

USP9x-vermittelte Strahlenresistenz in Glioblastomen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Wolfsperger Frederik Carlos

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Huber
2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Naumann

für Martin

*"Und wenn ich wüsste, dass morgen die Welt untergeht, würde
ich heute noch ein Apfelbäumchen pflanzen."*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Neoplasie	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Tumorgenese	1
1.1.3	Genetik und das Mehrstufenmodel.....	2
1.1.4	Äthiologie	2
1.1.5	Einteilung und Behandlung von Tumoren	2
1.2	Glioblastoma multiforme.....	3
1.2.1	Epidemiologie und Ätiologie	3
1.2.2	Klinik.....	5
1.2.3	Diagnostik	5
1.2.4	Therapie	6
1.2.5	Prognose.....	7
1.3	Eine Einführung in die Strahlentherapie	7
1.3.1	Überblick	7
1.3.2	Wirkung ionisierender Strahlung auf Zellen.....	9
1.3.3	Verschiedene Arten des Zelltods verursacht durch ionisierende Strahlung.....	9
1.4	Apoptose	12
1.4.1	Einführung in die Apoptose	12
1.4.2	Ablauf der Apoptose.....	13
1.4.3	Die Rolle der Caspasen bei der Apoptose	14
1.4.4	Zwei Signalwege, die zu Apoptose führen	15
1.5	Die Familie der Bcl-2-Proteine.....	17
1.5.1	Entdeckung des ersten zelltodinhibierenden Onkogens.....	17
1.5.2	Aufbau, molekulare Eigenschaften und Klassifizierung verschiedener Bcl-2-Proteine	18
1.5.3	Die Rolle der Bcl-2-Proteinfamilie für die intrinsische Apoptose.....	19
1.6	Kenntnisstand zu Mcl-1	20
1.6.1	Funktionen von Mcl-1	20
1.6.2	Regulierung von Mcl-1	20
1.6.3	Mcl-1 ist in vielen Tumorentitäten überexprimiert.....	22
1.7	Zielsetzung der Arbeit	23
2	Material und Methoden	24

2.1	Material	24
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	24
2.1.2	Geräte	25
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	27
2.1.4	Puffer und Lösungen	28
2.1.5	Kultur-Medien	29
2.1.6	Erst-Antikörper	30
2.1.7	Zweit-Antikörper	30
2.1.8	Zelllinien	31
2.2	Methoden	31
2.2.1	Zellkultur	31
2.2.2	siRNA-Transfektion mit Transfektionsreagenz SiQuest®	32
2.2.3	Bestrahlung der Zellen	33
2.2.4	Quantifizierung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie/ FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)	33
2.2.5	Nachweis der Proteinlevel mittels Westernblot	36
2.2.6	Untersuchung der Radiosensibilität mittels Koloniebildungstest	39
2.2.7	Mcl-1 Halbwertszeitmessung	40
3	Ergebnisse	42
3.1	Proteinlevel verschiedener Mitglieder der Bcl-2-Familie in Glioblastomzelllinien	42
3.2	Wirkung ionisierender Strahlung auf die Zelllinien A172 und U373	44
3.2.1	Ionisierende Strahlung induziert Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials in A172- und U373-Zellen	44
3.2.2	Ionisierende Strahlung induziert DNA-Fragmentierung in A172- und U373-Zellen	47
3.2.3	Ionisierende Strahlung aktiviert die Caspasenkaskade in U373- Zellen	49
3.3	Proteinlevel von Mitgliedern der Bcl-2-Familie in A172- und U373- Zellen nach Bestrahlung	50
3.4	Analyse der Halbwertszeit von Mcl-1 in A172- und U373-Zellen	51
3.5	Konzentration von Mcl-1 korreliert mit der Konzentration von USP9x in A172- und U373-Zellen	53
3.6	Die Bedeutung von Mcl-1 für das Überleben von A172- und U373- Zellen	55
3.6.1	Herunterregulierung von Mcl-1 führt zu Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ in A172- und U373-Zellen	55

3.6.2	Herunterregulierung von Mcl-1 führt zu DNA-Fragmentierung in A172- und U373-Zellen	56
3.7	Die Bedeutung von USP9x für das Überleben von A172- und U373-Zellen	58
3.7.1	Herunterregulierung von USP9x führt zu Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ in A172- und U373-Zellen	58
3.7.2	Herunterregulierung von USP9x führt zu DNA-Fragmentierung in A172- und U373-Zellen	59
3.7.3	Wachstumsverhalten von A172- und U373-Zellen nach Herunterregulierung von Mcl-1 und USP9x	60
3.8	Auswirkung ionisierender Strahlung auf A172- und U373-Zellen nach Herunterregulierung von USP9x	62
3.8.1	Herunterregulierung von USP9x mit anschließender Bestrahlung induziert Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ in A172- und U373-Zellen	63
3.8.2	Herunterregulierung von USP9x mit anschließender Bestrahlung induziert DNA-Fragmentierung in A172- und U373-Zellen	65
3.9	Klonogenes Überleben von A172- und U373-Zellen nach Herunterregulierung von USP9x	66
4	Diskussion	69
4.1	Glioblastomzelllinien A172 und U373 exprimieren viel Mcl-1 und USP9x	69
4.2	Apoptoseinduktion in Glioblastomzelllinien A172 und U373 nach Bestrahlung	69
4.3	Bestrahlung führt zu einer Abnahme der Mcl-1-Menge in U373-Zellen	70
4.4	USP9x-Menge korreliert mit Mcl-1-Level in A172-Zellen	71
4.5	Zytoprotektive Funktion von Mcl-1 und USP9x in A172- und U373-Zellen	72
4.6	Effekt von Bestrahlung nach Herunterregulierung von USP9x auf A172- und U373-Zellen	73
4.7	Erhöhung der Radiosensibilität von A172-Zellen nach Herunterregulierung von USP9x unabhängig von Mcl-1	73
5	Zusammenfassung	75
6	Abkürzungs-, Abbildungs-, Tabellenverzeichnis	77
6.1	Abkürzungsverzeichnis	77
6.2	Abbildungsverzeichnis	80
6.3	Tabellenverzeichnis	82
7	Literaturverzeichnis	83
8	Anhang	96

8.1	Danksagung	96
8.2	Curriculum vitae	97
8.3	Veröffentlichungen	97
8.4	Authentizitätserklärung	97
8.5	Erklärung zum Eigenanteil	98

1 Einleitung

1.1 Neoplasie

1.1.1 Epidemiologie

Krebs ist in der westlichen Welt nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Laut statistischem Bundesamt erlagen 2011 rund 26% aller in Deutschland verstorbenen Personen einem Krebsleiden (<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Aktuell.html>). Etwa jeder dritte Europäer erkrankt im Laufe seines Lebens an Krebs. Jedes Jahr sind knapp 400.000 Neuerkrankungen in Deutschland zu verzeichnen.

1.1.2 Tumorgenese

Charakteristisch für Krebs ist eine nicht physiologische Zellvermehrung. In gesundem Gewebe befinden sich die verschiedenen Zelltypen in einem Gleichgewicht aus Zellvermehrung und Zelltod. Dieses Gleichgewicht ist bei Krebserkrankungen zugunsten der Zellvermehrung gestört und führt zu einem ungehemmten Wachstum.

Obwohl Tumore sehr heterogen sind, lassen sich einige grundlegende Veränderungen in der Tumorzellphysiologie zusammenfassen. Douglas Hanahan und Robert A. Weinberg beschreiben sechs Veränderungen der Zellphysiologie, welche einzeln oder in Kombination Grundlagen maligner Entartung sind (Hanahan & Weinberg, 2011)

1. Unabhängigkeit von Wachstumssignalen,
2. Nicht-Ansprechen auf wachstumshemmende Signale,
3. Enthemmtes replikatives Potential,
4. Ausdauernde Angiogenese,
5. Gewebsinvasion und Metastasenbildung,
6. Unterdrückung der Apoptose.

Darüber hinaus gibt es verschiedene Mechanismen zur lokalen Unterdrückung der Immunantwort.

Genomische Instabilität bildet die Grundlage für diese tumorspezifischen Veränderungen der Zellphysiologie (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.1.3 Genetik und das Mehrstufenmodell

Gesunde Zellen erlangen durch genetische Mutationen Stück für Stück verschiedene der oben genannten Eigenschaften. Dabei erreichen sie mit jeder weiteren Mutation eine höhere Malignität. Man spricht von einem Mehrstufen-Modell und geht davon aus, dass in jeder Tumorentität eine oder mehrere der in 1.1.2 genannten Veränderungen der Zellphysiologie eine Rolle spielen.

1.1.4 Ätiologie

Für die Krebsentstehung sind unterschiedliche Auslöser bekannt. So können z.B. angeborene genetische Defekte zur Krebsentstehung führen. Des Weiteren gibt es eine Vielzahl von exogenen Noxen, deren Exposition unter anderem von der Lebensweise der Menschen abhängt, wie z.B. Rauchgewohnheiten, Ernährung, Alkoholkonsum und Sonnenexposition. Kanzerogene Stoffe können auch mit dem Arbeitsplatz assoziiert sein, wie z.B. Asbest, Acrylamid und Benzol. Allen Noxen gemeinsam ist die genotoxische Wirkung. Ein wichtiger Risikofaktor für Krebs ist außerdem das Alter. Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko an Krebs zu erkranken.

1.1.5 Einteilung und Behandlung von Tumoren

Tumore lassen sich zunächst in gutartige (benigne) und bösartige (maligne) Tumore unterteilen. Die Malignome werden weiterhin nach histologischen und morphologischen Eigenschaften, sowie nach Lokalisation und Grad der Metastasierung unterteilt. Damit können Tumore des gleichen Gewebetyps in unterschiedliche Stadien eingeteilt werden („staging“).

Die Therapie richtet sich nach Tumorentität und Ausbreitungsgrad, also nach der Stadieneinteilung. Die Fülle an Therapieverfahren kann man grob in drei große Bereiche unterteilen: Chirurgische Resektion, medikamentöse Therapie und Strahlentherapie. Häufig verwendet man eine Kombination aus allen dreien.

Man unterscheidet kurative Therapieansätze, mit dem primären Ziel der Heilung, und palliative Therapieansätze, wobei nicht nur die Überlebensdauer im Mittelpunkt steht, sondern insbesondere auch die Lebensqualität des Patienten, die durch die Therapie verbessert werden soll.

1.2 Glioblastoma multiforme

1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie

Gliome sind nach den Meningeomen die zweithäufigsten Hirntumore beim Menschen (Abb.1) [Dolecek T A et al. Neuro Oncol 2012;14:v1-v49]. Das Glioblastom multiforme (GBM) ist der bösartigste und gleichzeitig der häufigste gliale (WHO Grad IV) Hirntumor beim Erwachsenen. Er macht 54% aller primären glialen Hirntumore beim Menschen aus (Abb.2) [Dolecek T A et al. Neuro Oncol 2012;14:v1-v49].

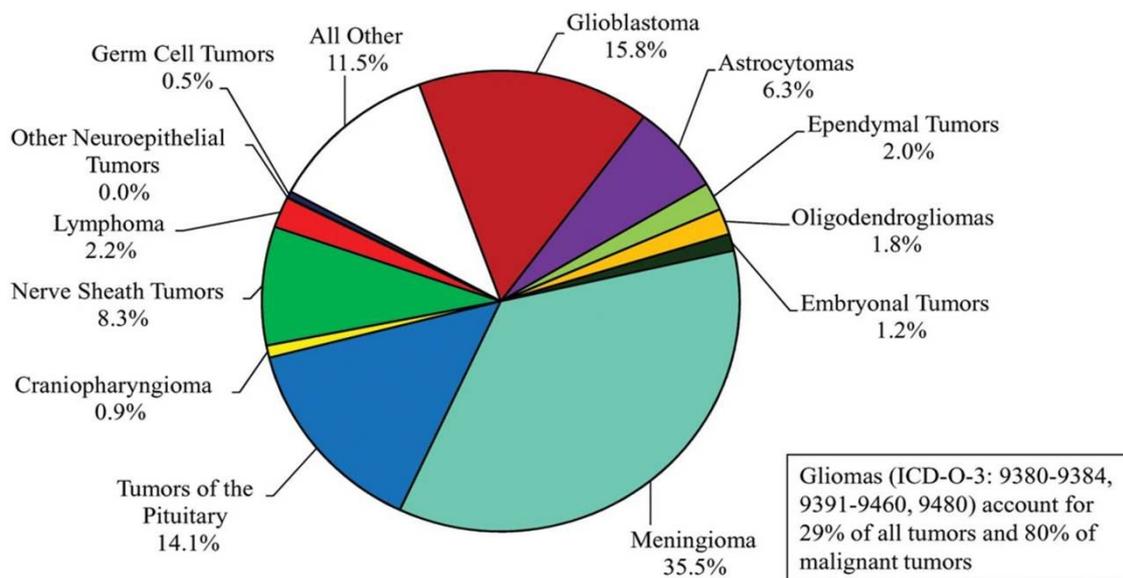


Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung primärer Hirntumore nach ihrer Histologie in den USA für das Jahr 2012 (Dolecek T A et al. Neuro Oncol 2012;14:v1-v49).

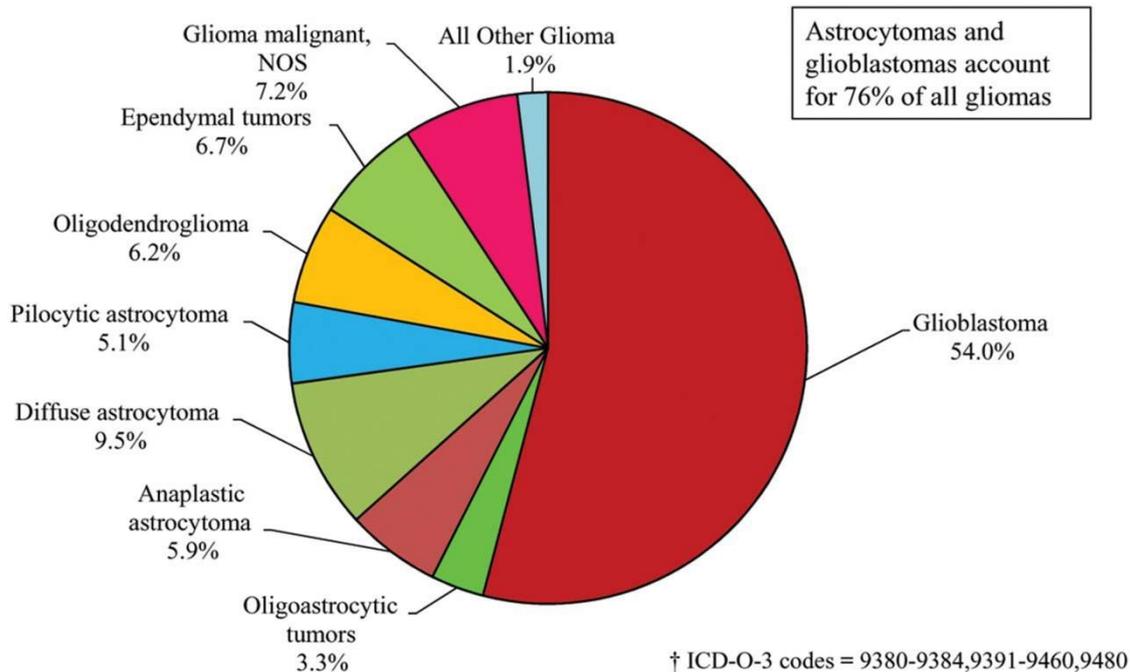


Abbildung 2: Häufigkeitsverteilung glialer Tumore des Gehirns und des zentralen Nervensystems in den USA für das Jahr 2012 (Dolecek T A et al. Neuro Oncol 2012;14:v1-v49)

Zwischen den Jahren 2005 und 2009 lag die Zahl der Neuerkrankungen in den USA bei 3,19 pro 100.000 Einwohner pro Jahr [Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS); http://neuro-oncology.oxfordjournals.org/content/14/suppl_5/v1.full]. In Deutschland sind es rund 3.000 Neuerkrankungen pro Jahr [Weller M., im Auftrag der Deutschen Krebsgesellschaft e.V.: Interdisziplinäre S 2 – Leitlinie für die Diagnostik und Therapie der Gliome des Erwachsenenalters Universität Tübingen 2004].

Das GBM ist ein astrozytärer Tumor. Diese werden klinisch eingeteilt in niedrigmaligne Astrozytome (WHO-Grad I-II), hochmaligne anaplastische Astrozytome (WHO-Grad III) und Glioblastome (WHO-Grad IV) (Kleihues et al., 1993).

Weiter kann man die GBMs in primäre und sekundäre GBMs unterteilen. Die primären und sekundären GBMs unterscheiden sich in ihrer Genetik (Ohgaki & Kleihues, 2007). Die primären machen über 90% der GBMs aus und entstehen de novo. Das Durchschnittsalter der Patienten liegt bei 65 Jahren (Ohgaki et al., 2004; Kleihues et al., 1993). Die sekundären GBMs differenzieren sich aus

niedrigmalignen Gliomen (WHO Grad I-II). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt mit 45 Jahren deutlich unter dem der primären GBMs. Der einzige Risikofaktor der mit dem GBM beim Menschen assoziiert ist, ist die vorangegangene therapeutische Bestrahlung (englisch: radiation, RT). Insbesondere Kinder mit Leukämie, die mit ionisierender Strahlung therapiert wurden, haben ein erhöhtes Risiko an einem Glioblastom zu erkranken (Ohgaki & Kleihues, 2005). Darüber hinaus wurden verschiedene äußere Einflüsse wie Schädel-Hirn-Traumata, Infektionskrankheiten, die Benutzung von mobilen Telefonen oder die Exposition mit biologischen oder chemischen Noxen mit der Entstehung von GBMs in Zusammenhang gebracht. Keiner von diesen genannten Faktoren konnte jedoch als Risikofaktor für die Entstehung eines GBMs wissenschaftlich belegt werden (DeAngelis, 2001).

1.2.2 Klinik

Die klinischen Symptome des GBMs sind durch das rasche, verdrängende Wachstum in der räumlich sehr begrenzten Schädelhöhle charakterisiert. Diese können sich als anhaltende und ungewohnte Kopfschmerzen oder neu aufgetretene epileptische Anfälle manifestieren. Auch können Lähmungen, Aphasien, Sehstörungen und andere fokale neurologische Ausfälle auftreten. Uncharakteristische Symptome wie vermehrte Reizbarkeit, erhöhte Erschöpfbarkeit, vermehrtes Schlafbedürfnis und Persönlichkeitsveränderungen können auch ohne Nachweis oben genannter fokaler neurologischer Symptome auf einen Gehirntumor hindeuten [Uwe Schlegel, Neuroonkologische Therapie, Klinische Neurologie, Hrsg. Th. Brandt, Kohlhammer GmbH, 1. Auflage 2009]. Hirndruckzeichen wie Erbrechen, Stauungspapille, Somnolenz und Koma sind Spätmanifestationen.

1.2.3 Diagnostik

Bei oben genannter neurologischer Symptomatik kommen zunächst viele Differentialdiagnosen in Betracht. Die wichtigsten von ihnen sind raumfordernde Prozesse wie z.B. Hirnblutungen, Apoplex, Hirnödem, degenerative neurologische Erkrankungen und autoimmunologische Prozesse wie z.B. die Multiple Sklerose. Aus diesem Grund sind bei neu aufgetretener Symptomatik

zunächst bildgebende Verfahren indiziert, insbesondere die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT). Bei einem auf GBM hinweisenden Befund sollten zusätzlich kontrastmittelunterstützte Aufnahmen durchgeführt werden. Das GBM ist häufig durch eine randständige Kontrastmittelaufnahme charakterisiert. In der Umgebung des Tumors bildet sich typischer Weise ein Randödem aus. Früherkennungsmarker im Blut stehen bisher nicht zur Verfügung.

Die Früherkennung spielt wegen des schnellen Wachstums der Gliome eine untergeordnete Rolle. Lediglich bei seltenen hereditären Syndromen mit Neigung zur Bildung eines GBM (Neurofibromatose I/II, Li-Fraumeni-Syndrom, Turcot-Syndrom) werden bildgebende Verfahren als Screening-Methode eingesetzt.

Die endgültige Diagnose wird anhand der Gewebsbiopsie gestellt. Stereotaktische Biopsien führen bei über 90% der Patienten zu einer sicheren Diagnose. (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, <http://www.awmf.org>)

1.2.4 Therapie

Die Behandlung des GBM gehört seit Jahrzehnten zu einer der großen Herausforderungen der Onkologie. Das infiltrierende Wachstum, die genetische Vielfalt, die geringe Regenerationsfähigkeit des umgebenden Hirngewebes sowie die selektive Permeabilität der Bluthirnschranke setzen den Therapiemöglichkeiten Grenzen.

Die Therapie besteht zum einen aus einer zytoreduktiven chirurgischen Resektion des Tumors unter Berücksichtigung des Allgemeinzustandes des Patienten mit anschließender Bestrahlung und Chemotherapie. Die Operation verfolgt drei Ziele: Die Entfernung bzw. Verringerung der Tumormasse, die Entlastung des Hirndrucks und die Wiederherstellung neurologischer Funktionen (Brandsma et al., 2008). Dabei muss darauf geachtet werden, dass durch den operativen Zugangsweg die Hirnfunktion nicht weiter gestört wird.

Da die meisten GBMs unifokal auftreten, ist die lokale Wachstumskontrolle von besonderer Relevanz. Trotz mäßiger Radiosensibilität der GBMs kann die

Strahlentherapie die Überlebenszeit bei Tumoren mit geringer Resttumormasse verlängern (Lai et al., 1993).

Die Chemotherapie spielt bei GBMs eher eine untergeordnete Rolle und setzt einen guten Allgemeinzustand der Patienten voraus. Sie kommt nur bei Patienten mit günstigen prognostischen Faktoren (< 65 Jahre) und bei Tumoren mit oligoglialen Anteilen in Frage (Stupp et al., 2009). In Kombination mit Bestrahlung konnte eine Chemotherapie mit Temozolomid das Überleben, insbesondere bei geringer Resttumormasse nach Operation, ohne Einschränkung der Lebensqualität verlängern (Stupp et al., 2009). Temozolomid ist ein alkylierendes Zytostatikum, welches die DNA-Replikation beeinflusst. Es wird oral appliziert und ist liquorgängig, weshalb es sich zur Behandlung von GBMs eignet.

Bei der radioonkologischen Therapie von GBMs wird zurzeit eine konventionelle Fraktionierung (Einzeldosis 1,8- 2 Gy) mit einer Toleranzdosis von 60 Gy in 6 Wochen veranschlagt. Darauf folgen 6 Zyklen des Chemotherapeutikums Temozolomid (Laperriere et al., 2002).

1.2.5 Prognose

Trotz jahrzehntelanger Anstrengungen von Klinikern und Forschern sind Glioblastome noch immer unheilbare Tumore. Lag die Überlebensdauer vor 40 Jahren bei ca. 9 Monaten (Taveras et al., 1962), so sind es heute unter Einsatz von Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie gerade mal 12-14 Monate (Hollerhage et al., 1991; Schleicher et al., 1999). Durch die Kombinationstherapie (Bestrahlung plus Temozolomid) konnte das mediane Überleben um ein bis zwei Monate verlängert werden (Stupp et al., 2009). Obwohl hohe Strahlendosen eingesetzt werden, kommt es in fast allen Fällen zu Rezidiven.

1.3 Eine Einführung in die Strahlentherapie

1.3.1 Überblick

Die Strahlentherapie ist ein wichtiger Bestandteil der Behandlung von Tumorerkrankungen. Schätzungsweise 50% aller Krebspatienten erhalten im Verlauf ihrer Erkrankung eine Strahlentherapie (Begg et al., 2011).

Die Strahlentherapie kann isoliert oder in Kombination mit Chemotherapie bzw. chirurgischen Verfahren angewendet werden. Es gibt einige Erkrankungen, welche durch eine Strahlenbehandlung geheilt werden können, darunter z.B. Lymphome und niedriggradige Larynxkarzinome. Andere Erkrankungen, wie GBMs und Sarkome reagieren schlecht auf Bestrahlung (Begg et al., 2011).

Die verwendete Strahlendosis ist immer abhängig von der Radiosensitivität des den Tumor umgebenden Gewebes (Begg et al., 2011). Durch präzisere Bestrahlungstechnik konnte in den letzten Jahren die Strahlendosis im Tumorgewebe erhöht und der Schaden an gesundem Gewebe verringert werden. Eine strahleninduzierte Schädigung des Normalgewebes lässt sich jedoch nicht ganz vermeiden.

Zur Verbesserung der Strahlentherapie müssen Strategien entwickelt werden, mit denen der Effekt auf den Tumor maximiert und gleichzeitig der Effekt auf das den Tumor umgebende Gewebe minimiert werden kann (Begg et al., 2011).

Die Tatsache, dass die Radiosensitivität von Tumoren gleicher Entität und gleichem Ausbreitungsgrad enorm variieren kann, zeigt, dass Mechanismen auf zellulärer Ebene entscheidenden Einfluss auf den Therapieerfolg haben. Man unterscheidet drei biologische Parameter, welche das „outcome“ der Strahlentherapie beeinflussen:

1. Grad der Hypoxie,
2. Fähigkeit zur Bildung neuer Populationen nach Bestrahlung (Klonogenität),
3. Intrinsische Mechanismen zur Ausbildung von Radioresistenz (Begg et al., 2011)

Ein besseres Verständnis der Zellbiologie ist essentiell, um neue Strategien zu entwickeln, welche die Tumorzellen gegenüber der Bestrahlung sensitivieren. Es gilt insbesondere diejenigen tumorspezifischen Merkmale aufzudecken, die für seine Strahlenresistenz verantwortlich sind. Damit wäre es möglich, den Tumor für eine Radiotherapie zu sensibilisieren.

1.3.2 Wirkung ionisierender Strahlung auf Zellen

Die bedeutendste Wirkung ionisierender Strahlung auf eukaryotische Zellen ist die Destabilisierung des Genoms. Eine Instabilität des Genoms kann zu maligner Entartung oder zum Zelltod durch Apoptose oder Nekrose führen.

Trifft ionisierende Strahlung auf eine Zelle, kann es zu DNA-Schäden kommen, wie z.B. Einzelstrangbrüchen (SSB), Doppelstrangbrüchen (DSBs) und Basenschäden. Durch ionisierende Strahlung werden aus Wassermolekülen Radikale gebildet, welche ihrerseits zu DNA-Schäden führen (indirekter DNA-Schaden). DSBs haben die schwerste Auswirkung auf die genomische Stabilität (Wyman & Kanaar, 2006). Durch verschiedene DNA-Reparatur-Mechanismen kann ein Großteil der Schäden schnell repariert werden. Es wurden bereits über 100 Gene identifiziert, die mit der Kontrolle der DNA-Reparatur assoziiert sind (Kaina, 2003). Können Schäden am Genom nicht ausreichend repariert werden, kann es zu unterschiedlichen Arten des Zelltods oder zu Seneszenz kommen (Kondo, 2012).

1.3.3 Verschiedene Arten des Zelltods verursacht durch ionisierende Strahlung

Eine erfolgreiche Therapie mit ionisierender Strahlung resultiert in einem klonogenen Zelltod der Tumorzellen. Dies bedeutet, dass die betroffenen Tumorzellen zu einer Zellteilung nicht mehr in der Lage sind, da sie nach Bestrahlung eine Form des Zelltods oder einen permanenten Proliferationsstopp einleiten. Ionisierende Strahlung kann zahlreiche Mechanismen induzieren, die zu einem permanenten Replikationsstopp oder zu unterschiedlichen Formen des Zelltods führen.

Im Folgenden werden die Begriffe „mitotische Katastrophe“, „regulierte Nekrose“, „Autophagie-assoziiertes Zelltod“ und „Seneszenz“ erläutert. In 1.4 wird die Apoptose detailliert beschrieben, da sie für diese Arbeit eine wichtige Rolle einnimmt.

