. (1991) "bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes." *Cell*. 29;67(5):879-88.

She QB, Halilovic E, Ye Q, Zhen W, Shirasawa S, Sasazuki T, et al. (2010) 4E-BP1 is a key effector of the oncogenic activation of the AKT and ERK signaling pathways that integrates their function in tumors. *Cancer Cell*.13;18(1):39-51.

Shi, Y. "Caspase activation: revisiting the induced proximity model." (2004) *Cell*. 117(7):855-8.

Shimizu, S., A. Konishi, et al. (2000a). "BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A*. (7):3100-5.

Shimizu, S., T. Ide, et al. (2000b). "Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c." *J Biol Chem*. 275(16):12321-5.

Sieghart W, Losert D, Strommer S, Cejka D, Schmid K, Rasoul-Rockenschaub S, et al. (2006). Mcl-1 overexpression in hepatocellular carcinoma: a potential

target for antisense therapy. *J Hepatol.* 44(1):151-7.

Skalka M, Matyasova J, Cejkova M. (1976). "DNA in chromatin of irradiated lymphoid tissues degrades in vivo into regular fragments." *FEBS Lett.* 72(2):271-4.

Skvara H, Thallinger C, Wacheck V, Monia BP, Pehamberger H, Jansen B, et al. (2005). Mcl-1 blocks radiation-induced apoptosis and inhibits clonogenic cell death. *Anticancer Res.* 25(4):2697-703.

Slee, E. A., C. Adrain, et al. (1999). "Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis." *Cell Death Differ* 6(11): 1067-1074.

Snowden, R. T., X. M. Sun, et al. (2003). "Bisindolylmaleimide IX is a potent inducer of apoptosis in chronic lymphocytic leukaemic cells and activates cleavage of Mcl-1." *Leukemia* 17(10): 1981-1989.

Song L, Coppola D, Livingston S, Cress D, Haura EB. (2005a). Mcl-1 regulates survival and sensitivity to diverse apoptotic stimuli in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 4(3):267-76.

Song, G., G. Ouyang, et al. (2005b). "The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival." *J Cell Mol Med.* 9(1):59-71.

Song, Q., Y. Kuang, et al. (1999). "Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1." *EMBO J.* 18(1):167-78.

Spriggs, K. A., M. Bushell, et al. (2010). "Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress." *Mol Cell* 40(2): 228-237.

Stahl, M., P. F. Dijkers, et al. (2002) "The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2." *J Immunol.* 168(10):5024-31.

Steelman, L. S., W. H. Chappell, et al. (2011) "Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging." *Aging (Albany NY).* 3(3):192-222.

Stewart, D. P., B. Koss, et al. (2010). "Ubiquitin-independent degradation of antiapoptotic MCL-1." *Mol Cell Biol.* 30(12):3099-110. Epub 2010 Apr 12.

Stoneley, M. and A. E. Willis (2004). "Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression." *Oncogene* 23(18): 3200-3207.

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69,217-45

Strasser, A., A. W. Harris, et al. (1991) "bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship." *Cell.* 29;67(5):889-99.

Streffer JR, Rimner A, Rieger J, Naumann U, Rodemann HP, Weller M. (2002). BCL-2 family proteins modulate radiosensitivity in human malignant glioma cells. *J Neurooncol.* 56(1):43-9.

Sulston, J. E. and H. R. Horvitz (1977). "Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*." *Dev Biol.* 56(1):110-56.

Taya S, Yamamoto T, Kanai-Azuma M, Wood SA, Kaibuchi K. (1999). The deubiquitinating enzyme Fam interacts with and stabilizes beta-catenin. *Genes Cells.* 4(12):757-67.

Tewari, M., L. T. Quan, et al. (1995). "Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase." *Cell.* 81(5):801-9.

Thornberry, N. A. (1998). "Caspases: key mediators of apoptosis." *Chem Biol.*

5, R97-103.