1.3.3.1 Mitotische Katastrophe

Die mitotische Katastrophe wird heute als einer der wichtigsten Zelltodmechanismen nach Bestrahlung angesehen (Eriksson & Stigbrand, 2010). Man spricht von einer verzögerten Form des Zelltodes, da dieser erst

nach ca. 2 - 6 Tagen auftritt. Charakteristisch für die mitotische Katastrophe ist das Auftreten aberranter Chromosomen. Ursache hierfür ist ein zu früher Eintritt der Zelle in die Mitose (Galluzzi et al., 2012). Dies führt zu einer atypischen Chromosomensegregation während der Zellteilung. Mikroskopisch erkennt man Riesenzellen mit atypischer Morphologie (Castedo & Kroemer, 2004), multiplen Nuklei (Erenpreisa et al., 2005) und Mikronuklei (Roninson et al., 2001). Zwei Mechanismen können die mitotische Katastrophe auslösen. Zunächst werden DNA-Schäden und Inaktivierungen von Zell-Zyklus-Checkpoints für eine verfrühte Mitose verantwortlich gemacht (Ianzini et al., 2006). Durch die frühe Mitose können nicht alle DNA-Schäden vor dem Eintritt in die Mitose repariert werden. Folglich kommt es zur mitotischen Katastrophe. Ein zweiter Mechanismus, der die mitotische Katastrophe auslöst, ist die Hyperamplifikation des Zentromers (Bourke et al., 2007; Kawamura et al., 2006). Der Spindelapparat garantiert eine korrekte Aufteilung der Chromosomen auf beide Tochterzellen. Die Hyperamplifikation der Zentromere hat eine multipolare Spindel zur Folge, was zu einer abnormen Segregation der Chromosomen führt (Eriksson et al., 2009; Wang et al., 2009). Am Ende kann der Zelltod stehen, welcher in seiner Exekution sehr der Apoptose ähnelt. Daher spricht man hier auch von verzögerter Apoptose (Eriksson et al., 2007).

1.3.3.2 Autophagie-assoziiertes Zelltod

Der Begriff Autophagie steht für eine zytoprotektive Antwort der Zellen auf Stress und Schädigung. Zellorganellen und das Zytoplasma werden in Lysosomen verdaut. Dadurch können fehlerhafte Makromoleküle entfernt werden. Die bei der Autophagie entstehenden Abbauprodukte stehen dem Metabolismus erneut zur Verfügung.

Darüber hinaus kann Autophagie in einer Form von Zelltod resultieren. Der Begriff „Autophagie-assoziiertes Zelltod“ wurde auf der Basis morphologischer Veränderungen von sterbenden Zellen eingeführt, welche eine massive, für die Autophagie typische Vakuolisierung aufwiesen (Galluzzi et al., 2012). Insbesondere für Krebszellen, welche geringe Mengen der Zelltod-regulierenden Proteine Bak und Bax exprimieren und sensitiv auf bestimmte Chemotherapeutika reagieren (Grander et al., 2009), scheint Autophagie eine

wichtige Rolle zu spielen (Shimizu et al., 2004; Fazi et al., 2008). Es ist noch Gegenstand aktueller Forschung, ob nach Bestrahlung die zytoprotektiven oder die zytotoxischen Eigenschaften der Autophagie überwiegen (Zois & Koukourakis, 2009).

1.3.3.3 Regulierte Nekrose

Über Jahre hinweg war man der Auffassung, dass Apoptose eine geordnete Form des Zelltodes ist und durch Caspasenaktivierung charakterisiert ist (Nehs et al., 2011). Im Gegensatz dazu galt die Nekrose als eine passive Art des Zelltods, die mit Schwellung von Organellen, Chromatinkondensation, unkontrollierter Ausschüttung des Zellinhaltes und einer inflammatorischen Reaktion einhergeht.

Regulierte Nekrose ist eine Form des koordinierten, Caspase-unabhängigen Zelltods, dessen Signaltransduktionsweg eher dem der Apoptose ähnelt (Galluzzi et al., 2012). Diese Form des Zelltods wird über das „receptor interacting Protein 1“ (RIP1) initiiert, welches an aktivierte Zelltodrezeptoren bindet (Nehs et al., 2011). Die „down-stream“-Mechanismen sind derzeit noch nicht aufgeklärt. Nehs et al. konnten jedoch zeigen, dass regulierte Nekrose einen Beitrag zum Strahlen-induzierten Zelltod leistet (Nehs et al., 2011).

1.3.3.4 Seneszenz

Seneszenz ist eine physiologische Reaktion von Zellen, die ihre „proliferativen Reserven“ aufgrund von Telomerverkürzungen verbraucht haben (Deng et al., 2008). Die Telomere sind sich wiederholende Nukleotidsequenzen am Ende der Chromosomen, die bei jeder Zellteilung verkürzt werden. Ihnen wird eine DNA-schützende Funktion zugeschrieben. Unter anderem verhindern sie die Ligation der einzelnen Chromosomen miteinander (Mengual Gomez et al., 2014). Sind die Telomere stark verkürzt, dann leitet die Zelle einen als Seneszenz bezeichneten, permanenten Zell-Zyklus-Arrest ein (Eriksson & Stigbrand, 2010). Dieser natürliche Vorgang wird in vielen Tumorzellen außer Kraft gesetzt. Viele Tumorzellen weisen eine hohe Telomeraseaktivität auf (Mengual Gomez et al., 2014). Dieses Enzym katalysiert die Verlängerung der Telomere an den Chromosomenden.

Seneszenz tritt auch nach unterschiedlichen Arten zellulären Stresses und nach Bestrahlung auf (Gewirtz et al., 2008). Morphologische Zeichen der Seneszenz sind eine Vergrößerung und Verflachung von Zellen (Hayflick & Moorhead, 1961). Diese geht mit einer erhöhten Granularität einher (Stein & Dulic, 1995). Zellen in der Seneszenz weisen eine hohe β -Galactosidaseaktivität auf, die durch eine entsprechende Färbung nachgewiesen werden kann (Debacq-Chainiaux et al., 2009).

Nach Bestrahlung wird Seneszenz als eine Folge der „DNA damage response“ (DDR), also nach Schädigung der DNA eingeleitet. Die DDR beschreibt einen Mechanismus, der nach Bestrahlung oder einem anderweitig erzeugten genotoxischen Stress DNA-Schäden detektiert und DNA-Reparaturmechnismen in Gang setzt. Ist die Schädigung irreparabel, wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, an deren Ende häufig die Seneszenz steht, wenn die Zelle nicht vorher stirbt (Eriksson & Stigbrand, 2010). Diese Art der Seneszenz ist nicht abhängig von Telomerverkürzungen. Die Induktion der Seneszenz durch Bestrahlung ist abhängig von dem Tumorsuppressor p53. Seneszenz Zellen haben die Fähigkeit zur Zellteilung verloren, weisen jedoch Stoffwechselaktivität auf und sind in der Lage mit ihrer Umgebung zu kommunizieren. So können seneszenz Zellen die Angiogenese fördern, Krebszellwachstum unterstützen und ein inflammatorisches Mikromilieu schaffen (Eriksson & Stigbrand, 2010).

1.4 Apoptose

Die Apoptose ist eine wichtige Form des Strahlen-induzierten Zelltodes. Da die Regulierung der Apoptose in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurde, wird diese Form des Zelltods im Folgenden genauer erläutert.

1.4.1 Einführung in die Apoptose

Bereits in den 1970er Jahren wurde eine Form des Zelltodes entdeckt, die sich wesentlich von der Nekrose unterscheidet und zunächst den Namen „schrumpfende Nekrose“ erhielt. 1972 gaben ihr Kerr et al. den Namen „Apoptose“ (Kerr et al., 1972). Der Begriff Apoptose kommt aus dem Griechischen (gr. ἀπόπτωση - der Abwurf, der Niedergang).

Die Apoptose ist eine physiologische Form des Zelltodes, welche oft auch als „programmierter Zelltod“ bezeichnet wird. Es handelt sich hierbei um einen ATP-abhängigen, suizidalen Prozess in Zellen, welcher mit typischen morphologischen und biochemischen Veränderungen einhergeht.

Bereits in der Embryonalentwicklung spielt die Apoptose eine entscheidende Rolle für die Entwicklung vieler Organe, aber auch später ist sie zur Erhaltung der Gewebshomöostase notwendig. Bei der Entstehung des Zentralen Nervensystems und des Immunsystems kommt es zunächst zu einer Überproduktion an Zellen. Zellen, die keine synaptischen Verbindungen herstellen bzw. keine Antigen-Spezifität entwickeln, sterben durch Apoptose (Nijhawan et al., 2000; Opferman & Korsmeyer, 2003).

Im adulten Organismus ist die Apoptose als wichtiger Gegenspieler der Mitose essentiell für das Gleichgewicht von Zellteilung und Zelltod. Sie spielt eine wichtige Rolle in der Regulation verschiedenster Zellpopulationen. Die Apoptose wird auch nach Befall durch intrazelluläre Pathogene induziert, wodurch sich die Erreger schlechter im Organismus ausbreiten können. Apoptose spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Wundheilung beim Abbau von Entzündungszellen (Greenhalgh, 1998). Das Immunsystem bedient sich der Apoptose zur Eliminierung von aktivierten und autoaggressiven Immunzellen (Opferman, 2008). Auch die Rückbildung der Milchdrüsen nach der Laktation geschieht mit Hilfe der Apoptose (Lund et al., 1996). Deregulierte Apoptose im adulten Organismus kann jedoch mit verschiedenen pathologischen Prozessen assoziiert sein. So kann übermäßige Apoptose zu neurodegenerativen Erkrankungen führen, während zu wenig Apoptose in proliferativen Erkrankungen, wie dies bei Tumoren der Fall ist, resultiert (Mattson, 2000). Apoptose kann durch verschiedene endogene und exogene Noxen wie Toxine, Medikamente und ionisierende Strahlung induziert werden (Chowdhury et al., 2006).

1.4.2 Ablauf der Apoptose

Der Ablauf des programmierten Zelltodes kann grob in drei Phasen unterteilt werden (Slee et al., 1999): Am Anfang steht die Initiationsphase, in welcher die Zelle durch unterschiedliche Reize (z.B. ionisierende Strahlung, Entzug von

Wachstumsfaktoren, Chemotherapeutika) ein Signal erhält, welches zu Apoptose führen kann. In der Entscheidungsphase werden verschiedene Signale von pro- und anti-apoptotischen Faktoren abgewogen. Überwiegen die pro-apoptotischen Faktoren wird die Exekutionsphase der Apoptose eingeleitet. In der Exekutionsphase werden schließlich spezifische Proteasen, die sogenannten Caspasen, aktiviert, die für die Auflösung der zellulären Strukturen und der Ausbildung der für die Apoptose typischen Morphologie verantwortlich sind (Slee et al., 1999). Dies resultiert im Zelltod. Zuletzt werden die toten Zellen von spezialisierten Fresszellen, den Makrophagen, erkannt und durch Phagozytose beseitigt (Erwig & Henson, 2008).

Die spezifischen morphologischen Veränderungen der Zelle während der Apoptose wurden mit dem Elektronenmikroskop nachgewiesen. Hierzu zählen Zellschrumpfung, Chromatinkondensation und die Bildung apoptotischer Vesikel (Kerr et al., 1972). Später wurden weitere molekulare Änderungen beschrieben, wie z.B. die DNA-Fragmentierung (Wyllie et al., 1980) und die Phosphatidylserinexternalisierung (Fadok & Henson, 1998), bei der das auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran liegende Phosphatidylserin zur extrazellulären Seite umgelagert wird. Diese Phosphatidylserinexternalisierung dient als Erkennungssignal für Makrophagen zur Phagozytose der apoptotischen Zelle (Shiratsuchi et al., 1998).

1.4.3 Die Rolle der Caspasen bei der Apoptose

Die Caspasen (Cytosolic Aspartat-Specific Cystein Protease) spielen eine zentrale Rolle in der Exekutionsphase der Apoptose. Sind sie aktiviert, werden die zellulären Strukturen fragmentiert. Caspasen sind Cystein-Proteasen, die ihre Substrate an dem Carboxyl-Ende eines Aspartats proteolytisch schneiden. Heute sind 10 humane Caspasen bekannt, welche man grob in Cytokinprozessierende Caspasen der ICE (interleukin-1-beta converting enzyme)-Familie (Caspase-1, -4, -5, -11) und apoptotische Caspasen der CED-3 (C. elegans death protein 3)-Familie (Caspasen -2, -3, -6, -7, -8, -9, -10) einteilt (Alnemri et al., 1996; Strasser et al., 2000; Slee et al., 1999). Caspasen der CED-3-Familie können weiter in Initiatorcaspasen (Caspasen -2, -8, -9, -10) und Effektorcaspasen (Caspasen -3, -6, -7) unterteilt werden. Die Initiatorcaspasen

verfügen über eine längere Prodomäne als die Effektorcaspasen. Alle Caspasen werden als inaktive Vorstufen (Zymogene) mit sehr geringer aber messbarer intrinsischer Aktivität synthetisiert (Thornberry, 1998). Diese werden nach extrinsischen oder intrinsischen Stimuli durch (auto)proteolytische Spaltung nach definierten Aspartatresten aktiviert, was zur Freisetzung einer großen und einer kleinen Untereinheit führt. Die große und kleine Untereinheit bilden zusammen ein aktives Zentrum. Die Initiatorcaspasen vermitteln frühe apoptotische Signale an die Effektorcaspasen und aktivieren diese durch proteolytische Spaltung. Durch positives Feedback wird die Caspasenaktivierung und -prozessierung weiter beschleunigt. Die Effektorcaspasen spalten dann viele zelluläre Proteine, u.a. Strukturprotein und Reparaturproteine (Earnshaw, 1999; Slee et al., 1999). Es sind über 60 Proteine bekannt, die von Caspasen enzymatisch gespalten werden. Einige werden durch die Spaltung funktionell inaktiviert, andere hingegen werden durch die Entfernung einer inhibitorischen Domäne aktiviert (Stroh & Schulze-Osthoff, 1998). Die Spaltung der meisten Substrate erfolgt durch die Effektorcaspasen (Rheaume et al., 1997), obwohl auch Initiatorcaspasen apoptotische Prozesse regulieren können, z.B. bei der Spaltung des proapoptischen Proteins Bid durch die Caspase-8 (Luo et al., 1998).

PARP (Poly-(ADP-ribose)-Polymerase) war eins der ersten Caspasensubstrate, welches beschrieben wurde. Es spielt eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur und wird durch die Effektorcaspase-3 geschnitten (Tewari et al., 1995). Caspase-3 schneidet auch den Inhibitor von CAD, ICAD (Inhibitor of Caspase-activated DNase). Durch diese proteolytische Inaktivierung von ICAD wird CAD freigesetzt, worauf CAD vom Zytosol in den Nukleus transloziert, und die DNA fragmentiert. CAD schneidet die internukleosomale DNA, sodass sich 180 bis 185 bp-große DNA-Fragmente bilden. Die Detektion dieser DNA-Fragmente im Agarosegel als sogenannte „DNA-Leiter“ kann als Apoptosemarker genutzt werden (Enari et al., 1998).

1.4.4 Zwei Signalwege, die zu Apoptose führen

Es sind zwei Wege beschrieben, die zur Apoptose in eukaryontischen Zellen führen: Ein extrinsischer und ein intrinsischer Weg. Ersterer wird durch die

Stimulierung eines Zelltodrezeptors aktiviert. Der intrinsische Weg, auch mitochondrialer Weg genannt, wird durch einen endogenen Stimulus ausgelöst. Beide Wege führen zu einer Caspasenaktivierung und damit zu einer Auflösung zellulärer Strukturen mit der für die Apoptose typischen Morphologie.

1.4.4.1 Der extrinsische Signalweg

Der extrinsische Signalweg wird durch einen exogenen Stimulus initiiert, bei dem ein Todesligand einen auf der Plasmamembran liegenden Todesrezeptor der Tumornekrosefaktorrezeptor-Superfamilie aktiviert (Schulze-Osthoff et al., 1998). Diese Rezeptoren sitzen auf der Außenseite der Plasmamembran und verfügen über zwei bis sechs Cystein-reiche Domänen, über welche sie ihr Substrat binden (Beutler & van Huffel, 1994). Darüber hinaus besitzen sie eine intrazelluläre Domäne (Death Domain, DD), welche eine wichtige Rolle bei der Übertragung apoptotischer Signale spielt (Itoh & Nagata, 1993). Bindet nun ein Ligand an den Rezeptor, kommt es zu einer Rezeptortrimerisierung. Mit Hilfe von Adaptermolekülen kann die Caspase-8 zum Rezeptorkomplex rekrutiert werden (Itoh & Nagata, 1993). Für die Rekrutierung zum aktivierten Rezeptorkomplex ist die Prodomäne der Caspase-8, die sogenannte DE-Domäne (Death Effector Domain) essentiell. Nach der Rekrutierung wird Caspase-8 durch Konformationsänderung und autoproteolytische Spaltung aktiviert. Die aktive Caspase-8 kann weitere Effektorcaspasen durch proteolytische Spaltung aktivieren, wodurch die Caspasenkaskade aktiviert wird.

1.4.4.2 Der intrinsische Signalweg

Beim intrinsischen Weg kommt es durch einen endogenen Stimulus zur Apoptoseinduktion, wobei das Mitochondrium eine zentrale Rolle einnimmt. Während der Apoptose steht die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP, englisch für mitochondrial outer membrane permeabilization) an zentraler Stelle. Ausgelöst wird sie durch die Aktivierung zweier pro-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Proteinfamilie, nämlich durch Bax und Bak, welche eine Öffnung von Poren in der äußeren Mitochondrienmembran induzieren (Bernardi et al., 1994) oder selber Poren formen können (Jourdain & Martinou, 2009). Dadurch werden pro-apoptotische

Proteine wie AIF, Endo G, HtrA2/Omi, Smac/DIABLO und Cytochrom C aus dem mitochondrialen Intermembranraum ins Zytoplasma freigesetzt. AIF und Endo G wandern nach der Freisetzung in den Zellkern und führen dort caspasenunabhängig zu einer DNA-Kondensation und -Fragmentierung (Susin et al., 1999). Das aus dem Mitochondrium ins Zytosol freigesetzte Cytochrom C führt dagegen zu einer Caspasenaktivierung. Zunächst bindet Cytochrom C an Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1). Das Adapterprotein Apaf-1 kann nach Bindung von dATP (Desoxyadenosintriphosphat) und Cytochrom C über seine CARD-Domäne (Caspase-Aktivierungs- und Rekrutierungsdomäne) die CARD-Domäne von Procaspase-9 binden. Auf diese Weise wird die Pro-Caspase-9 zu diesem Komplex rekrutiert. Durch die Bindung der Pro-caspase an diesen Komplex, der auch Apoptosom genannt wird, wird Proaspase-9 aktiviert (Li et al., 1997). Die aktivierte Initiatorcaspase-9 wiederum kann weitere Caspasen in der Kaskade aktivieren, wie z.B. die Effektorcaspase-3 und -7. Die aus dem Mitochondrium freigesetzten HtrA2/Omi und Smac/DIABLO wirken verstärkend auf die Apoptose, indem sie Caspase-Inhibitoren (IAPs: Inhibitors of apoptosis) binden (Deveraux & Reed, 1999). Diese Inhibitoren sind in der Lage an aktivierte Caspasen zu binden und deren Aktivität zu blockieren. Eine Neutralisierung der Inhibitoren resultiert in gesteigerter Caspasenaktivität.

Anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie sind in der Lage MOMP und damit die Aktivierung der Caspasen-Kaskade zu verhindern (Kluck et al., 1997).

1.5 Die Familie der Bcl-2-Proteine

1.5.1 Entdeckung des ersten zelltodinhibierenden Onkogens

Die Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie spielen eine zentrale Rolle für die Regulation der intrinsischen Apoptose. Bcl-2, selbst ein anti-apoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie, ist in B-Zell-Lymphomen überexprimiert, was dem Protein den Namen B-Cell lymphoma-2 (Bcl-2) gab (Tsujimoto et al., 1985). Es ist das erste beschriebene Onkogen, das nicht die Proliferation reguliert sondern den Zelltod verhindert (Vaux et al., 1988). In vielen weiteren Tumoren wird das onkogene Bcl-2-Protein überexprimiert (Placzek et al., 2010). Bei einer

gleichzeitigen Überexpression mit proliferationsantreibenden Onkogenen wie MYC hat Bcl-2 einen synergistischen Effekt auf die Entwicklung von Lymphomen und anderen Tumoren (Strasser et al., 1990).

1.5.2 Aufbau, molekulare Eigenschaften und Klassifizierung verschiedener Bcl-2-Proteine

Die Proteine der Bcl-2-Familie haben strukturelle Gemeinsamkeiten. Sie verfügen alle über eine oder mehrere der vier Bcl-2-Homologie-Domänen (BH-1-4). Manche bestehen aus allen vier BH-Domänen, wie z.B. die anti-apoptotischen Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w. Die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak verfügen lediglich über die Domänen BH-1-3. Andere pro-apoptotische Proteine haben nur eine BH-3-Domäne (Bid, Bad, Bim, Puma, Noxa) und werden aus diesem Grund „BH-3-only“-Proteine genannt. Die pro- und anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie können miteinander interagieren. Die BH-1-, BH-2- und BH-3-Domänen der anti-apoptotischen Proteine falten sich in eine globuläre Domäne, welche eine hydrophobe Grube bildet. Daran kann die BH-3-Domäne eines pro-apoptotischen Proteins mit ihrer amphipathischen α -Helix binden (Chen et al., 2005).

Die Mitglieder der Bcl-2-Familie lassen sich auch nach ihren Eigenschaften einteilen: In Apoptose auslösende (pro-apoptotische Effektorproteine der Bcl-2-Familie), Apoptose verstärkende (pro-apoptotische „BH-3-only“-Proteine) und Apoptose verhindernde (anti-apoptotische) Proteine (Strasser et al., 2000; Adams & Cory, 1998). Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 und A1 sind anti-apoptotische Proteine. Bax und Bak sind pro-apoptotische Effektor-Proteine, welchen die BH-4-Domäne fehlt. Die dritte Gruppe bilden die BH-3-only Proteine, welche in der Lage sind, anti-apoptotische Proteine funktionell zu neutralisieren und so den Ablauf der Apoptose zu verstärken.

Auch besitzen die BH3-only-Proteine eine unterschiedliche Bindungspräferenz zu den diversen anti-apoptotischen Proteinen (Chen et al., 2005). Außerdem sind die BH3-only-Proteine Bim und das durch Caspase-8 gespaltenen Bid (tBid: truncated Bid) in der Lage, durch ihre Bindung an Bax oder Bak diese pro-apoptotischen Proteine zu aktivieren und MOMP herbeizuführen (Du et al., 2011).

Einige BH3-only Proteine sind spezifischer als andere. Bim, Puma und tBid können mit sämtlichen anti-apoptotischen Proteinen interagieren. Noxa ist spezifisch für Mcl-1 und A1. Bad dagegen bindet Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w, nicht aber Mcl-1 und A1 (Chen et al., 2005; Kuwana et al., 2005; Kim et al., 2006; Certo et al., 2006; Willis et al., 2005).

Die intrinsische Aktivierung der Apoptose wird also über ein komplexes Zusammenspiel der unterschiedlichen Proteine der Bcl-2-Familie reguliert.

1.5.3 Die Rolle der Bcl-2-Proteinfamilie für die intrinsische Apoptose

Bei der intrinsischen Apoptose werden nach zytotoxischem Stress (Bestrahlung, Chemotherapie, Entzug von Wachstumsfaktoren) BH-3-only Proteine aktiviert. Dies kann z.B. über Transkriptionsfaktoren geschehen: Noxa und Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis) können nach DNA-Schädigung durch p53 transkriptionell induziert werden (Oda et al., 2000; Nakano & Vousden, 2001; Yu et al., 2001). Bim wird nach Entzug von Wachstumsfaktoren durch den „class0 forkhead box transcription factor- 3A (FOXO3A) aktiviert (Dijkers et al., 2000).

BH-3-only-Proteine können auch post-translational aktiviert werden. So wird z.B. Bad (Bcl-2 antagonist of cell death) bei Wachstumsfaktormangel dephosphoryliert (Zha et al., 1996). Phosphoryliertes Bad wird normalerweise in der Zelle von 14-3-3-Proteinen sequestriert und ist folglich nicht in der Lage, mit anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen zu interagieren. Dephosphorylierung von Bad führt zu seiner Freisetzung aus dem inhibitorischen Komplex, was eine Neutralisierung der anti-apoptotischen Proteine ermöglicht. Pro-apoptotisches Bid (BH-3-interacting domain death agonist) andererseits wird durch Caspase-8-abhängige proteolytische Spaltung aktiviert (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Seine Aktivierung nach Stimulierung der extrinsischen Apoptose verbindet den extrinsischen mit dem intrinsischen Apoptosesignalweg.

Die aktivierten BH-3-only-Proteine wirken hemmend auf die anti-apoptotischen Proteine. Dadurch wird die hemmende Wirkung der anti-apoptotischen Proteine auf Bax und Bak aufgehoben, was zu einer Aktivierung dieser führt. Dabei verändert das zytosolische Protein Bax seine Konformation und bildet gemeinsam mit Bak Heterodimere an der äußeren Mitochondrienmembran.

Danach kommt es zur Bildung von Poren in der Membran, was zu MOMP führt (Chipuk et al., 2006). Wie bereits oben beschrieben führt dies zur Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien und ultimativ zur Caspasenaktivierung und Apoptose.

1.6 Kenntnisstand zu Mcl-1

1.6.1 Funktionen von Mcl-1

Mcl-1 (Myeloid cell leukemia sequence 1) gehört zur Gruppe der anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie, (Adams & Cory, 2007). Mcl-1 wird in vielen Zelltypen exprimiert und kann durch Wachstums-, Differenzierungs-, und Überlebensfaktoren induziert werden. Eine hohe Mcl-1-Konzentration korreliert mit besserem Überleben der Zelle nach viralen Infektionen und Stresssignalen (Craig, 2002). Eine durch Wachstumsfaktorenentzug induzierte Abnahme von Mcl-1 führt zum Zelltod. So sterben Zellen durch IL-3-Entzug an Folge einer Mcl-1-Fragmentierung (Maurer et al., 2006).

Mcl-1 ist zum einen mit der Mitochondrienmembran assoziiert, zum anderen aber auch frei im Zytosol vorhanden (Akgul et al., 2000; Craig, 2002). Mcl-1 kann mit dem pro-apoptotischen Protein Bak interagieren und verhindert damit, dass Bak MOMP auslöst (Cuconati et al., 2003)(Rudner et al., 2011). Das Tumorsuppressorgen p53 kann durch Induktion von Noxa und Puma den Komplex zwischen Mcl-1 und Bak auflösen, was in Aktivierung von Bak mit anschließendem MOMP resultiert (Leu et al., 2004).

Weiterhin kann Mcl-1 durch seine Interaktion mit tBid direkt den extrinsischen Signalweg hemmen, indem es die Aktivierung von Bax und Bak durch tBid verhindert (Clohessy et al., 2006).

1.6.2 Regulierung von Mcl-1

Mcl-1 besitzt eine kurze Halbwertszeit von 30 min bis 3 h und kann nach zytotoxischem Stress schnell abgebaut werden (Schulze-Bergkamen et al., 2006; Yang et al., 1995; Trivigno et al., 2012). Dies beruht unter anderem auf einer PEST-Sequenz des Mcl-1-Proteins. Diese PEST-Sequenz ist reich an den Aminosäuren Prolin-, Glutamin-, Serin- und Threonin und ist häufig in kurzlebigen Proteinen zu finden (Kozopas et al., 1993). Die PEST-Sequenz

spielt eine Rolle bei der Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Degradierung von Proteinen.

1.6.2.1 Posttranslationale Regulierung von Mcl-1 durch das Ubiquitin-Proteasom-System

Mcl-1 kann posttranslational durch verschiedene Mechanismen wie Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Ubiquitin-unabhängige proteasomale Degradierung reguliert werden. So wird Mcl-1 z.B. nach zytotoxischem Stress polyubiquitiniert und durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) proteasomal fragmentiert (Nijhawan et al., 2003). Das UPS spielt eine wichtige Rolle für die posttranslationale Degradierung von Proteinen. Ubiquitin (UB) ist ein 76 Aminosäuren langes Protein, welches kovalent an Proteine bindet, wodurch die Proteine für die proteasomale Degradierung markiert werden (Pickart, 2001). Die Ubiquitinierung wird von drei Enzymen bewerkstelligt, wobei jedes Enzym für einen Schritt der Ubiquitinierung verantwortlich ist. Diese sind die E1-Enzyme (ubiquitin-activating-enzymes), die E2-Enzyme (ubiquitin-conjugating-enzymes) und die E3-Enzyme (ubiquitin-ligases) (Deshaies & Joazeiro, 2009). Derzeit sind zwei E1-, zehn E2-, und einige hundert E3-Enzyme bekannt (Semple et al., 2003). E1-Enzyme aktivieren Ubiquitin. Dadurch wird das terminale Glycin von UB ATP-abhängig an die Thiolgruppe eines Glycinrestes eines E1-Enzyms kovalent gebunden. Im zweiten Schritt wird das UB an einen Glycinrest im aktiven Zentrum eines E2-Enzyms transferiert. Im letzten Schritt wird das UB mit Hilfe von E3-Enzymen an einen Lysinrest eines modifizierten Proteins gebunden (Pickart, 2001). Je nachdem, wieviele UB-Moleküle verbunden wurden, spricht man von Mono-, Oligo- oder Poly-Ubiquitinierung. Sind mindestens fünf UB-Moleküle über Lysin 48 miteinander verknüpft an ein Protein gebunden, wird dieses proteosomal fragmentiert (Hershko, 2005).

Es sind vier Enzyme bekannt, die Mcl-1 ubiquitinieren können: Mcl-1 Ubiquitin-Ligase (MULE) (Zhong et al., 2005), β -transducin-containing protein (β -TrCP) (Ding et al., 2007), F-box-and WD repeat-containing 7 (FBW7) (Inuzuka et al., 2011) und Tripartite motif containing 17 (Trim 17) (Magiera et al., 2013). Interessanterweise besitzt die UB-Ligase MULE eine BH-3-Domäne, wodurch sie an Mcl-1 binden kann (Stewart et al., 2010). Die BH-3- Peptide der Proteine

Bak, Bim, Bid, Puma und Noxa verfügen über eine höhere Affinität zu Mcl-1, was darauf hindeutet, dass diese pro-apoptischen Proteine Mcl-1 aus seiner Bindung zu Mcl-1 verdrängen können (Warr et al., 2005). Die Herunterregulierung von Bim kann so zu einer erhöhten Mcl-1-Fragmentierung führen (Wuilleme-Toumi et al., 2007). Im Gegensatz dazu scheint Noxa die Affinität von Mcl-1 zu Mcl-1 zu erhöhen und so die proteosomale Fragmentierung von Mcl-1 zu fördern ((Willis et al., 2005) (Czabotar et al., 2007) (Gomez-Bougie et al., 2011)). Andererseits hängt die Degradierung von Mcl-1 von dessen Phosphorylierungsstatus ab. Phosphoryliertes Mcl-1 wird insbesondere durch β -TrCP und FBW7 schneller ubiquitiniert und folglich fragmentiert (Ding et al., 2007) (Inuzuka et al., 2011) (Vucic et al., 2011).

Ubiquitinierung ist wie Phosphorylierung ein reversibler Prozess. Es sind etwa 100 Deubiquitinasen (DUBs) bekannt, welche Ubiquitin von Proteinen entfernen. Die DUBs kann man in 5 Klassen von Proteasen einteilen, vier Cystein-Klassen und eine Metallo-Proteaseklasse (Finley et al., 2004). Das Protein USP9x (Ubiquitin Specific Peptidase 9 X-linked) ist eine Deubiquitinase, welche die Degradierung von Mcl-1 beeinflusst (Schwickart et al., 2010). DUBs entfernen Polyubiquitinketten vom betroffenen Protein und verhindern so seinen proteosomalen Abbau. USP9x interagiert mit Mcl-1 und wird in vielen Tumorzellen überexprimiert (Schwickart et al., 2010). Schwickart et al. konnten zeigen, dass USP9x mit Mcl-1 interagiert und dieses stabilisiert. USP9x ist nicht Mcl-1-spezifisch und stabilisiert auch andere Proteine wie z.B. β -Catenin, transforming growth factor- β (TGF β) und stress-activated apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) ((Jolly et al., 2009) (Wrana, 2009) (Nagai et al., 2009) (Everett et al., 1997)). Erhöhte USP9x Konzentrationen korrelieren mit hohen Mcl-1-Konzentrationen bei folliculären Lymphomen, ductalen Adenokarzinomen, Kolokarzinomen und kleinzelligen Bronchialkarzinomen. Eine hohe USP9x-Konzentration geht mit einer schlechten Prognose bei multiplen Myelomen einher (Schwickart et al., 2010).

1.6.3 Mcl-1 ist in vielen Tumorentitäten überexprimiert

Mcl-1 ist ein essentielles Protoonkogen, welches in vielen humanen Tumorgeweben, insbesondere in Glioblastomen, überexprimiert wird und mit

Therapieresistenz einhergeht ((Krajewski et al., 1997) (Cory et al., 2003)). Das Protein spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung und den Erhalt von B- und T- Zell- Lymphomen (Opferman et al., 2003). Hohe Mcl-1-Level in Tumorzellen korrelieren häufig mit Resistenzen gegen Chemotherapien und mit Rezidiven ((Wei et al., 2006) (Wuilleme-Toumi et al., 2005)). Bei der Chronisch Lymphatischer Leukämie korreliert ein hoher Mcl-1-Spiegel mit einer niedrigen Chemosensitivität (Saxena et al., 2004). Beim hepatozellulären Karzinom konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulierung von Mcl-1 durch RNA-Interferenz die Krebszellen gegenüber Apoptoseinduktoren sensitiviert (Schulze-Bergkamen et al., 2006). Mcl-1 ist mitverantwortlich für die Resistenzen vieler Tumorentitäten gegenüber der neuen BH-3-Mimetika (ABT-737 und ABT-263), welche an die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w binden, um deren Interaktion mit den pro-apoptotischen Proteinen zu verhindern ((Konopleva et al., 2006) (van Delft et al., 2006) (Mazumder et al., 2012)).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1 werden häufig in Glioblastomen überexprimiert und limitieren den Therapieerfolg. Im Gegensatz zu Bcl-2 und Bcl-xL, sind gegen Mcl-1 keine spezifischen Inhibitoren entwickelt worden. Interessanterweise ist von den drei genannten anti-apoptotischen Proteinen insbesondere die Stabilität von Mcl-1 durch Ubiquitin-Ligasen und DUBs genau reguliert. In dieser Arbeit soll deshalb untersucht werden, ob die Stabilisierung von Mcl-1 einen Radioresistenzmechanismus in den Glioblastomzelllinien A172 und U373 darstellt. Insbesondere soll geklärt werden, welchen Einfluss die Deubiquitinase USP9x auf die Mcl-1-Stabilität und das Überleben nach Bestrahlung hat.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Bezugsquelle
β - Mercaptoethanol	Sigma- Aldrich®
Acrylamid/ Bisacrylamid Rotiporese Gel 30	Roth
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth
Aprotinin	Roth
Bromphenolblau	Merk
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	Sigma
ECL Western-Blotting detection reagents	GE Healthcare
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma- Aldrich®
Ethidiumbromid	Sigma- Aldrich®
Gel 30	Roth
Glycerol	Merck
Glycin	Roth
Salzsäure (HCL)	Merck
HEPES Buffer Solution	PAA
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Leupeptin	Sigma- Aldrich®
Methanol	Merck
Milchpulver	Roth
Di- Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	VWR Prolabo®
Natriumfluorid (NaF)	Sigma- Aldrich®
Natriumcitrat	Sigma- Aldrich®
Pepstatin A	Roth

Propidiumiodid	Sigma- Aldrich®
Proteinmarker: Page Ruler, Spectra	Fermentas
Phenyl-methylsulfonyl-fluorid (PMSF)	Sigma- Aldrich®
Ponceau- S- Lösung	Fluka®
Natriumpyrophosphat (NaPP)	Sigma- Aldrich®
Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Protein Farbkonzentrat)	Biorad
Rotiphorese® 10x SDS- Page	Biorad
Tetramethylrhodamin-ethylester-perchlorat (TEMED)	Sigma- Aldrich®
Tetramethylrhodamin-ethylester-perchlorat (TMRE)	Mobitech
Trizma Base	Sigma- Aldrich®
Tris HCl	Roth
TritonX-100	Roth
Tween20	Applichem
Isopropanol	AnalaR Normapur
Ethanol	Merck
Di- Dithiothreitol (DTT)	Sigma- Aldrich®
Natrihydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich®
Milchpulver	Roth
Extracellular loop- anti- m/r-IgG	GE Healthcare UK Limited
5x siRNA- Buffer	Thermi Scientific
FBS (Fetal Bovine Serum)	Biochrom AG
Trypsin- EDTA	PAA
Phosphatidate cytidyltransferase (Enzyme Free)	Sigma-Aldrich®
Trans-IT SiQuest®, Transfektionsreagenz	Mirus®
Cycloheximid (CHX)	Sigma-Aldrich®
PBS Tabletten	Invitrogen

Tabelle 1: Verwendete Detergenzien

2.1.2 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Nalgene® Mr. Frosty (Container zur Cryoconservierung von Zellen)	Nalgene® Labware
Anthos 2010 Microplate Reader	Anthos Labtec Instruments GmbH
Begasungsbrutschrank	Heraeus- Kendro/ HERAcell 240
Bestrahlungsgerät	Siemens/ Linearbeschleuniger LINAC
FACSCalibur™ Durchflusszytometer	Becton Dickinson
Filmentwickler	Agfa Curix AC002
Magnetrührer MR 3001	Heidolph
Microplate reader für den Aktivitätsassay	Infinite 200, Tecan
Mikroskop	Hund Wetzlar/ Wilovert S
pH-Meter Seven Compact	Mettler, Toledo
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/ Rocky 3D
Zentrifugen	<ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf/ Centrifuge 5417R, Centrifuge 5804R • Hettich/ Rotanda RPC Laborzentrifuge • Sorvall® SUPER T21, Rotor SL- 50T
Scanner	HP ScanJet 4c/T
Gewebshomogenisator	Ultra-Turrax

Tabelle 2: Verwendete Geräte

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
CryoPure Röhrchen	Sarstedt
Eppendorf Cup 1,5 ml, 0,5 ml und 0,2 ml	Sarstedt
Filterpapier Whatman	Roth
Kopierfolien	Impega
Neubauer Einwegzählkammer	Biochrom
PVDF- Membran	Roth
Film zur Auswertung der Westernblots	GE Healthcare
Zellkulturflaschen	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen (15 ml/50 ml)	Sarstedt
Eppendorf Cup 0,2 ml, RNase free	Sarstedt
Round- Bottom Tubes für FACS Analyse	BD Falcon
Tissue Culture Dish 100x20 mm	Sarstedt
MICROTEST Tissue Culture Plate,	BD Falcon

96well	
MICROTEST Tissue Culture Plate, 6 well	BD Falcon
Zellschaber	Costar®
Stangenpipetten 1ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Costar®
Falcon Tube 15ml, 50 ml	Sarstedt
Zellkulturflaschen PE vented Cup 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Sarstedt

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

2.1.4 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Chemikalien	Endkonzentration/ Volumen/ Masse
PBS (PBS- Tabletten Invitrogen®) gelöst in Aqua dest	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	140 mM 2,68 mM 10 mM 1,5 mM
4x Sample Buffer (4x SB)	Tris-HCl SDS Bromphenolblau Glycerol	200 nM 8% 0,2% 40%
Lysepuffer Standard Westernblot (WB)	HEPES NaCl NaPP EDTA NaF Na ₃ VO ₄ Aprotinin Leupeptin Pepstatin A PMSF	50 mM 150 mM 10 mM 1 mM 10 mM 2 mM 5 µg/ml 5 µg/ml 3 µg/ml 1 mM

	Triton X 100	1%
Ammoniuperoxidsulfat (APS)	APS Aqua dest.	438 mM
Transferpuffer für WB	Trizma Base Glycin Methanol Aqua dest	3,03 g/l 14,40 g/l 200 ml/l 800 ml/l
Tris Buffered Saline (TBS) - Tween	Tris HCl NaCl Tween20 pH 8,0	1,57 g/l (10 mM) 8,76 g/l (150 mM) 1 ml/l Einstellung mit 5 M NaOH
Blocking-Puffer für WB	Milchpulver in TBS-Tween	5%
Sammelgelpuffer für WB	Trizma Base SDS (10%) pH 6,80	6,06 g/ 100 ml 4 ml/100 ml Einstellung mit 32% HCl
Trennpuffer für WB	Trizma Base SDS (10%) pH 8,80	18,17/ 100 ml 4 ml/100 ml Einstellung mit 32% HCl
Nicoletti- Färbelösung	Na- Citrat Triton X-100 Propidiumiodid	0,1% in PBS 0,1% 5 µg/ml

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen

2.1.5 Kultur-Medien

Medium	Firma
Zellkulturmedium für Kurz- und Langzeitkulturen, RPMI 1640 [+]-L-	PAA Laboratories GmbH

Glutamin	
----------	--

Tabelle 5: Verwendete Kultur-Medien

2.1.6 Erst-Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle	Anti-Mouse/Rabbit	Klonalität	Verdünnung
Bak	Upstate	Rabbit	Polyklonal	1:1000
Bax	Cell Signalling	Rabbit	Polyklonal	1:1000
Bcl- x _L	Cell signalling	Rabbit	Polyklonal	1:1000
Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology	Mouse	Monoklonal	1:400
Bim	Epitomics	rabbit	Monoklonal	1:500
Caspase 3	Cell signalling	Rabbit	Polyklonal	1:1000
Mcl-1	Cell Signalling	rabbit	Monoklonal	1:1000
Mcl-1	Cell Signalling	rabbit	Polyklonal	1:1000
Noxa	Calbiochem	mouse	Monoklonal	1:500
PARP	Cell Signalling	rabbit	Polyklonal	1:1000
Puma	Epitomics	rabbit	Monoklonal	1:2000
β-Aktin	Sigma	mouse	Monoklonal	1:30.000
USP9x	Novus Biologicals	rabbit	Polyklonal	1:2000
β-Catenin	Cell Signalling	rabbit	Monoklonal	1:1000
GAPDH	ABCAM	mouse	Monoklonal	1:20.000

Tabelle 6: Verwendete Erst-Antikörper

2.1.7 Zweit-Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle	Enzym	Verdünnung
ECL- Meerrettichperoxidase- konjugierter anti-Maus- Antikörper	GE Health Care UK Limited	Horseradish	1:2000

ECL- Meerrettichperoxidase- konjugierter anti-Hase- Antikörper	GE Health Care UK Limited	Horseradish	1:2000
---	---------------------------------	-------------	--------

Tabelle 7: Verwendete Zweit-Antikörper

2.1.8 Zelllinien

A172: A172 ist eine humane, adhärenente Glioblastom-Zelllinie aus dem Gehirn eines 53-jährigen Mannes.

U373: U373 ist eine humane, adhärenente Glioblastom-Zelllinie aus dem Gehirn.

T98G: T98G ist eine humane, adhärenente Glioblastom-Zelllinie aus dem Gehirn eines 61-jährigen Mannes.

U-87MG: U-87MG ist eine humane, adhärenente Glioblastom-Zelllinie aus dem Gehirn eines 44-jährigen Mannes.

LN-229: LN-229 ist eine humane, adhärenente Glioblastomzelllinie aus dem rechten parieto-occipitalen Kortex einer Frau.

Jurkat, Klon E6.1: Jurkat ist eine humane, nicht-adhärenente, T-lymphozytäre Zelllinie aus dem peripheren Blut eines Mannes mit akuter T-lymphozytärer Leukämie.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Glioblastomzelllinien A172 und U373 wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS (Kulturmedium) bei 5% CO₂ und 37,0 °C kultiviert. Erreichten die Zellen in den Kulturflaschen eine Konfluenz von 80-90 %, wurden sie passagiert, um einen Wachstumsstopp durch Kontaktinhibition zu verhindern. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und mit 2,5 ml Trypsin-

EDTA 5 min bei 37 °C abgelöst. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 7,5 ml Kulturmedium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon überführt und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 12 ml Medium resuspendiert. Die A172-Zellen wurden dann in einem Verhältnis von 1:10 gesplittet, die U373-Zellen in einem Verhältnis von 1:40.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Sicherung von Zellen niedriger Passagennummer wurden ca. $1-2 \times 10^6$ Zellen in RPMI 1640 + 20% FCS + 10% DMSO zunächst über Nacht langsam im Nalgene® Mr. Frosty bis auf -80 °C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Zum Auftauen wurde das Kryoröhrchen bei 37 °C ins Wasserbad gestellt. Die Zellen wurden anschließend in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und bei 1200 rpm 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 12 ml RPMI 1600 + 10% FCS resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt. Nach 24 h wurde der Überstand mit toten Zellen abgenommen und neues Kulturmedium hinzugegeben. Die Zellen wurden dann wie oben beschrieben kultiviert.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde im Mikroskop mit Hilfe einer Neubauer- Zählkammer ermittelt. Zunächst wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche mit Hilfe einer Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, in Kulturmedium aufgenommen und mit Trypanblau 1:2 verdünnt. 10 µl dieser Suspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die in den Quadranten gezählte Menge an Zellen wurde mit dem Faktor 2×10^4 multipliziert, was der Zellzahl pro ml Suspension vor der Verdünnung mit Trypanblau entspricht.

2.2.2 siRNA-Transfektion mit Transfektionsreagenz SiQuest®

Die siRNA (small interfering RNA) ist eine doppelsträngige RNA. Sie bindet die transkribierte mRNA und verhindert so deren Translation. Außerdem induziert die siRNA eine Degradierung der gebundenen mRNA (Pushparaj & Melendez, 2006). So kann die Synthese von Proteinen spezifisch herunterreguliert werden.

Die Transfektion der siRNA in die Zelle erfolgte mit Hilfe von Trans-IT SiQuest® siRNA-Transfektionsreagenz (SiQuest®). Zunächst wurde die gewünschte Zellzahl (U373: 3×10^5 , A172: 4×10^5 pro Well) auf 6-Well-Platten in je 3 ml Medium pro Well ausgesät und 24 h bei 37 °C kultiviert. War eine Konfluenz von ca. 60-80 % erreicht, wurden 1,75 ml Medium aus jedem Well abpipettiert. Zu den verbleibenden 1,25 ml Zellkulturmedium wurde die Transfektionlösung tröpfchenweise in jedem Well der Zellkulturplatte verteilt. Die Lösung enthielt pro Ansatz: 250 µl phenolrotfreies, serumfreies RPMI 1640, 4 µl SiQuest® und 37,5 µl siRNA (1 µM). Sie wurde vor der Transfektion der Zellen 30 min lang bei Raumtemperatur inkubiert, um zu gewährleisten, dass die siRNA und SiQuest® Komplexe bilden. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit non-targeting (nt)-siRNA transfiziert.

Dann wurden die transfizierten Zellen für 24 h bei 37 °C kultiviert. Es folgte ein Mediumwechsel und die Bestrahlung (Radiotherapie, RT) mit 10 Gy. Nach 48 h wurden Zelllysate aus den transfizierten Zelllinien hergestellt. Alternativ wurden die transfizierten Zellen zu bestimmten Zeitpunkten durchflußzytometrisch analysiert.

2.2.3 Bestrahlung der Zellen

Die verschiedenen Zellen wurden bei Raumtemperatur mit 6 MV-Photonen mit Hilfe des Linearbeschleuniger LINAC® bestrahlt.

2.2.4 Quantifizierung der Apoptoserate mittels Durchflußzytometrie/ FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)

Die Durchflußzytometrie dient der Charakterisierung von Zellen aufgrund ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften. Mit der FACS-Methode können verschiedene morphologische Eigenschaften der Zellen vor und nach Radiotherapie (RT) ermittelt, quantifiziert und verglichen werden. Zunächst werden die in einem Gefäß bereitgestellten Zellen angesaugt, um im FACS-Gerät durch hydrodynamische Fokussierung mit hoher Geschwindigkeit perlschnurartig aufgereiht und an einem Laserstrahl vorbeigeleitet zu werden. Dabei geht ein Teil des Lichts durch die Zelle durch, während andere Teile des Lichts abgelenkt werden. Das durchgehende Licht wird im „Vorwärtsdetektor“

(FSC = Forward Scatter), das zum Einfall im rechten Winkel abgelenkte Licht im „Seitwärtsdetektor“ (SSC = Sidewards Scatter) registriert. Die Intensität des durchgehenden Lichts ist ein Maß für die Zellgröße, die Intensität des abgelenkten Lichts ist ein Maß für die Granularität der Zelle. Beide Werte werden für jede Zelle ermittelt. Dank der hohen Geschwindigkeit des Durchflusses können in kurzer Zeit sehr viele Zellen gemessen werden. Trägt man die Zellen anhand der gemessenen Werte in einem zweidimensionalen Koordinatensystem auf, so erhält man eine Verteilung der Zellen, einen sogenannten Dot-Plot. Apoptotische Zellen sind kleiner und granulierter und können mit dieser Methode von vitalen Zellen durch die Bildung zweier Dot-Plot-Populationen abgegrenzt werden. Die Emission der mit einem Fluoreszenzstoff markierten Zellen kann nach Anregung mit dem 488 nm FACS-Laser in den entsprechenden Kanälen, vor die ein entsprechender Filter vorgeschaltet ist, untersucht werden.

2.2.4.1 Messung der DNA-Fragmentierung

Während der Apoptose kommt es zur DNA-Fragmentierung. Mit Hilfe einer bereits beschriebenen Methode kann der DNA-Gehalt in Zellen bestimmt werden (Nicoletti et al., 1991). In dieser Arbeit wurde ein abgeändertes Protokoll von Nicoletti et al. verwendet. Die Zellen wurden in einem isotonen, Propidiumiodid (PI)-haltigen Puffer (PBS, 0,1% Triton X-100, 0,1% Natriumzitat, 10 µg/ml PI) inkubiert. Nachdem der Fluoreszenzfarbstoff in die permeabilisierte Zelle eingedrungen ist, interkaliert er mit der DNA. Je nach DNA-Gehalt variiert die Fluoreszenzintensität der Zellen. Da die Nicoletti-Lösung Detergenz-haltig ist (Triton X-100), gelangt sie auch in membranumschlossene DNA-haltige Vesikel, die sich im Rahmen apoptotischer Vorgänge bilden. Während der Messung werden die Zellen mit einem Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, woraufhin das in der DNA interkalierte PI, je nach DNA-Gehalt der Zelle, Licht in unterschiedlichen Intensitäten emittierte. Die Intensität des emittierten Lichts und der DNA-Gehalt in der Zelle stehen also in einem direkten Verhältnis. Dieses Licht konnte im Fluoreszenzkanal FL-2 oder FL-3 registriert und durch eine spezielle Software (BD CellQuest Pro) dargestellt werden. Die Fluoreszenz-Intensitätsverteilung

wurde in Histogrammen über einen Bereich der relativen Fluoreszenzintensitäten von 10^0 und 10^4 dargestellt. Durch diese Anordnung ergibt sich ein Zell-Verteilungsmuster, das abhängig vom DNA-Gehalt der Zelle ist. Die „Peaks“ stellen die Zellzyklusphase G_1 (vor Replikation) und G_2 (nach Replikation) dar. Die Zellen jenseits der Fluoreszenzintensitäten von G_1 und G_2 sind entweder tot (sub G_1 : unterhalb von G_1) oder polyploid (HyperG, oberhalb von G_2).

Bei der Messung nach Nicoletti wurde der Anteil der Zellen bestimmt, der sich im sub G_1 -Bereich befand. Dazu wurden die A172- und U373-Zellen mit 1 ml Zelldissoziationspuffer CDP abgelöst und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Dann wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 200-400 μ l PI-Färbelösung resuspendiert. Das Gemisch wurde eine Stunde bei Raumtemperatur ohne Licht inkubiert und anschließend mit dem FACS CaliburTM Durchflusszytometer gemessen.

2.2.4.2 Messung des mitochondrialen Membranpotentials mittels TMRE-Färbung

In apoptotischen Zellen kommt es zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$), wohingegen es in gesunden Zellen intakt bleibt. Der für das mitochondriale Potential spezifische Farbstoff TMRE (Tetramethylrhodamin-ethylester-perchlorat) ist ein membrangängiger Farbstoff. Bei intaktem $\Delta\Psi_m$ akkumuliert der Farbstoff in der inneren Mitochondrien-Membran, während er beim Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ aus den Mitochondrien diffundiert. Gesunde Zellen mit intaktem $\Delta\Psi_m$ weisen eine höhere Fluoreszenzintensität auf (TMRE high) als solche mit zusammengebrochenem mitochondrialen Membranpotential (TMRE low).

Es wurden A172- und U373-Zellen in 6-well-Platten ausgesät, nach 24 h mit 10 Gy bestrahlt und nach weiteren 24-72 h mit Zelldissoziationspuffer CDP abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Röhrchen abzentrifugiert und mit jeweils 200 μ l TMRE-Färbelösung (25 nM in PBS) inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellen für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Hiernach erfolgte die Messung am FACS CaliburTM im Fluoreszenzkanal FL-2. Populationen mit zusammengebrochenem $\Delta\Psi_m$ wurden als prozentueller Anteil

aller gemessenen Zellen im Dotblot analysiert, indem die im Fluoreszenzkanal FL-2 gemessene Fluoreszenzintensität gegen die Streulichtintensität (SSC) aufgetragen wurde.

2.2.5 Nachweis der Proteinlevel mittels Westernblot

Die Proteinlevel verschiedener Proteine wurden mit Hilfe der Westernblot-Technik analysiert. Dazu wurden Zellen lysiert, die Lysate auf einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Um die Proteine zu detektieren, wurde die Membran mit einem „Erstantikörper“ inkubiert, der spezifisch nur an das zu untersuchende Protein bindet. Der „Sekundärantikörper“, welcher gegen den Erstantikörper gerichtet ist, ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, englisch für „horse radish peroxidase“) gekoppelt. Nach Zugabe eines entsprechenden Substrates, wurde dieses durch das Enzym umgesetzt. Bei dieser Reaktion wurde Energie in Form von Chemolumineszenz frei, die mit Hilfe eines Röntgenfilms analysiert werden konnte.

2.2.5.1 Herstellung der Zelllysate

Für die Herstellung der Lysate wurden 2×10^6 Zellen 10 min mit 1.300 rpm bei Raumtemperatur in einem 50 ml Falcon abzentrifugiert. Nachdem das Medium abgesaugt wurde, wurde das Zellpellet mit 200 μ l PBS gewaschen. Danach wurden die in PBS resuspendierten Zellen mit einer Pipette aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und in 200 μ l Lysepuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Gewinnung der zytosolischen Fraktion wurden die lysierten Zellen 15 min bei 13.000 rpm und bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand (das Lysat) in ein neues Gefäß überführt.

2.2.5.2 Ermittlung der Proteinkonzentration mit Hilfe des Spektralphotometers

Um eine Beladung der SDS-Gele mit der gleichen Proteinmenge in den jeweiligen Zelllysaten zu gewährleisten, wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Dazu wurden in einer 96-Well-Platte 1 μ l des Lysats zu 200 μ l BioRad (1:5 verdünnt mit H₂O) pipettiert. Zudem wurde eine BSA- Standard-

Proteinverdünnungsreihe (0, 2, 4, 6, 8, 10 µg pro 200 µl verdünnte BioRad-Lösung) hergestellt. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen. Es wurde eine Geradengleichung mit Hilfe der BSA-Standardreihe und Excel-Software berechnet, die wiederum zur Berechnung der Proteinkonzentration der jeweiligen Proben herangezogen wurde.

2.2.5.3 Angleichung der Proteinkonzentration unterschiedlicher Proben

Um verschiedene Proben auf Proteinbasis miteinander vergleichen zu können, muss gewährleistet sein, dass alle Proben die gleiche Gesamtmenge an Protein beinhalten. Die Lysate wurden durch Zugabe des Lyse- und 4x Sample-Buffer mit DTT (Dithiothreitol, 1:100) auf die gleiche Proteinmenge eingestellt. Das DTT reduziert Disulfidbrücken und löst dadurch Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine auf. Für die vollständige Denaturierung der Proteine wurden die Proben anschließend 10 min bei 95 °C im Thermoschüttler gekocht. Die Lysate wurden für den mehrmaligen Gebrauch bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.5.4 Auftrennung der Proteine mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierten Proteine wurden in Acrylamid-Gelen der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Die verwendeten Gele wurden wie in Tabelle 8 beschrieben zusammengesetzt. Die Gele wurden in eine Elektrophoresekammer eingespannt. Danach wurde mit einer Hamilton-Spritze eine bestimmte Menge des Lysats bzw. des Proteinmarkers in die Geltaschen gefüllt. Die Proteine wurden zunächst mit einer Spannung von 60 mV an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel fokussiert. Das Auftrennen der Proteine im Trenngel erfolgte bei einer Spannung von 160 mV. Je nach Proteingröße wurden Trenngele unterschiedlicher Acrylamid-Konzentration verwendet. Als Puffer diente der SDS-Puffer von BioRad nach Verdünnung mit Aqua dest. (1:10).

2.2.5.5 Zusammensetzung der Gele

	Trenngel				Sammelgel
	8%	10%	12%	14%	6%

Aqua dest.	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 µl	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	3,5 µl
SDS (20%)	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	-

Tabelle 8: Zusammensetzung der SDS-Trenngele und des Sammelgels.

2.2.5.6 Blotting

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 eingespannt. Die Proteine wurden bei 0,7 A in einer mit Transferpuffer gefüllten Trans-Blot®-Elektrophorese Transferkammer je nach Proteingröße 90-150 min lang auf die PVDF-Membran übertragen. Nach dem Transfer wurde die gleichmäßige Proteinauftragung und -übertragung durch Anfärben mit Ponceau S Lösung (1:20 in aqua dest. Verdünnt) und anschließendem Waschen mit aqua dest. überprüft.