Tian, S., J. Lin, et al. (2010). "Beclin 1-independent autophagy induced by a Bcl-XL/Bcl-2 targeting compound, Z18." *Autophagy* 6(8): 1032-1041.

Trivigno, D., F. Essmann, et al. (2012). "Deubiquitinase USP9x confers radioresistance through stabilization of Mcl-1." *Neoplasia* 14(10): 893-904.

Trivigno, D., L. Bornes, et al. (2013). "Regulation of protein translation initiation in response to ionizing radiation." *Radiat Oncol* 8(35): 8-35.

Trump, B. F., P. J. Goldblatt, et al. (1965). "Studies of necrosis in vitro of mouse hepatic parenchymal cells. Ultrastructural and cytochemical alterations of cytosomes, cytosomes, multivesicular bodies, and microbodies and their relation to the lysosome concept." *Lab Invest* 14(11): 1946-1968.

Tsujiimoto, Y., J. Cossman, et al. (1985) "Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma." *Science*. 21;228(4706):1440-3.

Untch, M. and G. von Minckwitz (2011). "Neoadjuvant chemotherapy: early response as a guide for further treatment: clinical, radiological, and biological." *J Natl Cancer Inst Monogr* 43: 138-141.

Vakifahmetoglu, H., M. Olsson, et al. (2008). "Death through a tragedy: mitotic catastrophe." *Cell Death Differ* 15(7): 1153-1162.

van Delft, M. F. and D. C. Huang. (2006a). "How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis." *Cell Res*. 2006 Feb;16(2):203-13.

van Delft, M. F., A. H. Wei, et al. (2006b). "The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized." *Cancer Cell*.10(5):389-99.

Vaux, D. L., S. Cory, et al. (1988). "Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells." *Nature*. 29;335(6189):440-2.

Verhagen AM, Vaux DL. (2002). Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis*. 7(2):163-6.

Verhagen, A. M., J. Silke, et al. (2002). "HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins." *J Biol Chem*. 277(1):445-54.

Vigorito, E., S. Plaza, et al. (1999). "Contributions of p53 and PMA to gamma-irradiation induced apoptosis in Jurkat cells." *Hematol Cell Ther* 41(4): 153-161.

Vikstrom, I., S. Carotta, et al. (2010) "Mcl-1 is essential for germinal center formation and B cell memory." *Science*. 19;330(6007):1095-9.

Virchow R., (1860). "Lecture XV. Passive processes, fatty degeneration; in Virchow R (ed): *Cellular Pathology as Based upon Physiological and Pathological Histology* (translated in English by Chance F and Cantab MB). London, John Churchill, p. 318.

Vlahos, C. J., W. F. Matter, et al. (1994). "A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)." *J Biol Chem* 269(7): 5241-5248.

Vogler M, Weber K, Dinsdale D, Schmitz I, Schulze-Osthoff K, Dyer MJ, et al. (2009). Different forms of cell death induced by putative BCL2 inhibitors. *Cell Death Differ* 16,1030-9.

Vogt, K. (1842). "Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelerkröte (*Alytes obstetricians*) ". Solothurn, Jent und Gassmann, p. 105.

Wang, K., X. M. Yin, et al. (1996). "BID: a novel BH3 domain-only death agonist." *Genes Dev.* 10(22):2859-69.

Wang, R., L. Xia, et al. (2012). "Downregulation of Mcl-1 through GSK-3beta activation contributes to arsenic trioxide-induced apoptosis in acute myeloid leukemia cells." *Leukemia* 3(10): 180.

Warr MR, Acoca S, Liu Z, Germain M, Watson M, Blanchette M, et al. (2005). BH3 ligand regulates access of MCL-1 to its E3 ligase. *FEBS Lett.* 24;579(25):5603-8.

Watson RL, Spalding AC, Zielske SP, Morgan M, Kim AC, Bommer GT, et al. (2010). GSK3beta and beta-catenin modulate radiation cytotoxicity in pancreatic cancer. *Neoplasia.* 12(5):357-65.