2.2.5.7 Detektion der spezifischen Proteine

Für den immunologischen Nachweis der Proteine wurde die PVDF-Membran zunächst für 1 h mit 5% Milchpulver in Tris-gepufferter-Salzlösung (TBS-Tween) geblockt, um freie Bindungsstellen auf der Membran, an die die Antikörper unspezifisch binden könnten, abzudecken. Die Membran wurde anschließend über Nacht bei 4°C auf einem Wipptisch mit dem Erstantikörper inkubiert. Der Antikörper lag in der in Tabelle 6 genannten Konzentration in 5% Milchpulver in TBS-Tween vor. Um die Membran von nicht gebundenem Antikörper zu befreien, wurde sie mehrfach in TBS-Tween gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärintikörper in Blocklösung (1:2.000) inkubiert und danach erneut mehrfach in TBS-Tween gewaschen.

Zur Detektion wurde die Membran einige Sekunden mit ECL-Lösung inkubiert und anschließend zwischen zwei Folien in einer Filmkassette glatt gestrichen. In der Dunkelkammer wurde auf die Membran in der Filmkassette ein lichtsensitiver Film gelegt und bei der Umsetzung des Substrates an entsprechenden Stellen belichtet. Die Belichtungsdauer lag je nach Stärke des Signals zwischen einigen Sekunden bis zu mehreren Stunden. Danach wurde der Film aus der Kassette genommen und entwickelt.

2.2.5.8 Quantifizierung der Proteinmenge mit Hilfe der Dosimetrie

Zur densitometrischen Auswertung der Proteinbanden wurde der belichtete Film eingescannt. Die Filmschwärzung und damit die Proteinmenge auf der PVDF-Membran wurde mittels des Image J-Programmes analysiert. Die Bildauswertung mit Image J basiert auf einer Integration der Pixel-Grauwerte (8 Bit) mit der Bandenfläche (Graudichte). In der Regel wurde das Proteinlevel des entsprechenden Proteins bestimmt und auf das Level eines Referenzproteins (z.B. β -Aktin) normiert. Zusätzlich kann eine Normierung auf den einen bestimmten Zeitpunkt oder auf eine bestimmte Kontrollbedingung folgen.

2.2.6 Untersuchung der Radiosensibilität mittels Koloniebildungstest

Der Koloniebildungstest (KoBi) ist eine etablierte und häufig verwendete Methode zur Beurteilung des klonogenen Zellüberlebens nach Einwirkung verschiedener Noxen wie z.B. ionisierende Strahlung (Puck et al., 1956). Hat eine Zelle 5-6 Mitosen durchlaufen, was einer Koloniegröße von etwa 50 Zellen entspricht, so hat sie überlebt und proliferiert. Man spricht hierbei von klonogenem Überleben. Ausgezählt wurden demnach nur Kolonien mit 50 Zellen oder mehr.

Zur Messung des klonogenen Überlebens von A172- und U373-Zellen in Abhängigkeit des USP9x-Levels, wurden zunächst 3.500 A172-Zellen pro Well ausplattiert. Von den U373-Zellen wurden auf Grund der kürzeren Teilungsrate nur 1.500 Zellen pro Well ausgesät. Auf sechs 6-Well-Platten wurden Zellen ausgesät, die mit non-targeting siRNA transfiziert werden sollten (nt). Auf sechs weiteren 6-Well-Platten wurden Zellen ausgesät, die mit USP9x-siRNA transfiziert werden sollten (USP9xneg.). Anschließend wurden die insgesamt

zwölf 6-Well-Platten (jeweils pro A172 und U373) für 24 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die USP9xneg-Zellen wie in 2.2.2 beschrieben mit USP9x-siRNA und SiQuest® transfiziert. Die Kontrollzellen wurden parallel mit non-targeting siRNA und SiQuest® transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen nach folgendem Schema bestrahlt:

Jeweils eine 6-Well-Platte der mit nt- und USP9x-siRNA transfizierten Zellen wurden nicht bestrahlt (Kontrolle zur Ermittlung der Plattierungseffizienz). Die restlichen 6-Well Platten wurden dementsprechend mit 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy, 4 Gy oder 5 Gy bestrahlt. Alle Platten wurden anschließend im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Nach ca. 4-5 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Jeweils nach 12 Tagen (U373-Zellen) bzw nach 15 Tagen (A172-Zellen) wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 3,75% Formaldehyd 10 min lang fixiert, anschließend mit 10% Ethanol gewaschen und daraufhin mit Kristallviolett eine Stunde lang gefärbt. Dann wurden die 6-well-Platten mit Wasser gewaschen und getrocknet. Es wurde für jede Behandlung eine Sechsfachbestimmung durchgeführt.

Das relative Überleben der bestrahlten Zellen im Verhältnis zum Überleben der nicht bestrahlten Zellen wurde wie folgt berechnet:

Die „*plating efficiency*“ (PE) beschreibt die Koloniebildungsfähigkeit der unbestrahlten Zellen und wird berechnet durch den Quotient aus der Anzahl der gebildeten Kolonien (Mittelwert aus 6 Ansätzen) geteilt durch die Anzahl der ausgesäten Zellen.

Die „*survival fraction*“ (SF) bezeichnet die Überlebensfraktion, also das relative Überleben der behandelten Zellen im Verhältnis zum Überleben der unbehandelten Zellen. Sie wird berechnet als Quotient aus der Anzahl der gebildeten Kolonien nach Bestrahlung geteilt durch die Anzahl der ausgesäten Zellen, der anschließend auf die PE normiert wird.

Die Regressionskurve wurde mit Sigma Plot berechnet, einem Programm zur wissenschaftlichen Datenanalyse der Firma Systat Software Inc.

2.2.7 Mcl-1 Halbwertszeitmessung

Zur Ermittlung der Halbwertszeit von Mcl-1 wurden U373- und A172-Zellen in runden Zellkulturböden bis zu einer Konflueszenz von etwa 80% angezüchtet. Dann erfolgte der Zusatz des Translationshemmers Cycloheximid und

gleichzeitig die Lysierung der ersten Probe, des 0 Minuten-Wertes. Die A172-Zellen wurden im Abstand von 15, 30 und 45 min, die U373-Zellen im Abstand von 30, 60, 90 und 120 min nach Cycloheximidbehandlung von den Zellkulturböden abgelöst. Dazu wurden 200 µl Lysepuffer auf die Platten gegeben und mittels eines Zellschabers die Zellen von der Platte gelöst und schließlich das Lysepufferzellgemisch in Mikroreaktionsgefäße überführt und auf Eis gelagert. Danach wurden die Proben für 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Es erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Lysaten und die Einstellung der Proben auf die gleiche Proteinkonzentration. Die Lysate wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Mcl-1 und β -Aktin wurde mittels spezifischer Antikörper im Western Blot detektiert. Die densitometrisch ermittelten Schwärzungen der Mcl-1-Banden wurden mittels ImageJ bestimmt und in Relation zum 0-Minutenwert sowie in Relation zur β -Aktinbande berechnet. Aus diesen relativen Schwärzungen wurde mittels SigmaPlot eine Regressionskurve bestimmt. Die Halbwertszeit der Mcl-1-Abnahme wurde dabei durch die Anpassung der Exponentiellen Verfallsfunktion 1. Ordnung berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Proteinlevel verschiedener Mitglieder der Bcl-2-Familie in Glioblastomzelllinien

Vorarbeiten an Jurkatzellen zeigten, dass die Radiosensibilität maßgeblich von der Expression verschiedener Proteine der Bcl-2-Familie, insbesondere auch von Mcl-1 abhängig ist ((Alvarez et al., 2014) (Trivigno et al., 2012)). Weiter konnte eine Korrelation zwischen den Proteinlevel von Mcl-1 und USP9x festgestellt werden (Schwickart et al., 2010). Viele Tumore, insbesondere Hirntumore haben hohe Mengen an anti-apoptotischen Proteinen wie Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w ((Placzek et al., 2010) (Krajewski et al., 1997)). Im folgenden Versuch wurden mittels Westernblot (WB) die Proteinlevel verschiedener Mitglieder der Bcl-2-Familie in verschiedenen Glioblastomzelllinien und Jurkatzellen überprüft.

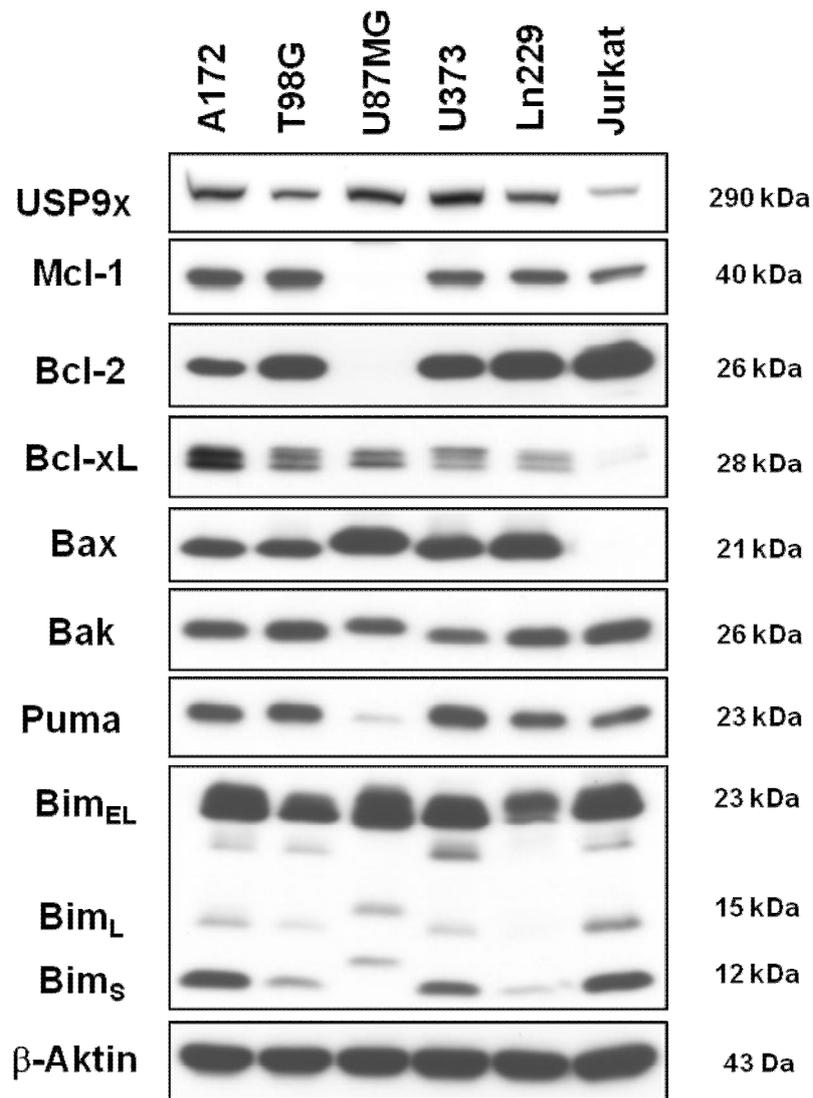


Abbildung 3: Bcl-2-Proteinlevel in Glioblastomzelllinien und Jurkatzellen: Die Glioblastomzelllinien A172, T98G, U87MG, U373, Ln229 und Jurkatzellen wurden lysiert. Folgende Proteine wurden mittels Westernblot detektiert: die Deubiquitinase USP9x, sowie die Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bak, Puma und Bim. Als Ladungskontrolle diente β -Aktin. Am rechten Bildrand sind die Proteingrößen in kDa angegeben.

In allen untersuchten Glioblastomzelllinien wurden höhere Proteinlevel der Deubiquitinase USP9x als in Jurkat-Zellen detektiert. Mit Ausnahme der U87MG-Zellen wurden in den anderen Glioblastomzellen gleichzeitig auch größere Mengen an Mcl-1 als in Jurkat-Zellen detektiert. Die Zellen unterschieden sich auch im Bcl-2- und Bcl-xL-Level. Während Bcl-xL in Jurkat-Zellen kaum nachweisbar war, wurde in A172-Zellen die höchste Abundanz an

Bcl-xL detektiert. Die Menge an Bcl-2 war in Jurkat-Zellen am höchsten, in T98G-, U373- und Ln229-Zellen etwas niedriger, in A172-Zellen deutlich niedriger und in U87MG-Zellen nicht detektierbar. Das pro-apoptotische Bak-Protein war in jeder Zelllinie nachweisbar, während das eng verwandte Bax in allen Glioblastomzellen, nicht hingegen in Jurkat-Zellen detektierbar war. Die Zelllinien wiesen auch unterschiedliche Mengen der BH-3-only-Proteine Puma und der drei Splicevarianten von Bim auf.

Da in dieser Arbeit Mcl-1 und seine Regulierung durch USP9x untersucht werden sollte, wählten wir für weitere Experimente die A172- und U373-Zellen, da diese hohe Level an Mcl-1 und USP9x aufwiesen. Auch die Abundanz der pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine waren in beiden Zelllinien ähnlich hoch. Die Glioblastomzelllinien unterschieden sich lediglich in den Bcl-2- und Bcl-xL-Level. In U373-Zellen war die Menge an Bcl-2 höher und das Bcl-xL-Level niedriger als in A172-Zellen.

3.2 Wirkung ionisierender Strahlung auf die Zelllinien A172 und U373

Im folgenden Kapitel wurde der Effekt ionisierender Strahlung auf die beiden Glioblastomzelllinien A172 und U373 untersucht. Trifft ionisierende Strahlung auf eukaryotische Zellen, können unterschiedliche Formen des Zelltodes ausgelöst werden (Apoptose, Autophagie, mitotische Katastrophe). Wir prüften zunächst durchflusszytometrisch den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$), das, wenn es zusammengebrochen ist, den Zelltod anzeigt. Da für diese Arbeit die Untersuchung der Apoptose von besonderer Bedeutung ist, bestimmten wir mittels Durchflusszytometrie und Westernblot zwei weitere für die Apoptose charakteristische Phänomene: Die DNA-Fragmentierung und die Caspasenaktivierung.

3.2.1 Ionisierende Strahlung induziert Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials in A172- und U373-Zellen

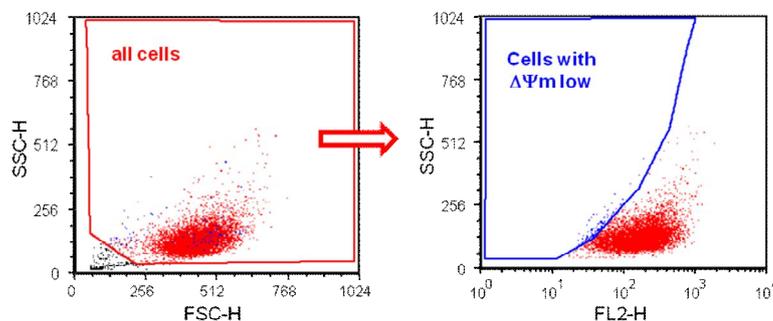
A172- und U373-Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und nach 72 h der Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ durchflusszytometrisch gemessen. Zellen mit zusammengebrochenem $\Delta\Psi_m$ befanden sich im $\Delta\Psi_m$ -low-Bereich im Dotblot (Abbildung 4 und 5, rechte Dotblots). Die rechten Dotblots in Abbildung 4 und

Abbildung 5 zeigen jeweils eine Messung des $\Delta\Psi_m$ in A172- bzw. U373-Zellen 72 h nach Bestrahlung mit 10 Gy (unterer, rechter Dotplot) sowie die dazugehörigen Messungen des $\Delta\Psi_m$ der unbestrahlten Kontrollzellen (oberer, rechter Dotplot). Nach Bestrahlung weisen sowohl A172- als auch U373-Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen wesentlich mehr Zellen im $\Delta\Psi_m$ low-Bereich auf. In Abbildung 6 ist der $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch von A172 und U373 nach Bestrahlung quantitativ dargestellt. Vergleicht man beide Zelllinien, findet man nach Bestrahlung wesentlich mehr U373-Zellen als A172-Zellen mit zusammengebrochenem $\Delta\Psi_m$. 72 h nach Bestrahlung weisen ca. 12% der bestrahlten A172-Zellen ein zusammengebrochenes $\Delta\Psi_m$ auf, während es zum gleichen Zeitpunkt bereits über 50% der U373-Zellen tun. Die Ergebnisse zeigen, dass ionisierende Strahlung in U373-Zellen einen stärkeren Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ induziert als in A172-Zellen. U373-Zellen induzieren besser den Zelltod nach Bestrahlung als A172-Zellen.

A172

Gate 1
Gate 2

0 Gy



10 Gy
(72h)

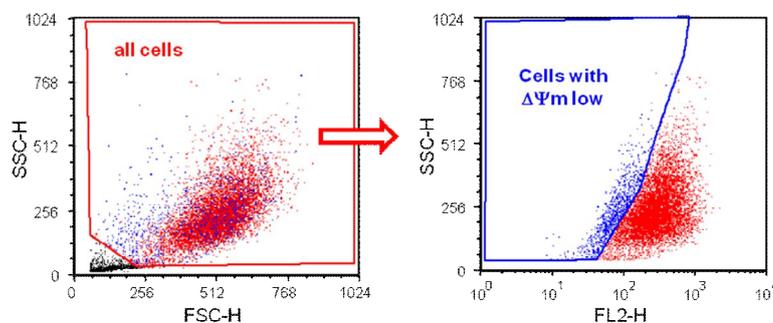


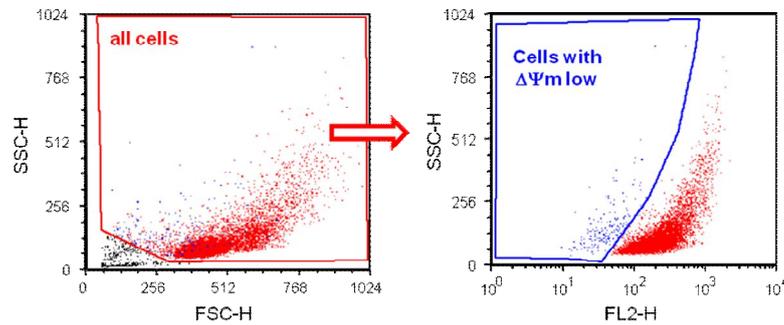
Abbildung 4: Bestrahlung führt zum Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ in A172 Zellen. Die Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und nach 72 h mit TMRE gefärbt. Anschließend wurde der Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ durchflusszytometrisch analysiert. Zum Vergleich dienten

unbestrahlte Kontrollen (0 Gy). Dieses Histogramm zeigt, wie bei der Auswertung die Gates gesetzt wurden, um die Zellen im $\Delta\Psi_m$ -low Bereich (blau) zu erfassen. Zunächst wurde die Zellpopulation bestimmt (linke Dotplots). Das $\Delta\Psi_m$ dieser ausgewählten Zellen wurde im rechten Dotplot analysiert, in dem die TMRE-Fluoreszenzintensität (gemessen in FL2-H) gegen die Granularität (Seitwärtsstreuung SSC-H) aufgetragen wurde. Ohne Bestrahlung (0 Gy) befinden sich nur vereinzelt Zellen im $\Delta\Psi_m$ -low Bereich. 72h nach Bestrahlung mit 10 Gy befinden sich 15% der Zellen im $\Delta\Psi_m$ -low Bereich.

U373

Gate 1
Gate 2

0 Gy



10 Gy

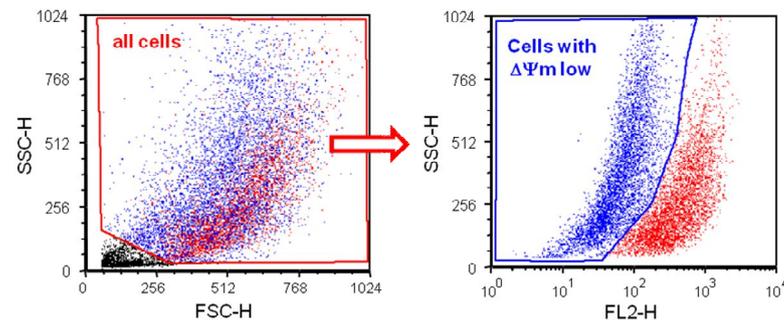


Abbildung 5: Bestrahlung führt zum Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ in U373 Zellen. Die Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und nach 72 h mit TMRE gefärbt. Anschließend wurde der Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ durchflusszytometrisch gemessen. Zum Vergleich dienten unbestrahlte Kontrollen (0 Gy). Dieses Histogramm zeigt, wie bei der Auswertung die Gates gesetzt wurden, um die Zellen im $\Delta\Psi_m$ -low Bereich (blau) zu erfassen. Ohne Bestrahlung (0 Gy) befinden sich nur vereinzelt Zellen im $\Delta\Psi_m$ -low Bereich. 72h nach Bestrahlung mit 10 Gy befinden sich 50% der Zellen im $\Delta\Psi_m$ -low Bereich.

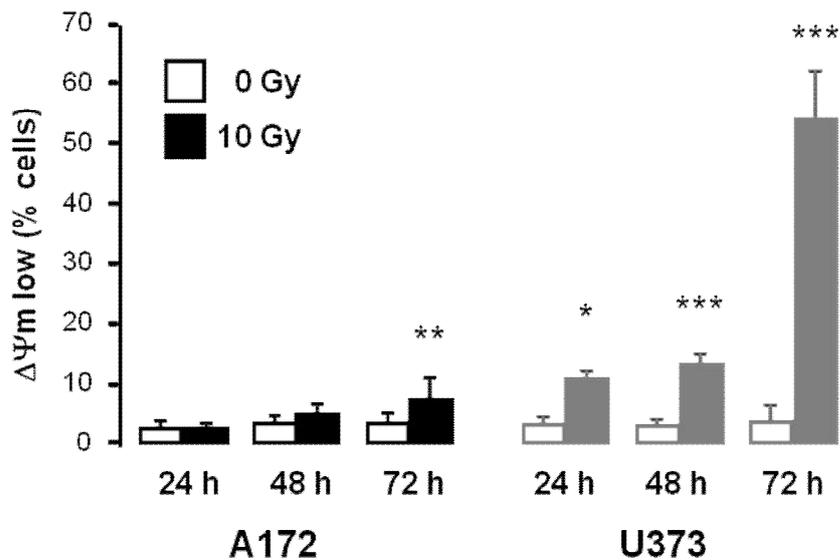


Abbildung 6: Quantifizierung des $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruchs von A172 und U373 im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung mit 10 Gy. Hierfür wurden die A172- und U373-Zellen mit 10 Gy bestrahlt und nach 24, 48 und 72 h mit TMRE gefärbt. Anschließend wurde der Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ durchflusszytometrisch gemessen. Als Kontrolle dienten unbestrahlte Zellen (0 h nach Bestrahlung). Die U373 reagieren bereits nach 24 h mit Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$, welcher sich 48 und 72 h nach Bestrahlung noch deutlich erhöhte. Bei den A172 fällt der Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ weniger stark aus. (Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n = 6, *** = p<0,001, ** = p<0,01, * = p<0,05, zweiseitiger Welch-korrigierter t-Test, statistischer Vergleich erfolgte zu den jeweiligen unbestrahlten Werten).

3.2.2 Ionisierende Strahlung induziert DNA-Fragmentierung in A172- und U373-Zellen

Um den Zelltod näher zu charakterisieren, wurde die DNA-Fragmentierung durchflußzytometrisch analysiert. Die fragmentierte DNA kann als ein apoptotischer Marker verwendet werden. Um die Apoptoserate zu bestimmen, wurden die A172- und U373- Zelllinien zunächst mit 10 Gy bestrahlt. 72 h nach Bestrahlung wurden die Zellen permeabilisiert, mit PI gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Die DNA-Degradierung wurde über die Menge an Zellen im subG₁-Bereich quantifiziert (Abbildung 7, 8). Abbildung 7 zeigt, wie in der Auswertung die Gates für den subG₁-Bereich gesetzt wurden. Es ist deutlich zu erkennen, dass 72 h nach Bestrahlung bei vielen der U373-Zellen die DNA fragmentiert wurde (viele counts in subG₁), wohingegen bei den A172

kaum DNA-Fragmentierung nachzuweisen war (wenige Counts in subG1). Abbildung 8 zeigt die Zunahme der DNA-Fragmentierung in A172- und U373-Zellen in zeitlicher Abhängigkeit jeweils 24, 48 und 72 h nach Bestrahlung. Bei den U373-Zellen zeigte sich bereits 24 h nach Bestrahlung eine leichte Zunahme der subG₁-Population. 48 h nach Bestrahlung ist ein stärkerer Anstieg der subG₁-Zellfraktion zu beobachten. Nach 72 h weisen fast 40% der U373-Zellen fragmentierte DNA auf. Im Gegensatz dazu fragmentierten die A172-Zellen kaum DNA nach Bestrahlung (Abb.8).

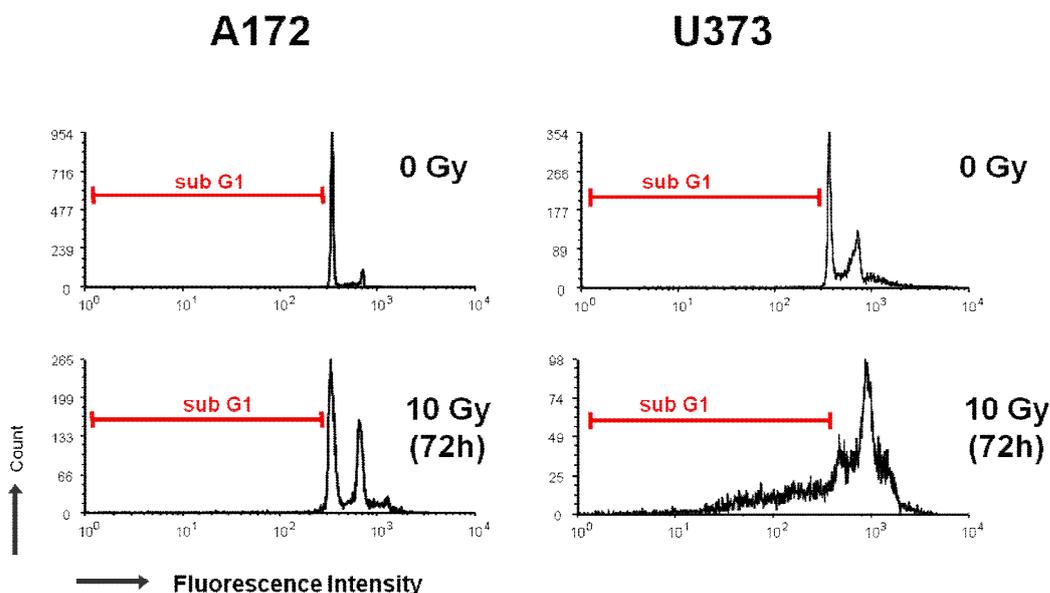


Abbildung 7: Ionisierende Strahlung führt zu einem Anstieg der subG₁-Fraktion von A172- und U373-Zellen. Die Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt, nach 72 h permeabilisiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Mit Hilfe des FACS wurde die Menge an Zellen in subG₁ gemessen. Zum Vergleich dienten unbestrahlte Kontrollen (0Gy). Dieses Histogramm zeigt, dass viele A172-Zellen 72 h nach Bestrahlung in einen G₂-Arrest gehen. Die U373-Zellen hingegen induzieren 72 h nach Bestrahlung eine deutliche DNA-Degradierung (viele Zellen in subG₁).

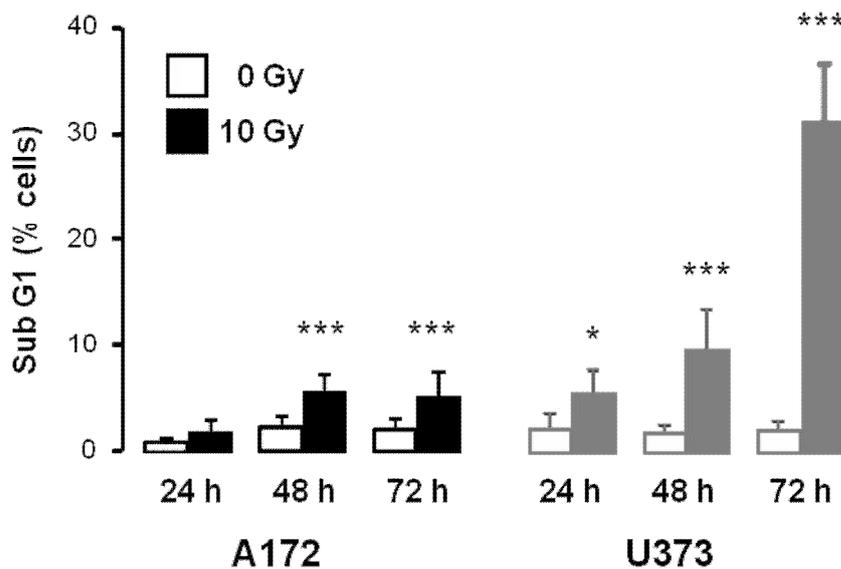


Abbildung 8: Quantifizierung der DNA-Degradierung in A172- und U373-Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy im zeitlichen Verlauf. Dafür wurden die A172- und U373-Zellen mit 10 Gy bestrahlt. 24, 48 und 72 h später wurden die Zellen permeabilisiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Anschließend wurde die Menge an Zellen im subG₁-Bereich quantifiziert. Ionisierende Strahlung induziert starke DNA-Degradierung in U373-Zellen, aber kaum in A172-Zellen. (Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n = 6, *** = p<0,001, * = p<0,05, zweiseitiger Welch-korrigierter t-Test, statistischer Vergleich erfolgte zu den jeweiligen unbestrahlten Werten).

3.2.3 Ionisierende Strahlung aktiviert die Caspasenkaskade in U373-Zellen

Um den Zelltod genauer zu charakterisieren wurde die Aktivierung der Effektorcaspasen, die charakteristisch für die Apoptose ist, in A172- und U373-Zellen untersucht. Um zu überprüfen, ob eine strahleninduzierte Caspasenaktivierung in A172- und U373-Zellen erfolgte, wurde die proteolytische Spaltung der Caspase-3 und des Caspase-3-Substrates PARP mittels Westernblot analysiert (Abbildung 9). Hierbei wurden A172- und U373-Zellen mit 10 Gy bestrahlt und nach jeweils 24, 48 und 72 h lysiert. Mittels Westernblot wurden Caspase-3- und das Caspase-3-Substrat PARP detektiert. In den A172-Zellen konnten auch 72 h nach Bestrahlung keine Caspasenspaltrfragmente (17/19 kDa) detektiert werden. Ebenso blieb das Caspase-3-Substrat PARP ungespalten. In den U373-Zellen hingegen war bereits nach 48 h eine leichte und nach 72 h eine starke Caspase-3-

Prozessierung zu beobachten. Parallel dazu war bereits nach 48 h das 89 kDa große PARP-Spaltfragment zu detektieren, das nach 72 h ebenso wie die Caspase-3-Fragmente zunahm.

Diese Untersuchungen zeigen, dass U373-Zellen nach Bestrahlung Caspase-3 aktivieren, während A172-Zellen dies nicht tun.

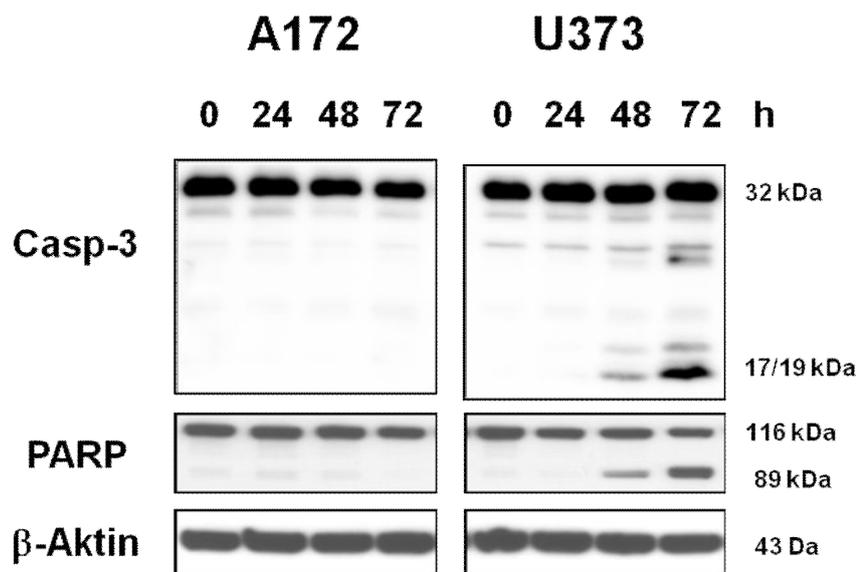


Abbildung 9: Westernblot als Nachweis von Caspasenaktivierung und PARP-Spaltung in A172- und U373-Zellen nach Bestrahlung. A172 (linke Hälfte) und U373 (rechte Hälfte) wurden jeweils 24, 48 und 72 h nach Bestrahlung mit 10 Gy lysiert. Diese Lysate wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Caspase-3- (Casp-3) und PARP-Spaltung wurden mittels Westernblot analysiert. β -Aktin diente als Ladungskontrolle. Ionisierende Strahlung induziert Caspase-3-Aktivierung in U373-Zellen, nicht aber in A172-zellen.

3.3 Proteinlevel von Mitgliedern der Bcl-2-Familie in A172- und U373-Zellen nach Bestrahlung

Ionisierende Strahlung induziert Apoptose über den mitochondrialen Signalweg, der von Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie reguliert wird. Deshalb wurde der Effekt von Bestrahlung auf die Level der pro- und anti-apoptotischen Proteine in A172- und U373-Zellen analysiert. Hierzu wurden beide Zellen zunächst mit 10 Gy bestrahlt. Anschließend wurden sie jeweils nach 24, 48 und 72 h lysiert. Die Proteinlysate wurden mittels Westerblot-Technik analysiert (Abb. 10).

In beiden Zellen konnte keine Änderung der Proteinlevel der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL festgestellt werden. Auch die Level der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak änderten sich nicht nach Bestrahlung.

Allein das Mcl-1-Level nahm 48 h und 72 h nach Bestrahlung in U373-Zellen, jedoch nicht in A172-Zellen, ab. Die fehlende Abnahme von Mcl-1 in A172-Zellen könnte demzufolge das Überleben der Zellen nach Bestrahlung begünstigen.

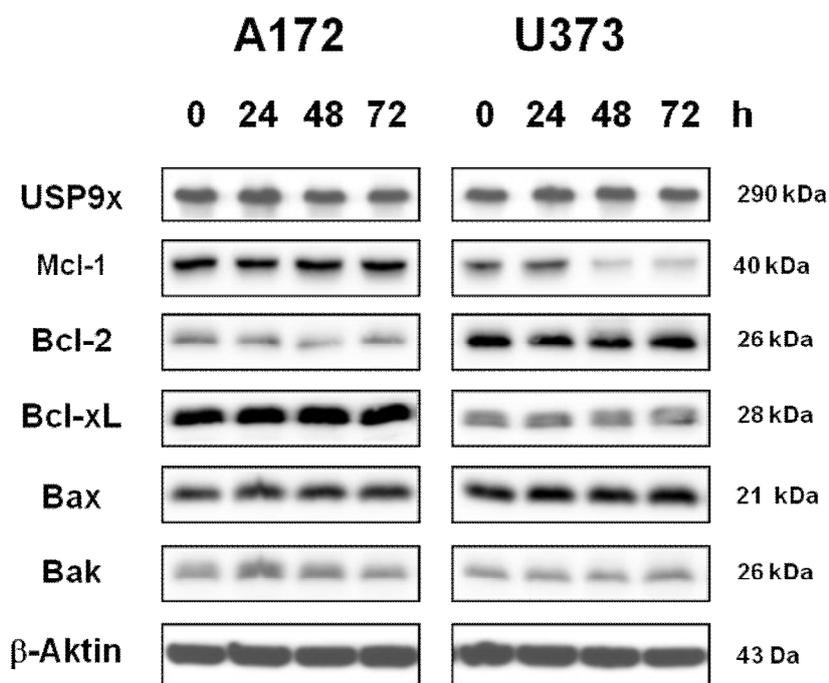


Abbildung 10: Veränderungen der Proteinlevel der Bcl-2-Familie nach Bestrahlung mit 10 Gy.

A172- und U373-Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt. Nach 24, 48 und 72 h wurden die Zellen lysiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Im Westernblot wurden unterschiedliche Proteine der Bcl-2-Familie (Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bak) detektiert. Als Ladungskontrolle diente β-Aktin. Bei den A172 führte eine Bestrahlung zu keiner Veränderung der Proteinmenge der verschiedenen untersuchten Proteine. Bei U373 kam es nach 48 und 72 h zu einer Abnahme von Mcl-1.

3.4 Analyse der Halbwertszeit von Mcl-1 in A172- und U373-Zellen

Das anti-apoptotische Protein Mcl-1 wird in Glioblastomen und anderen Tumorentitäten häufig überexprimiert und stellt einen Strahlenresistenzfaktor dar (Li et al., 2013; Trivigno et al., 2012). Die Expression von Mcl-1 wird durch unterschiedliche Mechanismen translational und post-translational reguliert. Kürzlich publizierte Daten zeigen, dass insbesondere die post-translationale Regulierung der Mcl-1-Stabilität zu erhöhten Proteinlevel und besserem

Überleben nach Bestrahlung führen könnten (Schwickart et al., 2010; Trivigno et al., 2012). Im folgenden Experiment wird die Mcl-1-Stabilität in A172- und U373-Zellen untersucht. Dafür wurden unbestrahlte und mit 10 Gy bestrahlte Zellen mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid für bestimmte Zeit behandelt. Die Zellen wurden anschließend lysiert. Die Proteinlevel von Mcl-1 wurden danach per Westernblot analysiert. Daraus wurde die Mcl-1- Halbwertszeit (HWZ) ermittelt (Abb. 11).

Die ermittelte HWZ von Mcl-1 in A172-Zellen lag bei $t_{1/2} = 90,1 \pm 23,7$ min. In den U373-Zellen lagen sie bei $t_{1/2} = 73,5 \pm 11,0$ min. Mcl-1 ist also in A172-Zellen zumindest tendenziell stabiler als in U373-Zellen.

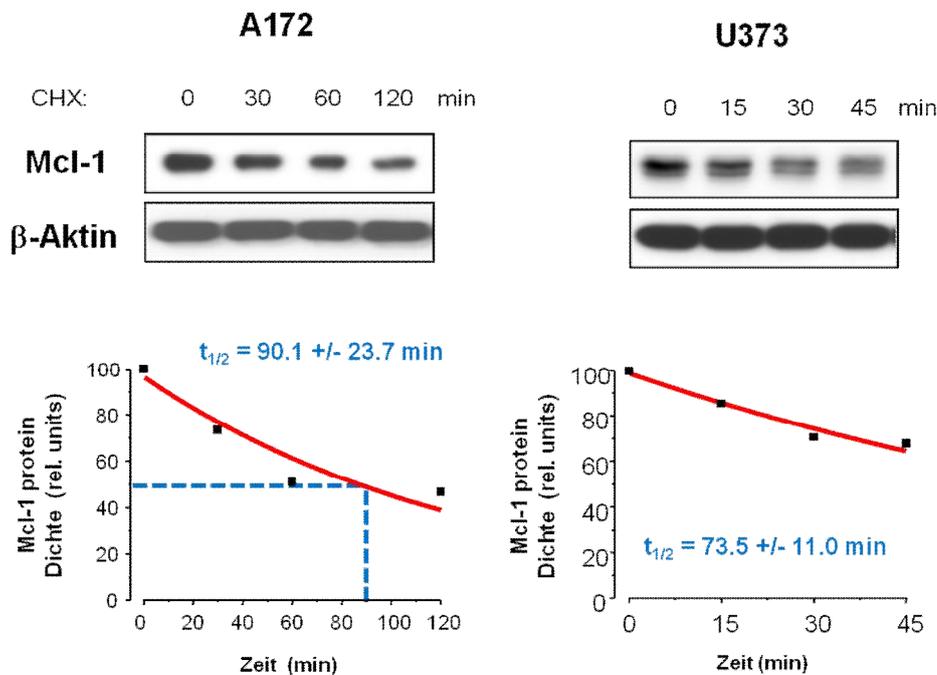


Abbildung 11: Mcl-1-HWZ in A172 und U373. A172- und U373-Zellen wurden mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) behandelt. Im Anschluss wurden die A172-Zellen nach jeweils 0, 30, 60 und 120 min, die U373-Zellen nach jeweils 0, 15, 30, und 45 min lysiert. Mittels Westernblot (11a, oben) wurde Mcl-1 detektiert. Als Ladungskontrolle diente β -Aktin. Die Mcl-1-Konzentration wurde densitometrisch gemessen und auf β -Aktin normiert. Die unteren Abbildungen zeigen die relative Mcl-1-Abnahme aufgetragen gegen die Zeit. In A172-Zellen hat Mcl-1 eine längere Halbwertszeit ($t_{1/2}$) als in U373-Zellen.

3.5 Konzentration von Mcl-1 korreliert mit der Konzentration von USP9x in A172- und U373-Zellen

Eine frühere Publikationen zeigte, dass Mcl-1-Level mit der Menge der Deubiquitinase USP9x in Lymphomzelllinien korrelierten (Schwickart et al., 2010). USP9x ist in der Lage, Mcl-1 zu deubiquitinieren und zu stabilisieren. Es wurde im Folgenden näher untersucht, da es auch in Glioblastomzelllinien häufig überexprimiert ist.

Zunächst wurde das USP9x-Proteinlevel nach Bestrahlung mit Westernblot-Technik analysiert. Abbildung 12 zeigt, dass sich die USP9x-Menge weder in A172-Zellen noch in U373-Zellen nach Bestrahlung änderte.

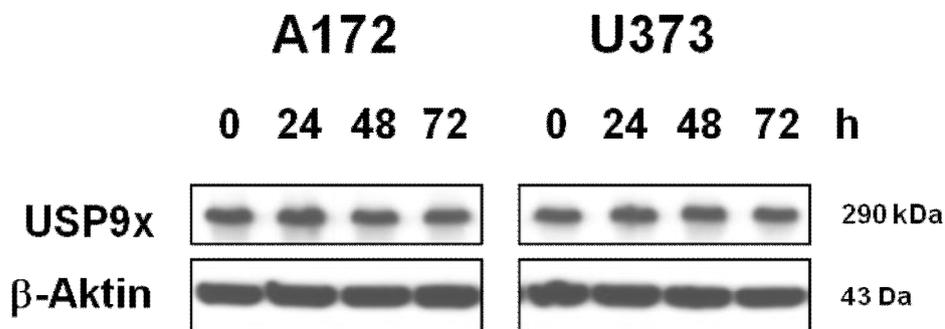


Abbildung 12: USP9x-Level in A172- und U373-Zellen nach Bestrahlung. A172- und U373-Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und anschließend nach 24, 48 und 72 h lysiert. Mittels Westernblot wurden die Menge an USP9x untersucht. Es zeigte sich in beiden Zellen keine Veränderung der USP9x-Level nach Bestrahlung.

Allerdings kann nicht nur das Proteinlevel sondern auch die Aktivität von USP9x Wirkung auf die Mcl-1-Stabilität haben. Um zu prüfen, ob USP9x überhaupt eine Wirkung auf Mcl-1 und auf das Zellüberleben hat, wurde das Enzym in den beiden Glioblastomzelllinien mit Hilfe von RNA-Interferenz herunterreguliert. Dazu wurde USP9x in A172- und U373-Zellen mit USP9x-siRNA oder der unspezifischen „non-targeting“ (nt)-siRNA herunterreguliert. Mittels Westernblot wurde die Mcl-1-Abundanz nach der Transfektion untersucht (Abb.13).

Im Westernblot zeigte sich, dass nach der Transfektion mit der spezifischen siRNA im Vergleich zur Transfektion mit der unspezifischen nt-siRNA das Proteinlevel von USP9x in beiden Zelllinien stark herunterreguliert wurde. In den A172-Zellen auf 19%, in den U373-Zellen auf 9% der Zellen die mit nt-siRNA behandelt wurden. In den A172-Zellen führte die Herunterregulierung

von USP9x zu einem Absinken des Mcl-1-Levels auf 60% des nt-Wertes. In den U373-Zellen hingegen blieb die Menge an Mcl-1 nach USP9x-Herunterregulierung stabil (108% des nt-Wertes). Das Mcl-1-Level in A172-Zellen, nicht aber in U373-Zellen, wurden also durch USP9x beeinflusst.

Weiterhin wurde untersucht, ob Mcl-1 einen Einfluss auf die USP9x-Abundanz in A172- und U373-Zellen haben (Abb. 13). Dazu wurde Mcl-1 mittels siRNA in A172- und U373-Zellen herunterreguliert. In A172- bzw. U373-Zellen wurde durch die Transfektion mit Mcl-1-siRNA die Mcl-1-Abundanz auf 7% bzw. 28% der mit nt-siRNA transfizierten Kontrollzellen herunterreguliert. Die Herunterregulierung von Mcl-1 hatte kaum (77% des Kontrollwertes bei A172) bzw. keinen (99% des Kontrollwertes bei U373) Einfluss auf die USP9x-Level. Die Ergebnisse zeigen, dass USP9x das Proteinlevel von Mcl-1 in A172-Zellen regulierte, aber Mcl-1 keinen Einfluss auf die Regulierung von USP9x hat.

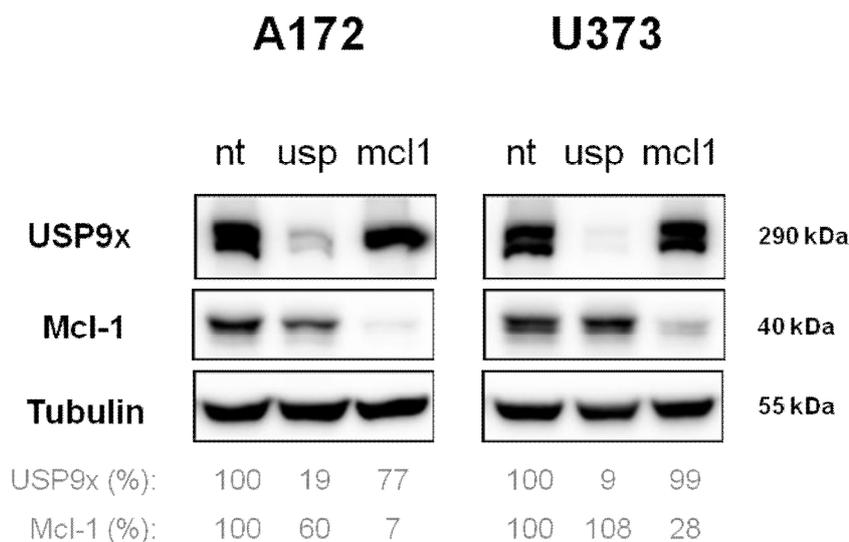


Abbildung 13: Herunterregulation von Mcl-1 und USP9x in A172- und U373-Zellen. USP9x und Mcl-1 wurden mittels siRNA-Transfektion in A172- und U373-Zellen herunterreguliert. Die Kontrollzellen wurden mit einer unspezifischen „non-targeting“ (nt)-siRNA transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurden die Lysate hergestellt. Mittels Westernblot wurden die USP9x- und die Mcl-1-Level überprüft, densitometrisch ausgewertet und in Prozent der Kontrollwerte (nt) angegeben. Als Ladungskontrolle und Referenzwert diente Tubulin. In A172-Zellen, nicht aber in U373-Zellen, hatte die Herunterregulierung von USP9x eine Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels zur Folge. Umgekehrt hatte eine Abnahme der Mcl-1-Level keine Auswirkungen auf die USP9x-Abundanz in A172 und U373-Zellen.

3.6 Die Bedeutung von Mcl-1 für das Überleben von A172- und U373-Zellen

Die Experimente in 3.6 sowie in 3.7 waren alle gleichermaßen aufgebaut. Folgende Grafik (Abb.14) soll den Versuchsaufbau verdeutlichen. Jedes Experiment begann mit einer Ausplattierung von A172- und U373-Zellen auf 6-Well-Platten. Nach 24 h wurden die Zellen in den 6-Well-Platten mittels siRNA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen jeweils 48, 72, 96 und 120 h nach Transfektion durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrollen dienten immer Zellen, die mit non-targeting (nt)-siRNA transfiziert wurden.

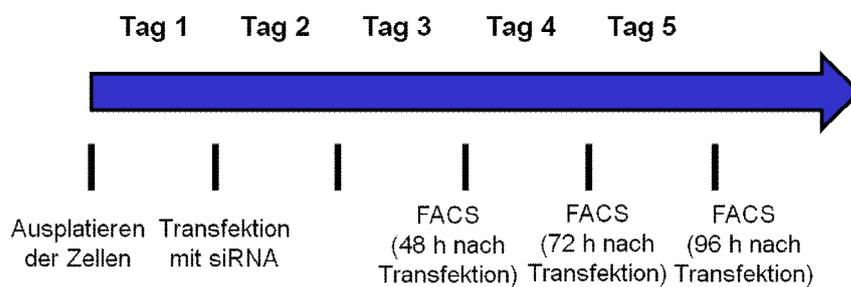


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus in 3.6 und 3.7. Alle Versuche waren nach dem gleichen Prinzip aufgebaut. An Tag 1 wurden die A172- und U373-Zellen auf 6-Well-Platten ausplattiert. An Tag 2 wurde USP9x bzw. Mcl-1 mittels siRNA in A172 und U373-Zellen herunterreguliert. Durchflusszytometrische Auswertungen (FACS) und Lysate für Westernblots folgten 48, 72 und 96 nach Transfektion.

3.6.1 Herunterregulierung von Mcl-1 führt zu Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ in A172- und U373-Zellen

In folgendem Experiment wurde untersucht, welchen Einfluss Mcl-1 auf das Überleben von A172- und U373-Zellen hat. Dazu wurde Mcl-1 in A172- und U373-Zellen mittels siRNA herunterreguliert. 48 und 72 h nach Transfektion wurden die Zellen mit TMRE gefärbt und der Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ durchflusszytometrisch gemessen. Als Kontrolle wurden A172- und U373-Zellen mit non-targeting siRNA transfiziert (nt). Bereits 48 h nach Transfektion brach bei über 30% der A172-Zellen das $\Delta\Psi_m$ zusammen. Nach 72 h waren es fast 40%. Bei den nt-Kontrollen blieb der Anteil an Zellen mit zusammengebrochenem $\Delta\Psi_m$ unter 10%. Bei den U373-Zellen wiesen nach 48 h 18% ein zusammengebrochenes $\Delta\Psi_m$ auf. Nach 72 h war dies bei fast 30% der Zellen der Fall.

Eine Herunterregulierung von Mcl-1 führte also sowohl in den A172- als auch in den U373-Zellen zu einem signifikant erhöhten Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ und somit zu einem signifikant erhöhten Zelltod.

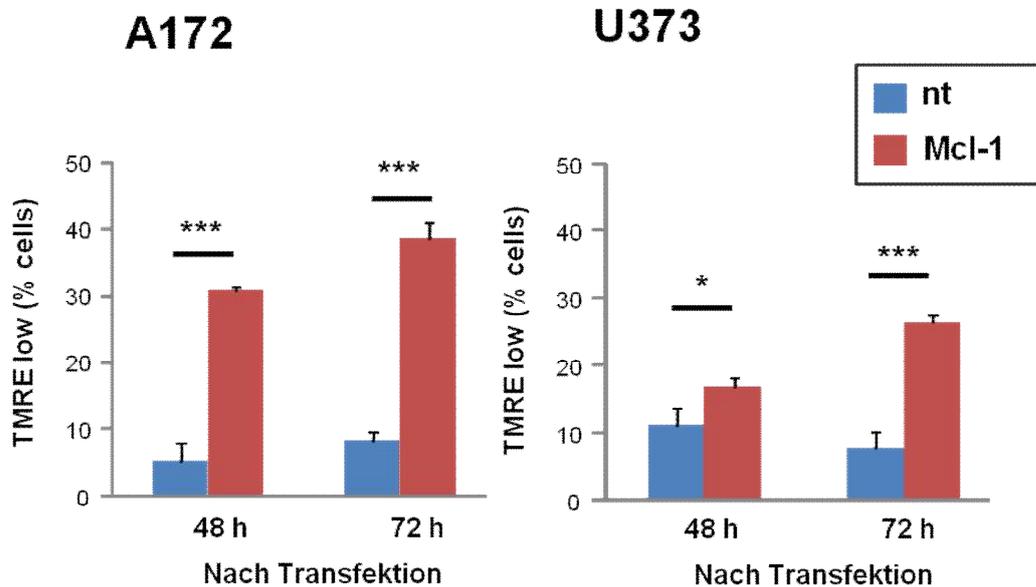


Abbildung 15: Herunterregulierung von Mcl-1 führt zum Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ in A172- und U373-Zellen. Mittels siRNA wurde Mcl-1 in A172- und U373-Zellen herunterreguliert (rot, Mcl-1). 48 und 72 h nach Transfektion (x-Achse) wurden die Zellen mit TMRE gefärbt. Es wurde der prozentuale Anteil an Zellen durchflusszytometrisch gemessen, deren $\Delta\Psi_m$ zusammengebrochen war (y-Achse). Als Kontrollen wurden A172- und U373-Zellen mit non-targeting siRNA transfiziert (blau, nt). Der Verlust von Mcl-1 führte zu einem erhöhten Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ in A172- und U373-Zellen (Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n = 6, *** = p<0,001, * = p<0,05, zweiseitig Welch-korrigierter t-Test).

3.6.2 Herunterregulierung von Mcl-1 führt zu DNA-Fragmentierung in A172- und U373-Zellen

In folgendem Versuch sollte geprüft werden, ob niedrige Mcl-1-Level auch eine verstärkte DNA-Fragmentierung in A172- und U373-Zellen zur Folge haben. Das Experiment hatte den gleichen Aufbau wie in 3.6 Herunterregulierung von Mcl-1 führt zu Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ in A172- und U373-Zellen beschrieben. Diesmal wurde die Zellmembran jedoch permeabilisiert und mit Propidiumiodid gefärbt, um die DNA-Fragmentierung und somit die Apoptoseinduktion nach Herunterregulierung von Mcl-1 zu bestimmen.

Besonders in den A172-Zellen führte die Herunterregulierung von Mcl-1 mittels siRNA zu einem extremen Anstieg der DNA-Fragmentierung. Im Vergleich zu den mit nt-siRNA transfizierten Kontrollzellen wiesen über 30% der mit Mcl-1-siRNA transfizierten Zellen fragmentierte DNA 48 h nach Transfektion auf. Nach 72 h waren es über 40%. Die Kontrollen blieben bei unter 5%, sowohl 48 h als auch 72 h nach Transfektion. Die Herunterregulierung von Mcl-1 in A172-Zellen führte im Vergleich zu den Kontrollen sowohl 48 h als auch 72 h nach Transfektion zu einer signifikanten Erhöhung der DNA-Fragmentierung und somit zur Apoptose.

Bei den U373-Zellen mit niedrigem Mcl-1-Level befanden sich 48 h nach Transfektion 11% im subG₁-Bereich. Bei den Kontrollen waren es 8%. Bei den Zellen mit niedrigem Mcl-1-Level stieg der Anteil an Zellen im subG₁-Bereich nach 72 h auf über 13% (Abbildung 16). Sowohl in A172- als auch in U373-Zellen führte die Herunterregulierung von Mcl-1 48 und 72 h nach Transfektion zu einer signifikant erhöhten DNA-Fragmentierung. Von den U373-Zellen induzierten nur knapp 10% der Zellen die Fragmentierung der DNA, bei den A172 waren es nach 72 h über 40%.

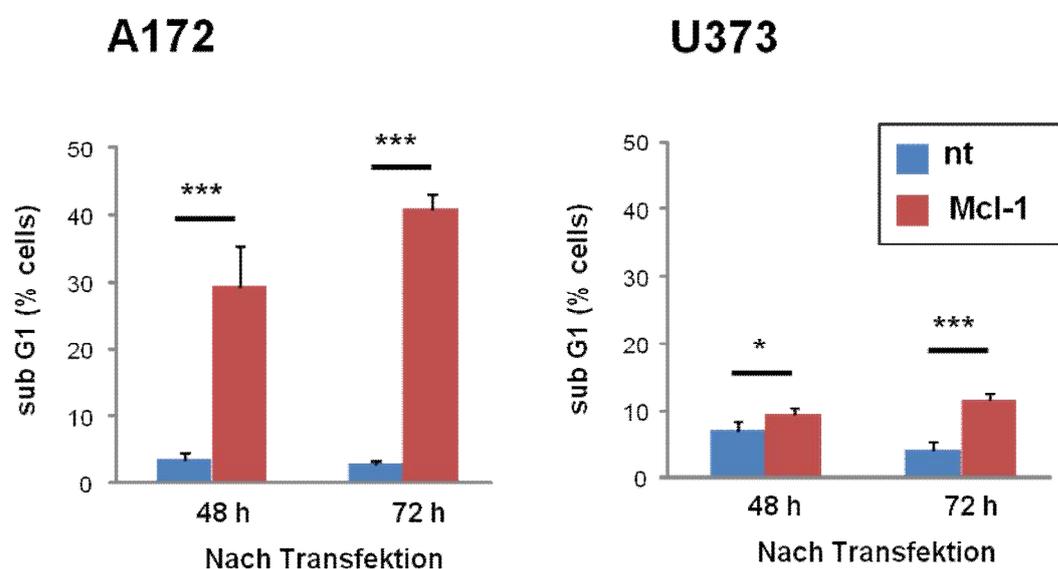


Abbildung 16: Herunterregulierung von Mcl-1 führt zu einer Zunahme an DNA-Fragmentierung in A172- und U373-Zellen. Mittels siRNA wurde Mcl-1 in A172- und U373-Zellen herunterreguliert (rot, Mcl-1). 48 und 72 h nach Transfektion (x-Achse) wurden die Zellen permeabilisiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Durchflusszytometrisch wurde der prozentuale Anteil an Zellen gemessen, deren DNA fragmentiert war. (y-Achse). Als Kontrollen wurden

A172- und U373-Zellen mit non-targeting siRNA transfiziert (blau, nt). Niedrige Mcl-1-Level führten zu mehr DNA-Fragmentierung insbesondere in A172-Zellen (Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n = 6, *** = $p < 0,001$, * = $p < 0,05$, zweiseitiger Welch-korrigierter t-Test).