Wei, M. C., W. X. Zong, et al. (2001) "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." *Science.* 27;292(5517):727-30

Weinmann, M., V. Jendrossek, et al. (2004). "Molecular ordering of hypoxia-induced apoptosis: critical involvement of the mitochondrial death pathway in a FADD/caspase-8 independent manner." *Oncogene.* 23(21):3757-69.

Weng, C., Y. Li, et al. (2005). "Specific cleavage of Mcl-1 by caspase-3 in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in Jurkat leukemia T cells." *J Biol Chem* 280(11): 10491-10500.

Wertz, I. E., S. Kusam, et al. (2011). "Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7." *Nature* 471(7336): 110-114.

Wiezorek, J., P. Holland, et al. (2010). "Death receptor agonists as a targeted therapy for cancer." *Clin Cancer Res.* 16(6):1701-8.

Williams, J. R., J. B. Little, et al. (1974) "Association of mammalian cell death with a specific endonucleolytic degradation of DNA." *Nature.* 252(5485):754-5.

Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, et al. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 19(11):1294-305.

Wirth T, Kuhnel F, Fleischmann-Mundt B, Woller N, Djojotubroto M, Rudolph KL, et al. (2005). Telomerase-dependent virotherapy overcomes resistance of hepatocellular carcinomas against chemotherapy and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand by elimination of Mcl-1. *Cancer Res.* 65(16):7393-402.

Wolter, K. G., Y. T. Hsu, et al. (1997). "Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis." *J Cell Biol* 139(5): 1281-1292.

Wyllie, A. H. (1980). "Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation." *Nature.* 284(5756):555-6.

Wyllie, A. H. (2010). ""Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology." *Mol Neurobiol.* 42(1):4-9. Epub 2010 Jun 16.

Xie, S., M. Chen, et al. (2014). "Identification of a role for the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in innate immune cells." *PLoS One* 9(4).

Yamada T, Ohyama H, Kinjo Y, Watanabe M. (1981). "Evidence for the internucleosomal breakage of chromatin in rat thymocytes irradiated in vitro." *Radiat Res.* 85(3):544-53.

Yang, E., J. Zha, et al. (1995). "Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death." *Cell.* 80(2):285-91.

Yang, J., X. Liu, et al. (1997). "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked." *Science*. 275(5303):1129-32.

Yang, T., K. M. Kozopas, et al. (1995). "The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2." *J Cell Biol*.128(6):1173-84.

Yang-Yen, H. F. (2006) "Mcl-1: a highly regulated cell death and survival controller." *J Biomed Sci*. 13(2):201-4.

You, H., M. Pellegrini, et al. (2006). "FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal." *J Exp Med*. 203(7):1657-63.

Youle, R. J. and A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9(1):47-59.

Yu, J., L. Zhang, et al. (2001). "PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells." *Mol Cell*. 7(3):673-82.

Zhao, Y., B. J. Altman, et al. (2007) "Glycogen synthase kinase 3alpha and 3beta mediate a glucose-sensitive antiapoptotic signaling pathway to stabilize Mcl-1." *Mol Cell Biol*. 27(12):4328-39. Epub 2007 Mar 19.

Zhivotovsky BD, Zvonareva NB, Hanson KP. (1981). "Characteristics of rat thymus chromatin degradation products after whole-body x-irradiation". *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 39(4):437-40.

Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X. (2005). Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell*. 121(7):1085-95.

Zhou, P., L. Qian, et al. (1997). "Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions." *Blood*. 89(2):630-43.

Zhou, P., N. B. Levy, et al. (2001). "MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes." *Blood*. 97(12):3902-9.

Zong, W. X., T. Lindsten, et al. (2001). "BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak." *Genes Dev*. (12):1481-6.

Zou, H., W. J. Henzel, et al. (1997) "Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3." *Cell*. 90(3):405-13.