3.7 Die Bedeutung von USP9x für das Überleben von A172- und U373-Zellen

3.7.1 Herunterregulierung von USP9x führt zu Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ in A172- und U373-Zellen

In folgendem Experiment wurde die Bedeutung von USP9x für das Überleben von A172- und U373-Zellen untersucht. Das Experiment hatte den gleichen Aufbau wie in 3.6 Abb.14 beschrieben. Zunächst wurde USP9x mittels siRNA herunterreguliert. Anschließend wurden die Zellen jeweils 48, 72 und 96 h nach Transfektion mit TMRE gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Als Kontrollen dienten mit non-targeting siRNA behandelte Zellen (nt).

Mit USP9x-siRNA transfizierte A172-Zellen wiesen viel mehr zusammengebrochenes $\Delta\Psi_m$ auf als die mit nt-siRNA transfizierten Kontrollzellen. Der Anteil stieg von 20% nach 48 h auf knapp 40% 96 h nach der Transfektion. Bei den Kontrollen (nt) blieb unabhängig vom Zeitwert die Anzahl der Zellen mit zusammengebrochenem $\Delta\Psi_m$ unter 10%.

Bei den U373-Zellen wiesen nach Herunterregulierung von USP9x unabhängig vom Zeitpunkt nach Transfektion ca. 15% der Zellen ein zusammengebrochenes $\Delta\Psi_m$ auf. Bei den nt-transfizierten Kontrollzellen blieb der Wert unabhängig vom Zeitpunkt unter 10%.

Sowohl die A172- als auch die U373-Zellen reagieren auf eine Herunterregulierung von USP9x mit einem signifikant erhöhten Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$. Von den U373-Zellen reagieren nur knapp über 10% der Zellen mit Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$, bei den A172 sind es nach 96 h über 30%. Die Herunterregulierung von USP9x führte insbesondere in den A172-Zellen zu einem erhöhten Zelltod.

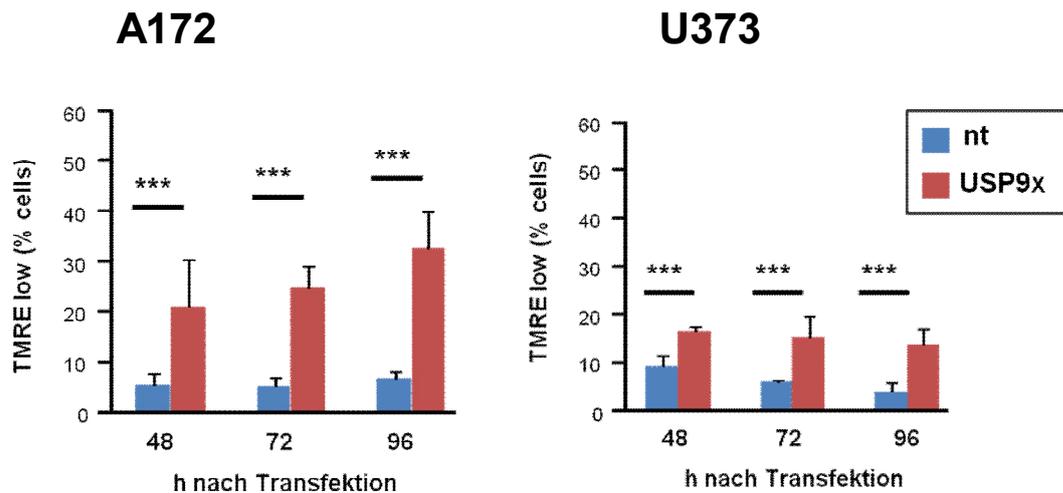


Abbildung 17: Herunterregulierung von USP9x führt zum Zusammenbruch des $\Delta\Psi$ m in A172- und U373-Zellen. Mittels siRNA wurde USP9x in A172- und U373-Zellen herunterreguliert (rot, USP9x). 48, 72 und 96 h nach Transfektion (x-Achse) wurden die Zellen mit TMRE gefärbt. Durchflusszytometrisch wurde der prozentuale Anteil an Zellen gemessen, deren $\Delta\Psi$ m zusammengebrochen war (y-Achse). Als Kontrollen wurden A172- und U373-Zellen mit non-targeting siRNA transfiziert (blau, nt). Die Herunterregulierung von USP9x führte vor allem in A172-Zellen zu einem erhöhten Zusammenbruch des $\Delta\Psi$ m. (Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n = 6, *** = p<0,001, zweiseitiger Welch-korrigierter t-Test).

3.7.2 Herunterregulierung von USP9x führt zu DNA-Fragmentierung in A172- und U373-Zellen

In 3.7.1 wurde gezeigt, dass eine Herunterregulierung von USP9x vor allem in A172- und weniger in U373-Zellen zu vermehrtem Zelltod führt. In diesem Versuch wurde nun untersucht, ob die Apoptose als eine spezielle Form des Zelltods durch die Herunterregulierung von USP9x verändert wurde. Der Versuchsaufbau war wie in 3.6 Abb. 14 beschrieben. USP9x wurde mittels siRNA in A172- und U373-Zellen herunterreguliert. Zu entsprechenden Zeitpunkten nach der Transfektion wurden die Zellen permeabilisiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Die DNA-Fragmentierung wurde durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrollen dienten auch hier A172- und U373-Zellen, die mit non-targeting siRNA transfiziert wurden (nt).

48 h nach Herunterregulierung von USP9x wiesen 35% der A172-Zellen fragmentierte DNA auf. Dieser Anteil nahm mit der Zeit nach Transfektion weiter

zu und nach 120 h hatten über 50% der Zellen fragmentierte DNA. Der Anteil der mit nt-siRNA transfizierten Kontroll-Zellen war unabhängig vom Zeitpunkt nach Transfektion unter 5%.

In den U373-Zellen induzierte die Herunterregulierung von USP9x kaum eine DNA-Fragmentierung. Der mittlere Anteil der mit USP9x-siRNA transfizierten Zellen war unter 10%, während dieser Anteil in den mit nt-siRNA transfizierten Kontrollzellen bei unter 5% lag.

Die Herunterregulierung von USP9x resultierte vor allem in A172-Zellen in einer massiven DNA-Fragmentierung.

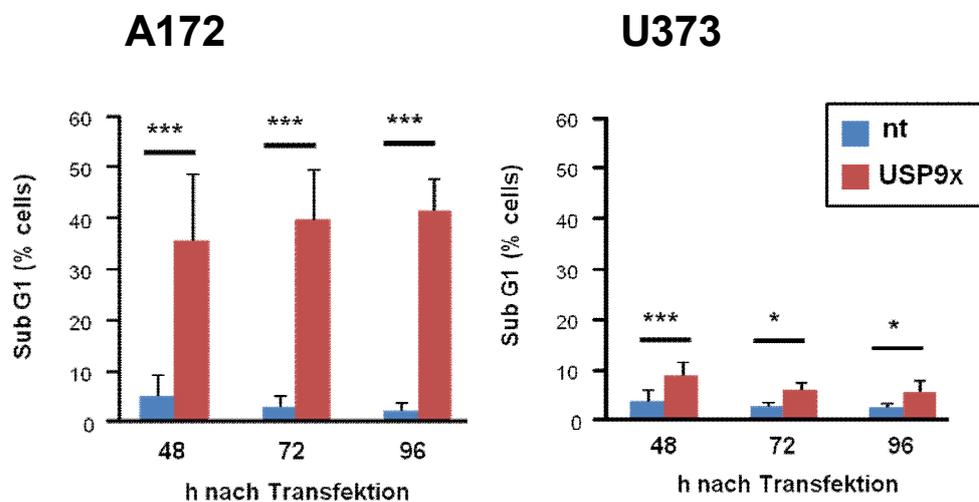


Abbildung 18: Herunterregulierung von USP9x führt zu DNA-Fragmentierung in A172 und U373 Zellen. Mittels siRNA wurde USP9x in A172- und U373- Zellen herunterreguliert (rot, USP9x). 48, 72 und 96 h nach Transfektion (x-Achse) wurden die Zellen permeabilisiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Durchflusszytometrisch wurde der prozentuale Anteil an Zellen gemessen, deren DNA fragmentiert war (y-Achse). Als Kontrollen wurden A172- und U373-Zellen mit non-targeting siRNA transfiziert (blau, nt). Die Herunterregulierung von USP9x führte insbesondere in A172-Zellen zu einer erhöhten Fragmentierung von DNA. (Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n = 6, *** = p<0,001, * = p<0,05, zweiseitiger Welch-korrigierter t-Test).

3.7.3 Wachstumsverhalten von A172- und U373-Zellen nach Herunterregulierung von Mcl-1 und USP9x.

In 3.6 und 3.7 haben wir mit Hilfe der Durchflusszytometrie gezeigt, dass eine Herunterregulierung von Mcl-1 bzw. USP9x zu einem vermehrten Zelltod, genauer zur Apoptose, insbesondere in A172-Zellen führt. U373-Zellen

induzierten dagegen kaum Apoptose nach Herunterregulierung von Mcl-1 oder USP9x.

Der toxische Einfluss der Herunterregulierung von Mcl-1 bzw. USP9x in A172- und U373-Zellen wurde auch mikroskopisch überprüft.

Dabei wurde in je einem Ansatz einmal Mcl-1 und einmal USP9x in A172- und U373-Zellen mittels siRNA-Transfektion herunterreguliert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit non-targeting-siRNA transfiziert (nt). Als weitere Kontrolle wurden A172- und U373-Zellen untersucht, die nicht transfiziert wurden (nicht transfiziert, unbehandelt). 72h nach der Transfektion wurden die unterschiedlich behandelten Zellen unter einem Mikroskop morphologisch untersucht. Abb. 20 zeigt repräsentativ fotografische Aufnahmen der Zellpopulationen unter dem Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung und Phasenkontrast.

Die Herunterregulierung von Mcl-1 und USP9x führte zu einer stark verminderten Zelldichte und vielen dunklen, punktförmigen Zellkörpern toter Zellen im Überstand, wohingegen mit nt-siRNA transfizierte und nicht-transfizierte Zellen viele gesunde Zellen und fast keine toten Zellen aufwiesen. Diese mikroskopischen Aufnahmen verdeutlichen erneut den zytotoxischen Effekt der Herunterregulierung von Mcl-1 und USP9x in A172-Zellen und schließen aus, dass dieser Effekt durch das Transfektionsdetergenz ausgelöst wurde.

In den U373-Zellen ist dieser zytotoxische Effekt dagegen nicht so stark ausgeprägt. Die Herunterregulierung von Mcl-1 oder USP9x führte jedoch auch hier zu einer etwas verminderten Zelldichte mit wenigen toten Zellen, die im Überstand zu finden waren, während die mit nt-siRNA und nicht transfizierten Zellen so gut wie keine toten Zellen und etwas dichtere Zellpopulation aufwiesen.

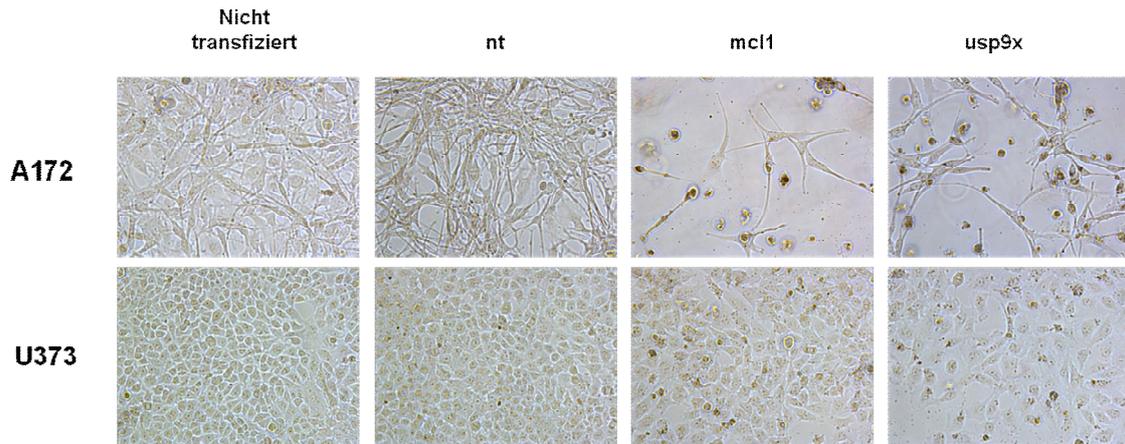


Abbildung 19: A172- und U373-Zellen im Mikroskop, 72 h nach Herunterregulierung von Mcl-1 und USP9x. Mcl-1- und USP9x wurde mittels siRNA in A172- und U373-Zellen herunterreguliert (Mcl-1, USP9x). 72 h nach Transfektion wurden die Zellen unter einem Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung morphologisch analysiert. Als Kontrolle dienten zum einen A172- und U373-Zellen, die mit non-targeting siRNA transfiziert wurden (nt), zum anderen nicht-transfizierte A172- und U373-Zellen (nicht transfiziert).

3.8 Auswirkung ionisierender Strahlung auf A172- und U373-Zellen nach Herunterregulierung von USP9x

Der Versuch 3.7 zeigte, dass die USP9x-Menge einen signifikanten Einfluss insbesondere auf das Überleben von A172-Zellen hat. Eine Herunterregulierung von USP9x führte in den A172-Zellen zu einer stark erhöhten Apoptoserate, in U373-Zellen dagegen führte die Herunterregulierung von USP9x nur zu einer geringeren Zunahme apoptotischer Zellen.

In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob die Zytotoxizität der Bestrahlung bei A172- und U373-Zellen durch eine zusätzliche Herunterregulierung von USP9x verstärkt werden kann. Abb. 20 beschreibt schematisch den Versuchsaufbau der in 3.8 durchgeführten Experimente. Zunächst wurden A172- und U373-Zellen in 6-Well-Platten ausplattiert. Nach 24 h wurden die ausplattierten Zellen in den 6-Well-Platten mit USP9x-siRNA bzw. mit non-targeting siRNA (nt-Zellen) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 10 Gy bestrahlt (RT 10 Gy). Zum Vergleich wurde ein Teil der transfizierten Zellen nicht bestrahlt (0 Gy). Jeweils 24 und 48 h nach Bestrahlung wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht (FACS).

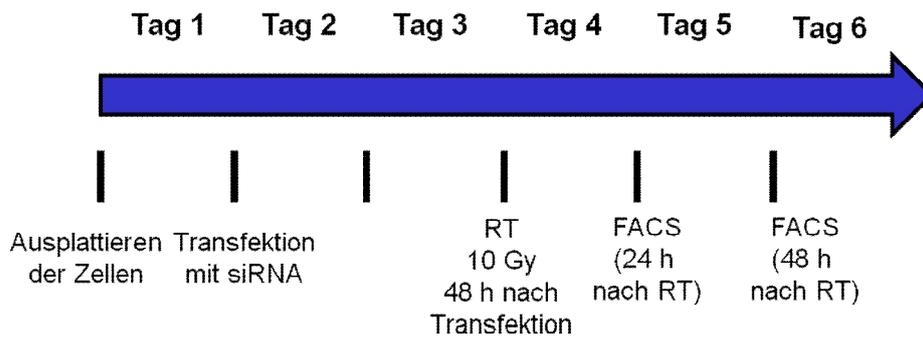


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus in 3.8. Alle Versuche waren gleich aufgebaut. A172- und U373-Zellen wurden an Tag 1 in 6-Well-Platten ausplattiert. An Tag 2, also 24 h nach dem Ausplattieren wurden die Zellen mit USP9x-siRNA bzw. mit non-targeting siRNA (nt) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 10 Gy bestrahlt (Tag 4). Jeweils nach 24 h (Tag 5) und 48 h (Tag 6) wurden die Zellen durchflusszytometrisch (FACS) untersucht.

3.8.1 Herunterregulierung von USP9x mit anschließender Bestrahlung induziert Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ in A172- und U373-Zellen.

Zunächst wurde der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) nach Färbung der Zellen mit TMRE bestimmt. Wie zu erwarten führte allein eine Herunterregulierung von USP9x in A172-Zellen zu einem starken Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$. Nach Herunterregulierung von USP9x wiesen 30% der A172-Zellen ohne Bestrahlung (0 Gy) bereits ein zusammengebrochenes $\Delta\Psi_m$ auf. Im Vergleich dazu liegt der Anteil der mit nt-siRNA transfizierten Zellen ohne Bestrahlung bei lediglich 5%. Eine zusätzliche Bestrahlung führte sowohl nach 48 als auch nach 72 h zu keinem signifikanten Anstieg der A172-Zellen mit zusammengebrochenem $\Delta\Psi_m$ (Abb. 21).

In den U373-Zellen führt die Transfektion mit USP9x-siRNA lediglich zu einem leichtem Anstieg des Anteils mit zusammengebrochenem $\Delta\Psi_m$ auf etwa 10%, während er bei den mit nt-siRNA transfizierten Kontrollzellen bei etwa 5% lag. Nach 72 h erhöhte sich dieser Zellanteil ein wenig. Eine zusätzliche Bestrahlung konnte den Anteil der U373-Zellen mit zusammengebrochenem $\Delta\Psi_m$ auf 30% 48 h nach Bestrahlung steigern, während eine Bestrahlung den Anteil der mit nt-siRNA transfizierten U373-Zellen, die ein zusammengebrochenes $\Delta\Psi_m$ aufwiesen, nur auf 20% erhöhte. 72 h nach Bestrahlung ist der additive zytotoxische Effekt der Transfektion jedoch

aufgehoben. Sowohl die unbestrahlten als auch die bestrahlten U373-Zellen wiesen dann nach einer USP9x-Herunterregulierung einen Anteil an Zellen mit Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ von mehr als 50% auf.

Zusammenfassend wurde beobachtet, dass die Herunterregulierung von USP9x keinen zusätzlichen zytotoxischen Effekt auf bestrahlte Zellen hatte. Bestrahlung von A172-Zellen hatte den zytotoxischen Effekt nach Herunterregulierung der Deubiquitinase USP9x kaum verstärkte. In U373-Zellen, in denen USP9x herunterreguliert wurde, führte die Bestrahlung zu einem schnelleren Zelltod, der aber in mit nt-siRNA und USP9x-siRNA transfizierten Zellen 72 h nach Bestrahlung etwa gleich hoch war.

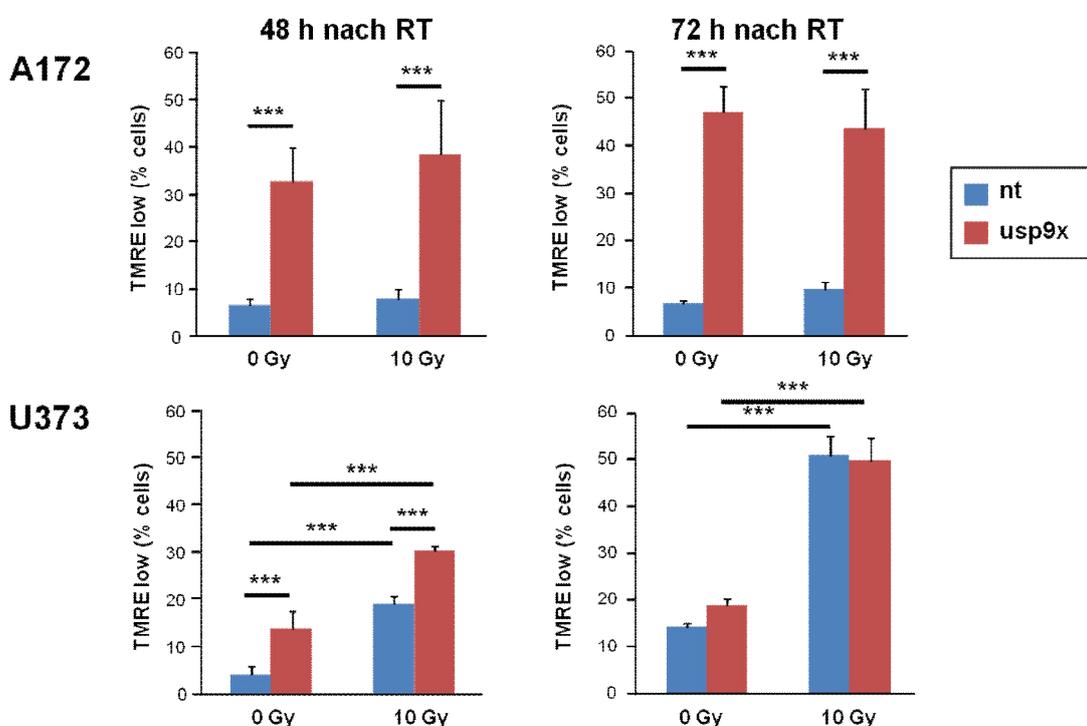


Abbildung 21: Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ in A172- und U373-Zellen nach Herunterregulierung von USP9x und Bestrahlung: 24 h nach dem Ausplattieren auf 6-Well-Platten wurden die A172- und U373-Zellen mit USP9x-siRNA (rot, USP9x) bzw. mit non-targeting siRNA (blau, nt) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 10 Gy bestrahlt (10 Gy). Jeweils 48 und 72 h nach Bestrahlung wurden die Zellen mit TMRE gefärbt, um durchflusszytometrisch den Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ zu analysieren (TMRE low). Die Balkendiagramme zeigen den mittleren, prozentualen Anteil an Zellen mit zusammengebrochenem $\Delta\Psi_m$ (Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n = 6, *** = p<0,001, ANOVA). Herunterregulierung von USP9x mit anschließender Bestrahlung führte nicht zu einem

vermehrten Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ in A172. In den U373 beschleunigte die Herunterregulierung den strahleninduzierten Zelltod.

3.8.2 Herunterregulierung von USP9x mit anschließender Bestrahlung induziert DNA-Fragmentierung in A172- und U373-Zellen

Bisher wurde die Auswirkung der USP9x-Herunterregulierung auf den strahleninduzierten Zelltod beschrieben. Im Folgenden sollte die Wirkung der USP9x-siRNA auf die strahleninduzierte Apoptose untersucht werden. Der Versuch wurde wie bereits unter 3.8. beschrieben durchgeführt. Zu den entsprechenden Zeitpunkten nach Bestrahlung wurden die Zellen jedoch permeabilisiert und mit Propidiumiodid angefärbt, um die DNA-Fragmentierung im Durchflusszytometer zu bestimmen. Wie zu erwarten führte allein eine Herunterregulierung von USP9x in A172-Zellen ohne Bestrahlung zu einer deutlichen DNA-Fragmentierung mit über 40% bzw. 50% zu entsprechenden Zeitpunkten. Eine zusätzliche Herunterregulierung der bestrahlten Zellen hatte kaum Auswirkungen auf die DNA-Fragmentierung. In den U373-Zellen resultierte die Transfektion mit USP9x-siRNA wie bereits oben erwähnt in einer leicht erhöhten DNA-Fragmentierung. Eine zusätzliche Bestrahlung erhöhte den Anteil der U373-Zellen mit fragmentierter DNA unabhängig von dem USP9x-Proteinlevel auf etwa 15% 48 h nach Bestrahlung. Nach 72 h wiesen fast 40% der mit nt-siRNA transfizierten Zellen fragmentierte DNA auf, während es in den mit USP9x-siRNA transfizierten Zellen mehr als 30% waren. 72 h nach Bestrahlung ist der additive zytotoxische Effekt, der durch Herunterregulierung von USP9x und durch ionisierende Strahlen 48 h nach Bestrahlung erzielt wurde jedoch aufgehoben

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Herunterregulierung von USP9x in A172-Zellen zum massiven Zelltod in Form der Apoptose führte. Eine Zusätzliche Bestrahlung hatte sich aber kaum auf eine Erhöhung der Apoptoserate ausgewirkt. In U373-Zellen induzierte die Herunterregulierung von USP9x nur minimal Apoptose. Ein niedriges USP9x-Level führte in U373-Zellen jedoch zu einem beschleunigten Zelltod.

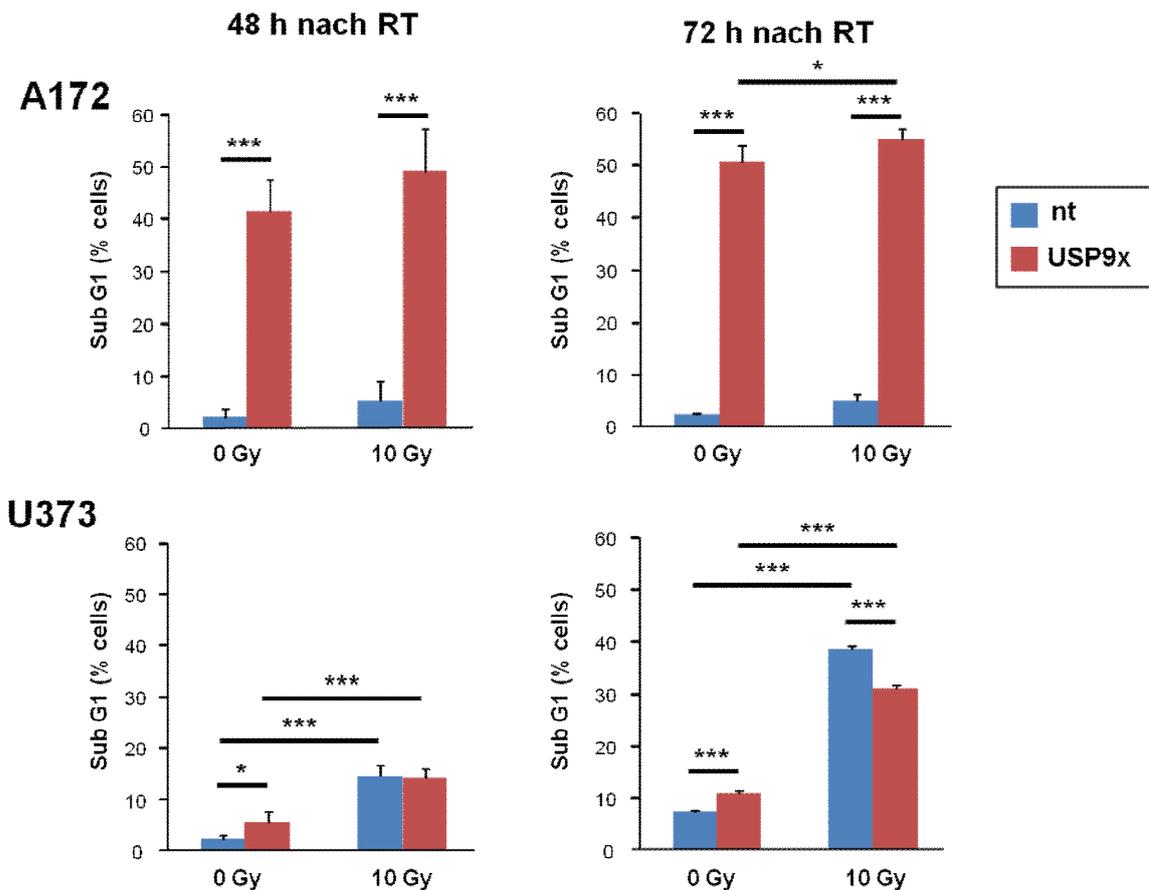


Abbildung 22: DNA-Fragmentierung in A172- und U373-Zellen nach Herunterregulierung von USP9x und Bestrahlung: 24 h nach dem Ausplattieren auf 6-Well-Platten wurden die A172- und U373-Zellen mit USP9x-siRNA (rot, USP9x) bzw. mit non-targeting siRNA (blau, nt) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 0 Gy oder 10 Gy bestrahlt. Jeweils 48 und 72 h nach Bestrahlung wurde die DNA-Fragmentierung (subG1) durchflusszytometrisch nach vorangegangener Permabilisierung und Färbung mit Propidiumiodid untersucht. Die Balkendiagramme zeigen den prozentualen Anteil an Zellen mit fragmentierter DNA (Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n = 6, *** = p < 0,001, * = p < 0,05, ANOVA).