10. Erklärungen zum Eigenanteil

Ich habe mich um die Zellkulturen gekümmert. Außerdem habe ich die Transfektionen durchgeführt und die Versuche angesetzt und durchgeführt, die in den Abbildungen 7,8,9,10,12,13,14,16,17,19,20,21,22,23,24 und 25 dargestellt sind. Methodisch handelte es sich hier zum Nachweis der Ergebnisse um Western-Blots und FACS-Messungen. Ich habe nach der Durchführung der Western-Blots, die auf den Fotofilmen abgebildeten Ergebnisse digitalisiert und bearbeitet. Die Proben für die FACS-Messungen wurden von mir vorbereitet, die FACS-Messungen von mir gemessen und ausgewertet. Die Ergebnisse wurden von Fr. Dr.rer.nat. Rudner überprüft und mit ihr besprochen.

Die Versuche, die in Abbildung 11 dargestellt sind, wurden von Fr. Dr. rer.nat. Rudner durchgeführt.

Die Versuche, die in den Abbildungen 15 und 18 dargestellt sind, wurden von mir und Fr. Dr.rer.nat. Rudner gemeinsam durchgeführt.

Fr. Dr.rer.nat. Rudner hat die Studie konzipiert, hat die Arbeit betreut und die Dissertation korrigiert. Herr Prof. Huber war an der Konzeption der Studie beteiligt.

11. Kongressbeiträge und publizierte Abstracts

D. Trivigno, S.M. Huber, J. Rudner. (2010) Ionisierende Strahlung reguliert die Translation des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1. Strahlenther Onkol 186 (Supplement 1):74. (DEGRO 2010)

J. Rudner, D. Trivigno, S.M. Huber. (2010) Ionizing radiation inhibits protein translation by bypassing the protein kinase B/Akt. Eur J Cancer Supplements 8(5):213 (EACR 2010)

D. Trivigno, F. Essmann, V. Jendrossek, S.M. Huber, J. Rudner. (2013) The deubiquitinase USP9x confers resistance to apoptosis induced by ionizing radiation through stabilizing anti-apoptotic Mcl-1. Proc. of the 13th Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology & Oncology 10:23

D. Trivigno, F. Essmann, S.M. Huber, V. Jendrossek, J. Rudner. (2013) The deubiquitinase USP9x modulates sensitivity to radiation-induced apoptosis by stabilizing Mcl-1 levels. *Strahlenther Onkol* 189 (Supplement 1):126

12. Veröffentlichungen

Teile der Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Trivigno, D., F. Essmann, S.M. Huber und J. Rudner (2012). "Deubiquitinase USP9x confers radioresistance through stabilization of Mcl-1." *Neoplasia* 14(10): 893-904.

Trivigno, D., L. Bornes, S.M. Huber und J. Rudner (2013). "Regulation of protein translation initiation in response to ionizing radiation." *Radiat Oncol* 8(35): 8-35.

13. Danksagung

Prof. Dr. Michael Bamberg danke ich für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten in seiner Abteilung und dafür, mir ermöglicht zu haben, den 16. Jahreskongress der deutschen Gesellschaft für Radioonkologie in Magdeburg zu besuchen. Prof. Stephan Huber danke ich herzlich für die freundliche Unterstützung.

Mein größter Dank gilt Dr. Justine Rudner für die Überlassung des interessanten Themas, für die Bereitstellung des größten Teils der Materialien und Verbrauchsmittel, welche von ihr eingeworben und organisiert wurden und für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung bei der Durchführung und Fertigstellung der Arbeit.

Allen Mitarbeitern danke ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft. Ein besonderes Dankeschön geht an Heidi Faltin für die hervorragende technische Unterstützung und Daniela Palme dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für ihre Erziehung sowohl zur Selbständigkeit als auch zur Zielstrebigkeit und für ihre moralische Unterstützung auf meinem gesamten bisherigen Lebensweg. Ein großes Dankeschön geht an meinen Ehemann für seine unendliche Geduld und Motivierung zur Vollendung dieser Arbeit.