3.9 Klonogenes Überleben von A172- und U373-Zellen nach Herunterregulierung von USP9x

Obwohl die Herunterregulierung von USP9x den strahleninduzierten Zelltod in A172 kaum verbesserte und in U373-Zellen lediglich beschleunigte, könnte die Deubiquitinase unabhängig von dem Zelltod die Strahlensensitivität regulieren. USP9x könnte durch Stabilisierung anderer Faktoren das klonogene Überleben beeinflussen. Deshalb wurde im folgenden Experiment mittels Kolonie-Bildungs-Test untersucht, welchen Effekt eine Bestrahlung auf die Klonogenität

der A172- und U373-Zellen hat, wenn zuvor USP9x herunterreguliert wurde (USP9x-Zellen). Zum Vergleich wurden A172- und U373-Zellen verwendet, die mit non-targeting siRNA transfiziert wurden (nt-Zellen). Hierfür wurden A172- und U373-Zellen 48 h nach Transfektion mit USP9x-siRNA oder mit nt-siRNA mit 0, 1, 2, 3, 4, oder 5 Gy bestrahlt und anschließend im Brutschrank bei 37°C kultiviert. 12 Tage (U373-Zellen) bzw. 15 Tage (A172-Zellen) später wurden die Zellen fixiert und gefärbt, und die gebildeten Kolonien wurden gezählt. Dann wurde jeweils für A172- und U373-Zellen die Überlebensfraktion (survival fraction, SF) der nt-Zellen und der USP9x-Zellen berechnet. Mit Hilfe der SF-Werte für die unterschiedlichen Strahlendosen wurde eine Regressionskurve erstellt (Abb.23).

Die apoptoseresistenten A172-Zellen waren deutlich radiosensitiver als die apoptoseresistenten U373-Zellen (Abb. 23, schwarze Kurven), woraus deutlich wird, dass die Apoptoseneigung nicht unmittelbar das klonogene Überleben bestimmt.

Bei den A172-Zellen erkennt man, dass die Regressionskurve der USP9x-Zellen schneller abfiel als die der nt-Zellen, d.h. die A172-Zellen reagierten strahlensensitiver nach Herunterregulierung von USP9x. Die Überlebensfraktion war insbesondere nach Verabreichung höherer Strahlendosen deutlich niedriger, wenn USP9x herunterreguliert wurde.

Bei den U373-Zellen lagen die Regressionskurven der USP9x-Zellen und der nt-Zellen fast übereinander. Die Überlebensfraktionen der mit nt-siRNA und mit USP9x-siRNA transfizierten Zellen unterschieden sich kaum. Eine Herunterregulierung von USP9x hatte also keinen strahlensensibilisierenden Effekt auf U373-Zellen.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass USP9x das Überleben der A172-Zellen regulierte. Obwohl USP9x kaum die strahleninduzierte Apoptose regulierte, hatte eine Herunterregulierung dieser Deubiquitinase im Klonogenitätstest einen strahlensensibilisierenden Effekt auf A172-Zellen. Im

Gegensatz dazu hat die Herunterregulierung von USP9x kaum eine Wirkung auf das Überleben bestrahlter und unbestrahlter U373-Zellen. Ebenso wurde die Klonogenität nach Bestrahlung der U373-Zellen von dem USP9x-Level nicht beeinflusst.

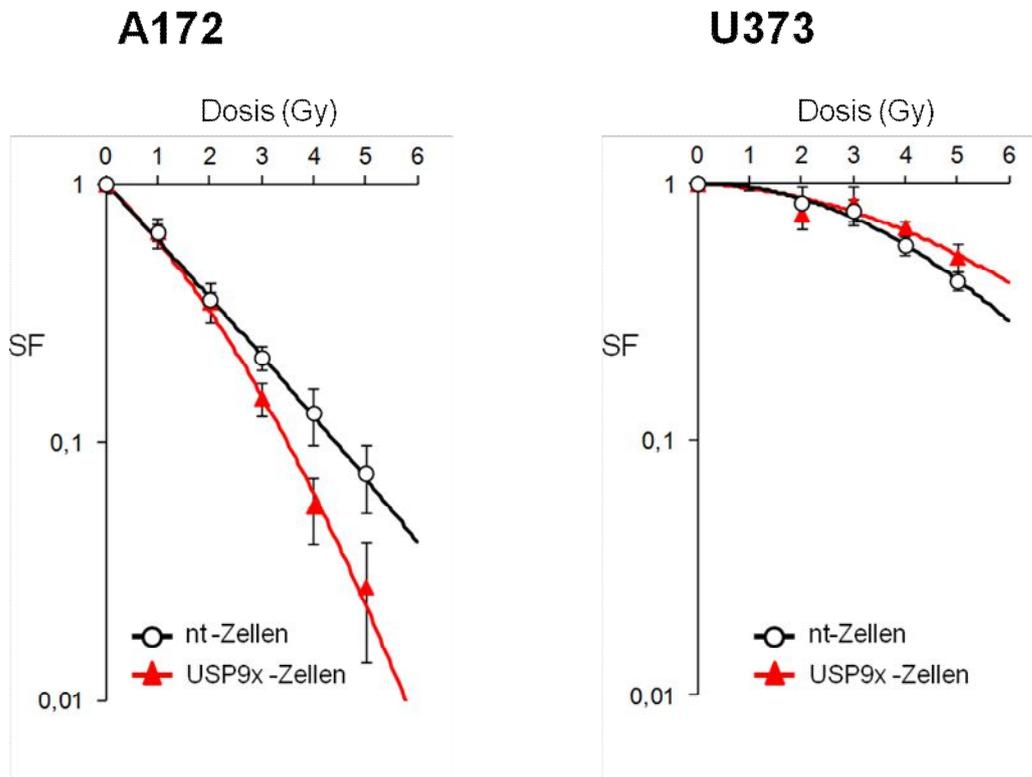


Abbildung 23: Klonogenes Überleben von A172- und U373-Zellen nach Herunterregulierung von USP9x und anschließender Bestrahlung. In A172- und U373-Zellen wurde mittels siRNA USP9x herunterreguliert (USP9x-Zellen). Als Kontrolle wurden die Zellen mit non-targeting-siRNA transfiziert (nt-Zellen). 12-15 Tage nach Bestrahlung mit 0, 1, 2, 3, 4 und 5 Gy wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Die gebildeten Kolonien wurden gezählt und schließlich die Überlebensfraktion (survival fraction, SF) berechnet wurde. Mit Hilfe der berechneten SF-Werte wurden Regressionsgeraden erstellt. Bei den A172-Zellen führte eine Herunterregulierung von USP9x zu einem signifikant verringerten klonogenen Überleben nach Bestrahlung, d.h. zu einer erhöhten Strahlensensibilität (linke Abbildung). Bei den U373 war dies nicht der Fall (rechte Abbildung), die Regressionskurven der nt-Zellen und der USP9x-Zellen lagen fast übereinander. (Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n = 6)

4 Diskussion

4.1 Glioblastomzelllinien A172 und U373 exprimieren viel Mcl-1 und USP9x

Neben der chirurgischen Resektion spielt die Strahlentherapie eine wichtige Rolle in der Behandlung des Glioblastoms, wobei eine Überexpression antiapoptotischer Proteine zu Therapieresistenz führen kann (Streffer et al., 2002). Mcl-1 hat dabei aufgrund seines raschen Umsatzes und seiner Überexpression in Glioblastomen eine besondere Bedeutung (Murphy et al., 2014). Mcl-1 kann strahleninduzierte Apoptose verhindern und das klonogene Überleben erhöhen (Skvara et al., 2005). In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass USP9x Mcl-1 in vielen Tumorentitäten posttranslational stabilisieren und dadurch Strahlen- bzw. Chemoresistenz induzieren konnte (Trivigno et al., 2012; Schwickart et al., 2010). Um zu prüfen, ob diese beiden Proteine auch für das Zellüberleben von Glioblastomen eine Rolle spielen, untersuchten wir die Proteinmenge in unterschiedlichen Glioblastomzelllinien (siehe Abbildung 3). Es zeigte sich, dass alle Glioblastomzelllinien große Mengen an Mcl-1 und USP9x aufweisen. Trivigno et al. untersuchten Mcl-1 und USP9x in Jurkatzellklonen und zeigten, dass USP9x Mcl-1 stabilisiert (Trivigno et al., 2012). Wir verglichen die Mcl-1- und USP9x-Abundanz in Glioblastomzellen und Jurkatzellen und zeigten, dass die untersuchten Glioblastomzellen sehr viel mehr Mcl-1 und USP9x bilden. Dies sagt zwar noch nichts über die Aktivität und Interaktion dieser Proteine aus, gibt aber einen ersten Hinweis darauf, dass sie die Apoptoseinduktion in diesen Zellen beeinflussen könnten.

4.2 Apoptoseinduktion in Glioblastomzelllinien A172 und U373 nach Bestrahlung

Radioresistenz limitiert häufig den Therapieerfolg des Glioblastoms. Eine Rolle dabei kann die Überexpression antiapoptotischer Proteine spielen (Streffer et al., 2002).

Wir prüften zunächst zwei Glioblastomzelllinien hinsichtlich ihrer Apoptoseinduktion nach Bestrahlung. In den U373 führte die Bestrahlung mit 10 Gy zur Spaltung der Effektorcaspase-3 sowie zu Spaltung des Caspase-3-spezifischen Substrates PARP. In den A172-Zellen führte die Bestrahlung nicht zu einer Aktivierung der Caspasenkaskade.

In beiden Zelllinien führte die Bestrahlung mit 10 Gy zur DNA-Fragmentierung (siehe Abbildung 7 und 8) und zum Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ (siehe Abbildung 4,5 und 6). Allerdings fielen sowohl DNA-Fragmentierung als auch Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ in den A172-Zellen sehr viel schwächer aus als in den U373-Zellen. In U373-Zellen wird durch Bestrahlung also mehr Apoptose induziert als in den A172-Zellen.

Trivigno et al. untersuchten jeweils einen radiosensitiven und einen radioresistenten T-Zell-Leukämiezellklon hinsichtlich der Apoptoseinduktion nach Bestrahlung mit 10 Gy. In beiden T-Zell-Leukämiezelllinien lag der Anteil an Zellen mit zusammengebrochenem Membranpotential nach 72 h bei über 60 %. Der Anteil der Zellen mit hypoploiden DNA-Konzentrationen (subG1) lag bei beiden Zellen 72 h nach Bestrahlung bei über 50 % (Trivigno et al., 2012). Auch bei den U373-Zellen führte die Bestrahlung mit 10 Gy bei über 50 % zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, bei den A172 lag dieser Anteil bei unter 10 %. Der Anteil an Zellen im subG1-Bereich lag bei den A172- bei unter 10 % bei den U373-Zellen bei 31 %.

Im Vergleich zu den T-Zell-Leukämiezelllinien führte ionisierende Strahlung in den Glioblastomzelllinien also zu weniger DNA-Fragmentierung und zu weniger Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials. Beides war nach Bestrahlung jedoch in den U373-Zellen viel stärker ausgeprägt als in A172-Zellen.

4.3 Bestrahlung führt zu einer Abnahme der Mcl-1-Menge in U373-Zellen

Eine Überexpression antiapoptotischer Proteine kann nach Bestrahlung die Apoptoseinduktion verhindern (Trivigno et al., 2012; Skvara et al., 2005). Aus diesem Grund untersuchten wir A172- und U373-Zellen auf die Expression pro-

und anti-apoptotischer Proteine nach Bestrahlung (siehe Abbildung 10), um zu überprüfen, welchen Einfluss die Bestrahlung auf die Stabilität dieser Proteine in den beiden Glioblastomzelllinien hat. Dabei fiel auf, dass die Mcl-1-Abundanz bei den A172-Zellen nach Bestrahlung konstant blieb. Bei den U373-Zellen hingegen nahm sie kontinuierlich ab. Mcl-1 kann strahlungsinduzierte Apoptose verhindern und das klonogene Überleben erhöhen (Skvara et al., 2005). Darüber hinaus wurde für zahlreiche Tumorentitäten ein Zusammenhang zwischen Mcl-1-Stabilisierung und Therapieversagen beschrieben (Schwickart et al., 2010). Die abnehmende Mcl-1-Menge in U373-Zellen könnte also ein Grund für die starke Apoptoseinduktion nach Bestrahlung sein. Umgekehrt könnte die Stabilisierung von Mcl-1 zur Apoptoseresistenz in A172 nach Bestrahlung beitragen.

4.4 USP9x-Menge korreliert mit Mcl-1-Level in A172-Zellen

Mcl-1 kann über proteosomalen Abbau schnell posttranslational reguliert werden. Dabei wird Mcl-1 über Ubiquitinligasen polyubiquitiniert und anschließend proteasomal degradiert. USP9x ist eine Deubiquitinase, welche Ubiquitin von Mcl-1 entfernt und es so vor dem proteosomalen Abbau bewahrt, was zu einem verlängerten Tumorzellüberleben führt (Schwickart et al., 2010). Schwickart et al. zeigte, dass eine Herunterregulierung von USP9x zu einer Zunahme von ubiquitiniertem Mcl-1 führt. Dies hat einen verstärkten proteosomalen Abbau von Mcl-1 und damit einhergehend ein verstärktes Zellsterben zur Folge. In T-Zell-Leukämiezelllinien konnte eine durch die Stabilisierung von Mcl-1 durch USP9x Strahlenresistenz nachgewiesen werden (Trivigno et al., 2012). In den radioresistenten Zellen führte eine Herunterregulierung von USP9x zu einer Reduktion der Mcl-1-Halbwertszeit nach Bestrahlung (Trivigno et al., 2012).

Daher untersuchten wir nun erstmals die Relevanz der Deubiquitinase USP9x für die Mcl-1-Stabilität und die Radiosensibilität in Glioblastomzellen. Im Vergleich zu Jurkat-Zellen, welche Trivigno et al. untersuchten, konnten wir in den Glioblastomzelllinien A172 und U373 größere Mengen an USP9x nachweisen (siehe Abbildung 3).

In den A172-Zellen konnten wir eine verminderte Mcl-1-Menge nach Herunterregulierung von USP9x nachweisen (siehe Abbildung 13). In den U373-Zellen hatte das USP9x-Proteinlevel keinen Einfluss auf die Mcl-1-Abundanz. USP9x könnte also in A172-Zellen Mcl-1 stabilisieren. In U373-Zellen korrelierten das USP9x-Level dagegen nicht mit der Menge an Mcl-1.

Die Mcl-1-Stabilität wurde in beiden Zelllinien durch die Messung der Mcl-1-Halbwertszeiten nach Inhibition der Translation mit Cycloheximid überprüft. In den A172-Zellen wurde eine tendenziell längere Mcl-1-Halbwertszeit als in den U373-Zellen nachgewiesen (siehe Abbildung 11). Dies könnte ebenfalls ein Hinweis auf eine posttranslationale Stabilisierung von Mcl-1 in A172-Zellen sein.

4.5 Zytoprotektive Funktion von Mcl-1 und USP9x in A172- und U373-Zellen

Mcl-1 ist essentiell für das Überleben vieler Zelllinien (Perciavalle & Opferman, 2013). Folglich wurde durch eine Herunterregulierung von Mcl-1 und USP9x in A172- und U373-Zellen der Zelltod (Zusammenbruch des Mitochondrialen Membranpotentials) und die Apoptose (DNA-Fragmentierung) induziert (siehe Abbildung 15, 16, 17 und 18). Dies konnte auch mikroskopisch nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19). Wieder zeigte sich ein stärkerer zytoprotektiver Effekt von Mcl-1 für A172-Zellen als für U373-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass Mcl-1 für das Überleben von A172 eine wichtigere Rolle spielt als für die U373-Zellen, was sich in einer massiven Zunahme der Apoptose nach Herunterregulierung von Mcl-1 in A172-Zellen zeigt. Bei U373-Zellen führen niedrige Mcl-1-Level zu einer sehr geringen Zunahme der Apoptose. Eventuell regulieren die U373-Zellen die Apoptose verstärkt über andere anti-apoptische Proteine wie z.B. Bcl-2. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass eine Überexpression von Bcl-2 zu Radio- und Chemoresistenz führt (Strik et al., 1999). U373-Zellen exprimieren hohe Level an Bcl-2 (siehe Abbildung 10). Dadurch könnte die Bedeutung von Mcl-1 bei der Induktion der Apoptose in U373-Zellen in den Hintergrund geraten.

4.6 Effekt von Bestrahlung nach Herunterregulierung von USP9x auf A172- und U373-Zellen

Trivigno et al. zeigten, dass durch eine Herunterregulierung von USP9x radioresistente T-Zell-Leukämiezellen sensitiviert wurden und dadurch nach Bestrahlung vermehrt Apoptose induziert wurde (Trivigno et al., 2012). Diesen Effekt konnten wir in den Glioblastomzelllinien A172 und U373-Zellen nicht nachweisen. In 3.8 hatte eine Herunterregulierung von USP9x mit anschließender Bestrahlung keine Zunahme des Zusammenbruchs des mitochondrialen Membranpotentials bzw. der DNA-Fragmentierung in A172- und U373-Zellen zur Folge. Bei den A172-Zellen hatte bereits die alleinige Herunterregulierung von USP9x einen massiven zytotoxischen Effekt, der durch Bestrahlung nicht verstärkt werden konnte.

In den U373-Zellen hatte eine vorangehende Herunterregulierung von USP9x keinen additiv zytotoxischen Effekt im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung. Dies war anzunehmen, da wir in den vorigen Versuchen zeigten, dass das Mcl-1-Level nicht mit der USP9x-Abundanz korreliert. So ist es unwahrscheinlich, dass USP9x Mcl-1 in diesen Zellen stabilisiert und dadurch Radioresistenz erzeugt. Somit bleibt der apoptoseinduzierende Effekt nach Herunterregulierung von USP9x aus. Die Apoptoseinduktion konnte hier möglicherweise beschleunigt werden, da durch die Herunterregulierung von USP9x nach 48 h der Anteil der Zellen mit zusammengebrochenem mitochondrialen Membranpotential höher war als nach alleiniger Bestrahlung (siehe Abbildung 21). Andererseits regulierten die U373-Zellen nach Bestrahlung das Mcl-1-Level sowieso herunter (siehe Abbildung 10). Also kann eine zuvor durchgeführte Herunterregulierung von Mcl-1 bzw. USP9x die Zytotoxizität nach Bestrahlung höchstens beschleunigen, nicht jedoch die strahlungsinduzierte Toxizität verstärken.

4.7 Erhöhung der Radiosensibilität von A172-Zellen nach Herunterregulierung von USP9x unabhängig von Mcl-1

Die Herunterregulierung von USP9x hatte keinen verstärkenden apoptoseinduzierenden Effekt auf bestrahlte A172- und U373-Zellen. Wir

fürten einen Koloniebildungstest durch, um zu überprüfen, ob unabhängig von der Apoptose die Herunterregulierung von USP9x einen radiosensibilisierenden Effekt auf A172- und U373-Zellen hat (siehe Abbildung 23). Wir zeigten, dass in den A172-Zellen durch niedrige USP9x-Level die Koloniebildungsfähigkeit nach Bestrahlung stark abnahm (siehe Abbildung 23). Dies ist ein Hinweis darauf, dass weitere, Mcl-1-unabhängige Wirkungsmechanismen von USP9x existieren, die zur Radioresistenz der Zellen beitragen. USP9x verfügt über zahlreiche weitere Substrate, die Einfluss auf das Zellüberleben haben. Z.B. wird der TGF β /SMAD4-Signalweg durch USP9x reguliert, welcher in Tumoren eine begünstigende Wirkung auf das Zellüberleben haben kann (Zhang et al., 2014). Der TGF β /SMAD4-Signalweg spielt für die Entstehung von Glioblastomen eine wichtige Rolle (Golestaneh & Mishra, 2005). Eine Blockierung des TGF β /SMAD4-Signalwegs in Glioblastomzelllinien hatte einen radiosensibilisierenden Effekt (Hardee et al., 2012). USP9x könnte also in A172-Zellen nach Bestrahlung über den TGF β /SMAD4-Signalweg einen radiosensibilisierenden Effekt, unabhängig von Mcl-1, haben. Darüber hinaus gibt es weitere Proteine wie z.B. β -Catenin, Af-6 und ERG, die einen Einfluss auf das zelluläre Überleben und die Proliferation von Tumoren haben und durch USP9x stabilisiert werden (Warr et al., 2005; Quinn et al., 2011; Wang et al., 2014). All die genannten Signalwege haben wir in den Glioblastomzellen A172 und U373 jedoch nicht untersucht. Folglich können wir nicht ausschließen, dass über diese Signalwege A172- und U373-Zellen nach Herunterregulierung von USP9x gegenüber Bestrahlung sensibilisiert werden.

Wir zeigten, dass USP9x in A172-Zellen einen Radioresistenzfaktor darstellt. Über welchen Mechanismus die Strahlenresistenz vermittelt wird, bleibt jedoch unklar.

In den U373-Zellen hatte die Herunterregulierung von USP9x dagegen keinen Einfluss auf die Koloniebildungsfähigkeit nach Bestrahlung. Weder die genannten durch USP9x regulierten Proteine noch Mcl-1 führten nach USP9x-Herunterregulierung zu verstärktem Zellsterben nach Bestrahlung.

5 Zusammenfassung

Das Glioblastom ist bis heute eine Erkrankung mit infauster Prognose. Trotz aller Fortschritte der Strahlentherapie, der Chirurgie und der Chemotherapie bleibt das Glioblastom eine unheilbare Erkrankung.

Die Radiotherapie zählt zusammen mit der Chirurgie zu den wichtigsten therapeutischen Verfahren in der Behandlung des Glioblastoms. Die Erforschung neuer Methoden zur Sensibilisierung des Tumors gegenüber Bestrahlung hat eine hohe Relevanz.

Ein wichtiger Mechanismus, der zu Strahlenresistenz von Tumoren und T-Zell-Leukämien beiträgt, ist die Verhinderung der Apoptose durch Stabilisierung bzw. Überexpression anti-apoptotisch wirksamer Proteine wie Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1.

Mcl-1 ist im Vergleich zu den anderen antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Proteinfamilie ein kurzlebiges Protein mit einer kurzen Halbwertszeit, das in vielen Glioblastomen überexprimiert wird. Mcl-1 wird post-translational unter anderem durch E3-Ligasen und Deubiquitinasen reguliert. Die Deubiquitinase USP9x kann durch Abspaltung von Polyubiquitinketten Mcl-1 stabilisieren und dadurch Apoptose verhindern.

In dieser Arbeit sollte überprüft werden, welche Rolle USP9x für die Mcl-1-Stabilität in Glioblastomzellen und die Entwicklung von Radioresistenzen spielt. Für unsere Versuche verwendeten wir die zwei Glioblastomzelllinien A172 und U373. In beiden wurde die Expression antiapoptotischer Proteine und USP9x, sowie die Apoptoseinduktion nach Bestrahlung untersucht. Nach Herunterregulierung von USP9x prüften wir dessen Rolle für die Mcl-1-Stabilität, die Induktion der Apoptose sowie das klonogene Überleben nach Bestrahlung. Anhand der Caspasenaktivierung, der DNA-Fragmentierung und des Zusammenbruchs des mitochondrialen Membranpotentials zeigten wir, dass die A172-Zellen nach Bestrahlung weniger Apoptose induzieren als die U373-Zellen. Beide Zelllinien induzieren jedoch weniger Apoptose nach Bestrahlung als Jurkat-Zellen.

Beide Zelllinien wiesen hohe Mcl-1 und USP9x-Mengen auf. Nach Bestrahlung blieben die Mcl-1-Level in den A172-Zellen konstant, in den U373-Zellen nahmen sie kontinuierlich ab.

In den A172-Zellen hatte die USP9x-Menge Einfluss auf die Mcl-1-Abundanz. In den U373-Zellen hatten erniedrigte USP9x-Level keinerlei Auswirkung auf die Mcl-1-Menge. Dies deutet auf eine USP9x-vermittelte Mcl-1-Stabilisierung in A172-Zellen hin.

In beiden Zelllinien hatte sowohl eine Herunterregulierung von Mcl-1 als auch eine Herunterregulierung von USP9x eine Induktion der Apoptose zur Folge, welche bei den A172 stärker ausfiel als bei den U373-Zellen. Wahrscheinlich wird in den A172-Zellen die Induktion der Apoptose stark über Mcl-1 reguliert. In den U373-Zellen konnten wir eine hohe Abundanz des antiapoptotischen Bcl-2 nachweisen, welches eventuell die Relevanz von Mcl-1 bei der Apoptoseresistenz in diesen Zellen in den Hintergrund stellt.

Unabhängig von der Art des Zelltodes führte eine Herunterregulierung von USP9x zu einer starken Abnahme des klonogenen Überlebens von A172-Zellen nach Bestrahlung.

Aus unseren Ergebnissen schlossen wir, dass USP9x einen Radioresistenzfaktor in Glioblastomzelllinien darstellen kann. Auch in Glioblastomzellen scheint ein Zusammenhang zwischen der USP9x-Menge und der Mcl-1-Abundanz zu bestehen. Wahrscheinlich führen dabei hohe USP9x-Mengen in A172-Zellen zu einer Stabilisierung von Mcl-1. Eine Herunterregulierung von USP9x hatte in beiden Zelllinien keinen vermehrten Zelltod durch Apoptose zur Folge. Jedoch führte unabhängig von der Art des Zelltodes eine Herunterregulierung von USP9x zu einer Senkung des klonogenen Überlebens von A172-Zellen. Es existieren also weitere, Mcl-1-unabhängige Wege, über welche die Deubiquitinase USP9x eine Radioresistenz in Glioblastomen erzeugt. Eine USP9x-vermittelte Apoptoseresistenz durch Mcl-1-Stabilisierung, wie sie von Trivingo et al. für Jurkat-T-Zell-Leukämiezellen beschrieben wurde, konnte in bestrahlten Glioblastomzellen jedoch nicht gezeigt werden.

6 Abkürzungs-, Abbildungs-, Tabellenverzeichnis

6.1 Abkürzungsverzeichnis

- μ l Mikroliter
- A Ampere
- AIF apoptosis-Inducing Factor
- APAF-1 apoptotic protease activating factor-1
- ASK1 stress-activated apoptosis signal-regulating kinase 1
- ATP Adenosin Triphosphat
- BAD Bcl-2 Antagonist of Cell Death
- BAK Bcl-2 Homologous Antagonist / Killer
- BAX Bcl-2 Associated X Protein
- BCL-2 B-Cell Lymphoma/Leukemia-2
- BCL-W Bcl-2-like protein 2
- BCL-XL Bcl-X (long form)
- BID BH3 Interacting Domain Death Agonist
- BIM Bcl-2 Interacting Mediator of Cell Death
- CAD caspase- activated DNase
- CARD caspase-Aktivierungs- und Rekrutierungsdomäne
- CDP Zelldissociationspuffer
- CED-3 C. elegans deathprotein 3

- CT Computertomographie
- dATP Desoxyadenosintriphosphat
- DD death domain
- DDR DNA damage response
- DED death Effector Domain
- DMSO Dimethylsulfoxid
- DNA deoxyribonucleic acid
- DSB double-Strand Breaks
- DTT Dithiothreitol
- DUB Deubiquitinase
- Endo G endonuclease G
- FACS Fluorescence Activated Cell Sorter
- FBW7 F-box-and WD repeat-containing 7
- FOXO3A class0 forkhead box transcription factor- 3A
- FSC forward Scatter
- GBM Glioblastoma Multiforme
- GY Grey
- h Stunde
- HRP horse radish peroxidase
- IAPS inhibitors of apoptosis
- ICAD inhibitor of Caspase- activated DNase

- ICE interleukin-1-beta converting enzyme
- KOBI Koloniebildungstest
- MCL-1 (Myeloid cell leukemia sequence 1
- min Minute
- ml Milliliter
- MOMP mitochondrial outer membrane permeabilization
- MRT Magnetresonanztomographie
- MULE Mcl-1 Ubiquitin-Ligase
- MV Millivolt
- MYC Myelocytomatose
- NT non-targeting
- P53 phosphoprotein p53
- PARP Poly-(ADP-ribose)-Polymerase
- PBS phosphate *buffered* saline
- PE plating efficiency
- PEST-Sequenz Pro (P), Glu (E), Ser (S), Thr (T)
- PI Propidiumiodid
- PUMA p53 upregulated modulator of apoptosis
- PVDF Polyvinylidenfluorid
- RIP1 receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
- RPM rounds per minute

- RT radiation
- SF survival fraction
- SSB single-Strand Break
- SSC sideways Scatter
- β -TrCP beta-transducin-containing protein
- TGF- β transforming growth factor- β
- TMRE Tetramethylrhodamin- ethylester-perchlorat
- TRIM 17 tripartite motif containing 17
- UB Ubiquitin
- UPS Ubiquitin-Proteasom-System
- WHO World Health Organization

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung primärer Hirntumore nach ihrer Histologie in den USA für das Jahr 2012	3
Abbildung 2: Häufigkeitsverteilung glialer Tumore des Gehirns und des zentralen Nervensystems in den USA für das Jahr 2012.....	4
Abbildung 3: Bcl-2-Proteinlevel in Glioblastomzelllinien und Jurkatzellen:	43
Abbildung 4: Bestrahlung führt zum Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ in A172 Zellen.	45
Abbildung 5: Bestrahlung führt zum Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ in U373 Zellen.	46
Abbildung 6: Quantifizierung des $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruchs von A172 und U373 im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung mit 10 Gy.	47

Abbildung 7: Ionisierende Strahlung führt zu einem Anstieg der subG ₁ - Fraktion von A172- und U373-Zellen.	48
Abbildung 8: Quantifizierung der DNA-Degradierung in A172- und U373- Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy im zeitlichen Verlauf.	49
Abbildung 9: Westernblot als Nachweis von Caspasenaktivierung und PARP-Spaltung in A172- und U373-Zellen nach Bestrahlung.....	50
Abbildung 10: Veränderungen der Proteinlevel der Bcl-2-Familie nach Bestrahlung mit 10 Gy.....	51
Abbildung 11: Mcl-1-HWZ in A172 und U373.....	52
Abbildung 12: USP9x-Level in A172- und U373-Zellen nach Bestrahlung.	53
Abbildung 13: Herunterregulation von Mcl-1 und USP9x in A172- und U373- Zellen.	54
Abbildung 14: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus in 3.6 und 3.7.....	55
Abbildung 15: Herunterregulierung von Mcl-1 führt zum Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ in A172- und U373-Zellen.	56
Abbildung 16: Herunterregulierung von Mcl-1 führt zu einer Zunahme an DNA-Fragmentierung in A172- und U373-Zellen.	57
Abbildung 17: Herunterregulierung von USP9x führt zum Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ in A172- und U373-Zellen.	59
Abbildung 18: Herunterregulierung von USP9x führt zu DNA-Fragmentierung in A172 und U373 Zellen.....	60
Abbildung 19: A172-und U373-Zellen im Mikroskop, 72 h nach Herunterregulierung von Mcl-1 und USP9x.....	62
Abbildung 20: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus in 3.8.	63
Abbildung 21: Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ in A172- und U373-Zellen nach Herunterregulierung von USP9x und Bestrahlung:	64
Abbildung 22: DNA-Fragmentierung in A172- und U373-Zellen nach Herunterregulierung von USP9x und Bestrahlung:	66
Abbildung 23: Klonogenes Überleben von A172- und U373-Zellen nach Herunterregulierung von USP9x und anschließender Bestrahlung.	68

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Detergenzien	25
Tabelle 2: Verwendete Geräte.....	27
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	28
Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen	29
Tabelle 5: Verwendete Kultur-Medien	30
Tabelle 6: Verwendete Erst-Antikörper.....	30
Tabelle 7: Verwendete Zweit-Antikörper.....	31
Tabelle 8: Zusammensetzung der SDS-Trenngele und des Sammelgels.	38

7 Literaturverzeichnis

- Adams, JM, Cory, S (1998): The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival, *Science* (Band 281), Nr. 5381, S. 1322-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9735050>.
- Adams, JM, Cory, S (2007): The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy, *Oncogene* (Band 26), Nr. 9, S. 1324-37. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17322918>.
- Akgul, C, Moulding, DA, White, MR, Edwards, SW (2000): In vivo localisation and stability of human Mcl-1 using green fluorescent protein (GFP) fusion proteins, *FEBS Lett* (Band 478), Nr. 1-2, S. 72-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10922472>.
- Alnemri, ES, Livingston, DJ, Nicholson, DW, Salvesen, G, Thornberry, NA, Wong, WW, Yuan, J (1996): Human ICE/CED-3 protease nomenclature, *Cell* (Band 87), Nr. 2, S. 171. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8861900>.
- Alvarez, JV, Belka, GK, Pan, TC, Chen, CC, Blankemeyer, E, Alavi, A, Karp, J, Chodosh, LA (2014): Oncogene pathway activation in mammary tumors dictates [18F]-FDG-PET uptake, *Cancer Res*. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25239452>.
- Begg, AC, Stewart, FA, Vens, C (2011): Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs, *Nat Rev Cancer* (Band 11), Nr. 4, S. 239-53. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21430696>.
- Bernardi, P, Broekemeier, KM, Pfeiffer, DR (1994): Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane, *J Bioenerg Biomembr* (Band 26), Nr. 5, S. 509-17. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7896766>.
- Beutler, B, van Huffel, C (1994): Unraveling function in the TNF ligand and receptor families, *Science* (Band 264), Nr. 5159, S. 667-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8171316>.
- Bourke, E, Dodson, H, Merdes, A, Cuffe, L, Zachos, G, Walker, M, Gillespie, D, Morrison, CG (2007): DNA damage induces Chk1-dependent centrosome amplification, *EMBO Rep* (Band 8), Nr. 6, S. 603-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17468739>.
- Brandsma, D, Stalpers, L, Taal, W, Sminia, P, van den Bent, MJ (2008): Clinical features, mechanisms, and management of pseudoprogression in malignant gliomas, *Lancet Oncol* (Band 9), Nr. 5, S. 453-61. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18452856>.
- Castedo, M, Kroemer, G (2004): [Mitotic catastrophe: a special case of apoptosis], *J Soc Biol* (Band 198), Nr. 2, S. 97-103. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15368957>.
- Certo, M, Del Gaizo Moore, V, Nishino, M, Wei, G, Korsmeyer, S, Armstrong, SA, Letai, A (2006): Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members,

- Cancer Cell* (Band 9), Nr. 5, S. 351-65. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16697956>.
- Chen, L, Willis, SN, Wei, A, Smith, BJ, Fletcher, JI, Hinds, MG, Colman, PM, Day, CL, Adams, JM, Huang, DC (2005): Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function, *Mol Cell* (Band 17), Nr. 3, S. 393-403. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15694340>.
- Chipuk, JE, Bouchier-Hayes, L, Green, DR (2006): Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario, *Cell Death Differ* (Band 13), Nr. 8, S. 1396-402. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16710362>.
- Chowdhury, I, Tharakan, B, Bhat, GK (2006): Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited, *Cell Mol Biol Lett* (Band 11), Nr. 4, S. 506-25. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16977376>.
- Clohessy, JG, Zhuang, J, de Boer, J, Gil-Gomez, G, Brady, HJ (2006): Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis, *J Biol Chem* (Band 281), Nr. 9, S. 5750-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16380381>.
- Cory, S, Huang, DC, Adams, JM (2003): The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis, *Oncogene* (Band 22), Nr. 53, S. 8590-607. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14634621>.
- Craig, RW (2002): MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis, *Leukemia* (Band 16), Nr. 4, S. 444-54. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11960321>.
- Cuconati, A, Mukherjee, C, Perez, D, White, E (2003): DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells, *Genes Dev* (Band 17), Nr. 23, S. 2922-32. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14633975>.
- Czabotar, PE, Lee, EF, van Delft, MF, Day, CL, Smith, BJ, Huang, DC, Fairlie, WD, Hinds, MG, Colman, PM (2007): Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 104), Nr. 15, S. 6217-22. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389404>.
- DeAngelis, LM (2001): Brain tumors, *N Engl J Med* (Band 344), Nr. 2, S. 114-23. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11150363>.
- Debacq-Chainiaux, F, Erusalimsky, JD, Campisi, J, Toussaint, O (2009): Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo, *Nat Protoc* (Band 4), Nr. 12, S. 1798-806. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20010931>.
- Deng, Y, Chan, SS, Chang, S (2008): Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection, *Nat Rev Cancer* (Band 8), Nr. 6, S. 450-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18500246>.

- Deshaies, RJ, Joazeiro, CA (2009): RING domain E3 ubiquitin ligases, *Annu Rev Biochem* (Band 78), S. 399-434. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19489725>.
- Deveraux, QL, Reed, JC (1999): IAP family proteins--suppressors of apoptosis, *Genes Dev* (Band 13), Nr. 3, S. 239-52. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9990849>.
- Dijkers, PF, Medema, RH, Lammers, JW, Koenderman, L, Coffey, PJ (2000): Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1, *Curr Biol* (Band 10), Nr. 19, S. 1201-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050388>.
- Ding, Q, He, X, Hsu, JM, Xia, W, Chen, CT, Li, LY, Lee, DF, Liu, JC, Zhong, Q, Wang, X, Hung, MC (2007): Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization, *Mol Cell Biol* (Band 27), Nr. 11, S. 4006-17. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17387146>.
- Du, H, Wolf, J, Schafer, B, Moldoveanu, T, Chipuk, JE, Kuwana, T (2011): BH3 domains other than Bim and Bid can directly activate Bax/Bak, *J Biol Chem* (Band 286), Nr. 1, S. 491-501. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21041309>.
- Earnshaw, WC (1999): Apoptosis. A cellular poison cupboard, *Nature* (Band 397), Nr. 6718, S. 387, 389. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9989401>.
- Enari, M, Sakahira, H, Yokoyama, H, Okawa, K, Iwamatsu, A, Nagata, S (1998): A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature* (Band 391), Nr. 6662, S. 43-50. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9422506>.
- Erenpreisa, J, Kalejs, M, Ianzini, F, Kosmacek, EA, Mackey, MA, Emzinsh, D, Cragg, MS, Ivanov, A, Illidge, TM (2005): Segregation of genomes in polyploid tumour cells following mitotic catastrophe, *Cell Biol Int* (Band 29), Nr. 12, S. 1005-11. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16314119>.
- Eriksson, D, Lofroth, PO, Johansson, L, Riklund, K, Stigbrand, T (2009): Apoptotic signalling in HeLa Hep2 cells following 5 Gy of cobalt-60 gamma radiation, *Anticancer Res* (Band 29), Nr. 11, S. 4361-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20032379>.
- Eriksson, D, Lofroth, PO, Johansson, L, Riklund, KA, Stigbrand, T (2007): Cell cycle disturbances and mitotic catastrophes in HeLa Hep2 cells following 2.5 to 10 Gy of ionizing radiation, *Clin Cancer Res* (Band 13), Nr. 18 Pt 2, S. 5501s-5508s. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17875782>.
- Eriksson, D, Stigbrand, T (2010): Radiation-induced cell death mechanisms, *Tumour Biol* (Band 31), Nr. 4, S. 363-72. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20490962>.
- Erwig, LP, Henson, PM (2008): Clearance of apoptotic cells by phagocytes, *Cell Death Differ* (Band 15), Nr. 2, S. 243-50. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17571081>.
- Everett, RD, Meredith, M, Orr, A, Cross, A, Kathoria, M, Parkinson, J (1997): A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein,

- EMBO J* (Band 16), Nr. 7, S. 1519-30. URL:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9130697>.
- Fadok, VA, Henson, PM (1998): Apoptosis: getting rid of the bodies, *Curr Biol* (Band 8), Nr. 19, S. R693-5. In eng. URL:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9768356>.
- Fazi, B, Bursch, W, Fimia, GM, Nardacci, R, Piacentini, M, Di Sano, F, Piredda, L (2008): Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells, *Autophagy* (Band 4), Nr. 4, S. 435-41. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18259116>.
- Finley, D, Ciechanover, A, Varshavsky, A (2004): Ubiquitin as a central cellular regulator, *Cell* (Band 116), Nr. 2 Suppl, S. S29-32, 2 p following S32. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15055578>.
- Galluzzi, L, Vitale, I, Abrams, JM, Alnemri, ES, Baehrecke, EH, Blagosklonny, MV, Dawson, TM, Dawson, VL, El-Deiry, WS, Fulda, S, Gottlieb, E, Green, DR, Hengartner, MO, Kepp, O, Knight, RA, Kumar, S, Lipton, SA, Lu, X, Madeo, F, Malorni, W, Mehlen, P, Nunez, G, Peter, ME, Piacentini, M, Rubinsztein, DC, Shi, Y, Simon, HU, Vandenabeele, P, White, E, Yuan, J, Zhivotovsky, B, Melino, G, Kroemer, G (2012): Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012, *Cell Death Differ* (Band 19), Nr. 1, S. 107-20. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21760595>.
- Gewirtz, DA, Holt, SE, Elmore, LW (2008): Accelerated senescence: an emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation, *Biochem Pharmacol* (Band 76), Nr. 8, S. 947-57. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18657518>.
- Golestaneh, N, Mishra, B (2005): TGF-beta, neuronal stem cells and glioblastoma, *Oncogene* (Band 24), Nr. 37, S. 5722-30. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16123805>.
- Gomez-Bougie, P, Menoret, E, Juin, P, Dousset, C, Pellat-Deceunynck, C, Amiot, M (2011): Noxa controls Mule-dependent Mcl-1 ubiquitination through the regulation of the Mcl-1/USP9X interaction, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 413), Nr. 3, S. 460-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21907705>.
- Grander, D, Kharaziha, P, Laane, E, Pokrovskaja, K, Panaretakis, T (2009): Autophagy as the main means of cytotoxicity by glucocorticoids in hematological malignancies, *Autophagy* (Band 5), Nr. 8, S. 1198-200. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19855186>.
- Greenhalgh, DG (1998): The role of apoptosis in wound healing, *Int J Biochem Cell Biol* (Band 30), Nr. 9, S. 1019-30. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9785465>.
- Hanahan, D, Weinberg, RA (2011): Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* (Band 144), Nr. 5, S. 646-74. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>.
- Hardee, ME, Marciscano, AE, Medina-Ramirez, CM, Zagzag, D, Narayana, A, Lonning, SM, Barcellos-Hoff, MH (2012): Resistance of glioblastoma-initiating cells to radiation mediated by the tumor microenvironment can be abolished by inhibiting transforming growth factor-beta, *Cancer Res*

- (Band 72), Nr. 16, S. 4119-29. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22693253>.
- Hayflick, L, Moorhead, PS (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp Cell Res* (Band 25), S. 585-621. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13905658>.
- Hershko, A (2005): The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle, *Cell Death Differ* (Band 12), Nr. 9, S. 1191-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16094395>.
- Hollerhage, HG, Zumkeller, M, Becker, M, Dietz, H (1991): Influence of type and extent of surgery on early results and survival time in glioblastoma multiforme, *Acta Neurochir (Wien)* (Band 113), Nr. 1-2, S. 31-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1665950>.
- Ianzini, F, Bertoldo, A, Kosmacek, EA, Phillips, SL, Mackey, MA (2006): Lack of p53 function promotes radiation-induced mitotic catastrophe in mouse embryonic fibroblast cells, *Cancer Cell Int* (Band 6), S. 11. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16640786>.
- Inuzuka, H, Fukushima, H, Shaik, S, Liu, P, Lau, AW, Wei, W (2011): Mcl-1 ubiquitination and destruction, *Oncotarget* (Band 2), Nr. 3, S. 239-44. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21608150>.
- Itoh, N, Nagata, S (1993): A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen, *J Biol Chem* (Band 268), Nr. 15, S. 10932-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7684370>.
- Jolly, LA, Taylor, V, Wood, SA (2009): USP9X enhances the polarity and self-renewal of embryonic stem cell-derived neural progenitors, *Mol Biol Cell* (Band 20), Nr. 7, S. 2015-29. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19176755>.
- Jourdain, A, Martinou, JC (2009): Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis, *Int J Biochem Cell Biol* (Band 41), Nr. 10, S. 1884-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19439192>.
- Kaina, B (2003): DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling, *Biochem Pharmacol* (Band 66), Nr. 8, S. 1547-54. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14555233>.
- Kawamura, K, Morita, N, Domiki, C, Fujikawa-Yamamoto, K, Hashimoto, M, Iwabuchi, K, Suzuki, K (2006): Induction of centrosome amplification in p53 siRNA-treated human fibroblast cells by radiation exposure, *Cancer Sci* (Band 97), Nr. 4, S. 252-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16630116>.
- Kerr, JF, Wyllie, AH, Currie, AR (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer* (Band 26), Nr. 4, S. 239-57. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561027>.
- Kim, H, Rafiuddin-Shah, M, Tu, HC, Jeffers, JR, Zambetti, GP, Hsieh, JJ, Cheng, EH (2006): Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies, *Nat Cell Biol* (Band 8), Nr. 12, S. 1348-58. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17115033>.

- Kleihues, P, Burger, PC, Scheithauer, BW (1993): The new WHO classification of brain tumours, *Brain Pathol* (Band 3), Nr. 3, S. 255-68. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8293185>.
- Kluck, RM, Bossy-Wetzel, E, Green, DR, Newmeyer, DD (1997): The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis, *Science* (Band 275), Nr. 5303, S. 1132-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9027315>.
- Kondo, T (2012): [Radiation-induced cell death], *Nihon Rinsho* (Band 70), Nr. 3, S. 389-93. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22514913>.
- Konopleva, M, Contractor, R, Tsao, T, Samudio, I, Ruvolo, PP, Kitada, S, Deng, X, Zhai, D, Shi, YX, Sneed, T, Verhaegen, M, Soengas, M, Ruvolo, VR, McQueen, T, Schober, WD, Watt, JC, Jiffar, T, Ling, X, Marini, FC, Harris, D, Dietrich, M, Estrov, Z, McCubrey, J, May, WS, Reed, JC, Andreeff, M (2006): Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia, *Cancer Cell* (Band 10), Nr. 5, S. 375-88. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17097560>.
- Kozopas, KM, Yang, T, Buchan, HL, Zhou, P, Craig, RW (1993): MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 90), Nr. 8, S. 3516-20. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7682708>.
- Krajewski, S, Krajewska, M, Ehrmann, J, Sikorska, M, Lach, B, Chatten, J, Reed, JC (1997): Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1, and Bax in tumors of central and peripheral nervous system origin, *Am J Pathol* (Band 150), Nr. 3, S. 805-14. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9060818>.
- Kuwana, T, Bouchier-Hayes, L, Chipuk, JE, Bonzon, C, Sullivan, BA, Green, DR, Newmeyer, DD (2005): BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly, *Mol Cell* (Band 17), Nr. 4, S. 525-35. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15721256>.
- Lai, DM, Lin, SM, Tu, YK, Kao, MC, Hung, CC (1993): Therapy for supratentorial malignant astrocytomas: survival and possible prognostic factors, *J Formos Med Assoc* (Band 92), Nr. 3, S. 220-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8102273>.
- Laperriere, N, Zuraw, L, Cairncross, G (2002): Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review, *Radiother Oncol* (Band 64), Nr. 3, S. 259-73. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12242114>.
- Leu, JI, Dumont, P, Hafey, M, Murphy, ME, George, DL (2004): Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex, *Nat Cell Biol* (Band 6), Nr. 5, S. 443-50. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15077116>.
- Li, H, Zhu, H, Xu, CJ, Yuan, J (1998): Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, *Cell* (Band 94), Nr. 4, S. 491-501. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9727492>.

- Li, P, Nijhawan, D, Budihardjo, I, Srinivasula, SM, Ahmad, M, Alnemri, ES, Wang, X (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell* (Band 91), Nr. 4, S. 479-89. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9390557>.
- Li, RY, Chen, LC, Zhang, HY, Du, WZ, Feng, Y, Wang, HB, Wen, JQ, Liu, X, Li, XF, Sun, Y, Yang, DB, Jiang, T, Li, YL, Jiang, CL (2013): MiR-139 Inhibits Mcl-1 Expression and Potentiates TMZ-Induced Apoptosis in Glioma, *CNS Neurosci Ther*. In Eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23551751>.
- Lund, LR, Romer, J, Thomasset, N, Solberg, H, Pyke, C, Bissell, MJ, Dano, K, Werb, Z (1996): Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways, *Development* (Band 122), Nr. 1, S. 181-93. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8565829>.
- Luo, X, Budihardjo, I, Zou, H, Slaughter, C, Wang, X (1998): Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors, *Cell* (Band 94), Nr. 4, S. 481-90. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9727491>.
- Magiera, MM, Mora, S, Mojsa, B, Robbins, I, Lassot, I, Desagher, S (2013): Trim17-mediated ubiquitination and degradation of Mcl-1 initiate apoptosis in neurons, *Cell Death Differ* (Band 20), Nr. 2, S. 281-92. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22976837>.
- Mattson, MP (2000): Apoptosis in neurodegenerative disorders, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 1), Nr. 2, S. 120-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11253364>.
- Maurer, U, Charvet, C, Wagman, AS, Dejardin, E, Green, DR (2006): Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1, *Mol Cell* (Band 21), Nr. 6, S. 749-60. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16543145>.
- Mazumder, S, Choudhary, GS, Al-Harbi, S, Almasan, A (2012): Mcl-1 Phosphorylation defines ABT-737 resistance that can be overcome by increased NOXA expression in leukemic B cells, *Cancer Res* (Band 72), Nr. 12, S. 3069-79. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22525702>.
- Mengual Gomez, DL, Armando, RG, Farina, HG, Gomez, DE (2014): [Telomerase and telomere: their structure and dynamics in health and disease], *Medicina (B Aires)* (Band 74), Nr. 1, S. 69-76. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24561847>.
- Murphy, AC, Weyhenmeyer, B, Noonan, J, Kilbride, SM, Schimansky, S, Loh, KP, Kogel, D, Letai, AG, Prehn, JH, Murphy, BM (2014): Modulation of Mcl-1 sensitizes glioblastoma to TRAIL-induced apoptosis, *Apoptosis* (Band 19), Nr. 4, S. 629-42. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24213561>.
- Nagai, H, Noguchi, T, Homma, K, Katagiri, K, Takeda, K, Matsuzawa, A, Ichijo, H (2009): Ubiquitin-like sequence in ASK1 plays critical roles in the recognition and stabilization by USP9X and oxidative stress-induced

- cell death, *Mol Cell* (Band 36), Nr. 5, S. 805-18. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20005844>.
- Nakano, K, Vousden, KH (2001): PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53, *Mol Cell* (Band 7), Nr. 3, S. 683-94. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463392>.
- Nehs, MA, Lin, CI, Kozono, DE, Whang, EE, Cho, NL, Zhu, K, Moalem, J, Moore, FD, Jr., Ruan, DT (2011): Necroptosis is a novel mechanism of radiation-induced cell death in anaplastic thyroid and adrenocortical cancers, *Surgery* (Band 150), Nr. 6, S. 1032-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22136818>.
- Nijhawan, D, Fang, M, Traer, E, Zhong, Q, Gao, W, Du, F, Wang, X (2003): Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation, *Genes Dev* (Band 17), Nr. 12, S. 1475-86. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12783855>.
- Nijhawan, D, Honarpour, N, Wang, X (2000): Apoptosis in neural development and disease, *Annu Rev Neurosci* (Band 23), S. 73-87. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10845059>.
- Oda, E, Ohki, R, Murasawa, H, Nemoto, J, Shibue, T, Yamashita, T, Tokino, T, Taniguchi, T, Tanaka, N (2000): Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis, *Science* (Band 288), Nr. 5468, S. 1053-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10807576>.
- Ohgaki, H, Dessen, P, Jourde, B, Horstmann, S, Nishikawa, T, Di Patre, PL, Burkhard, C, Schuler, D, Probst-Hensch, NM, Maiorka, PC, Baeza, N, Pisani, P, Yonekawa, Y, Yasargil, MG, Lutolf, UM, Kleihues, P (2004): Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study, *Cancer Res* (Band 64), Nr. 19, S. 6892-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15466178>.
- Ohgaki, H, Kleihues, P (2005): Epidemiology and etiology of gliomas, *Acta Neuropathol* (Band 109), Nr. 1, S. 93-108. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15685439>.
- Ohgaki, H, Kleihues, P (2007): Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma, *Am J Pathol* (Band 170), Nr. 5, S. 1445-53. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17456751>.
- Opferman, JT (2008): Apoptosis in the development of the immune system, *Cell Death Differ* (Band 15), Nr. 2, S. 234-42. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17571082>.
- Opferman, JT, Korsmeyer, SJ (2003): Apoptosis in the development and maintenance of the immune system, *Nat Immunol* (Band 4), Nr. 5, S. 410-5. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12719730>.
- Opferman, JT, Letai, A, Beard, C, Sorcinelli, MD, Ong, CC, Korsmeyer, SJ (2003): Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1, *Nature* (Band 426), Nr. 6967, S. 671-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14668867>.
- Perciavalle, RM, Opferman, JT (2013): Delving deeper: MCL-1's contributions to normal and cancer biology, *Trends Cell Biol* (Band 23), Nr. 1, S. 22-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23026029>.

- Pickart, CM (2001): Mechanisms underlying ubiquitination, *Annu Rev Biochem* (Band 70), S. 503-33. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11395416>.
- Placzek, WJ, Wei, J, Kitada, S, Zhai, D, Reed, JC, Pellecchia, M (2010): A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy, *Cell Death Dis* (Band 1), S. e40. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21364647>.
- Puck, TT, Marcus, PI, Cieciura, SJ (1956): Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer, *J Exp Med* (Band 103), Nr. 2, S. 273-83. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13286432>.
- Pushparaj, PN, Melendez, AJ (2006): Short interfering RNA (siRNA) as a novel therapeutic, *Clin Exp Pharmacol Physiol* (Band 33), Nr. 5-6, S. 504-10. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16700886>.
- Quinn, BA, Dash, R, Azab, B, Sarkar, S, Das, SK, Kumar, S, Oyesanya, RA, Dasgupta, S, Dent, P, Grant, S, Rahmani, M, Curiel, DT, Dmitriev, I, Hedvat, M, Wei, J, Wu, B, Stebbins, JL, Reed, JC, Pellecchia, M, Sarkar, D, Fisher, PB (2011): Targeting Mcl-1 for the therapy of cancer, *Expert Opin Investig Drugs* (Band 20), Nr. 10, S. 1397-411. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21851287>.
- Rheume, E, Cohen, LY, Uhlmann, F, Lazure, C, Alam, A, Hurwitz, J, Sekaly, RP, Denis, F (1997): The large subunit of replication factor C is a substrate for caspase-3 in vitro and is cleaved by a caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis, *EMBO J* (Band 16), Nr. 21, S. 6346-54. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9351817>.
- Roninson, IB, Broude, EV, Chang, BD (2001): If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells, *Drug Resist Updat* (Band 4), Nr. 5, S. 303-13. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11991684>.
- 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* (Band 81), Nr. 1, S. 32-42. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20836993>.
- Saxena, A, Viswanathan, S, Moshynska, O, Tandon, P, Sankaran, K, Sheridan, DP (2004): Mcl-1 and Bcl-2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Am J Hematol* (Band 75), Nr. 1, S. 22-33. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14695629>.
- Schleicher, UM, Andreopoulos, D, Ammon, J, Gilsbach, J (1999): Conventionally fractionated radiotherapy of glioblastoma multiforme. Results and analysis of possible influencing factors, *Front Radiat Ther Oncol* (Band 33), S. 166-73. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10549487>.
- Schulze-Bergkamen, H, Fleischer, B, Schuchmann, M, Weber, A, Weinmann, A, Krammer, PH, Galle, PR (2006): Suppression of Mcl-1 via RNA interference sensitizes human hepatocellular carcinoma cells towards

- apoptosis induction, *BMC Cancer* (Band 6), S. 232. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17014711>.
- Schulze-Osthoff, K, Ferrari, D, Los, M, Wesselborg, S, Peter, ME (1998): Apoptosis signaling by death receptors, *Eur J Biochem* (Band 254), Nr. 3, S. 439-59. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9688254>.
- Schwickart, M, Huang, X, Lill, JR, Liu, J, Ferrando, R, French, DM, Maecker, H, O'Rourke, K, Bazan, F, Eastham-Anderson, J, Yue, P, Dornan, D, Huang, DC, Dixit, VM (2010): Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival, *Nature* (Band 463), Nr. 7277, S. 103-7. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20023629>.
- Semple, CA, Group, RG, Members, GSL (2003): The comparative proteomics of ubiquitination in mouse, *Genome Res* (Band 13), Nr. 6B, S. 1389-94. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12819137>.
- Shimizu, S, Kanaseki, T, Mizushima, N, Mizuta, T, Arakawa-Kobayashi, S, Thompson, CB, Tsujimoto, Y (2004): Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes, *Nat Cell Biol* (Band 6), Nr. 12, S. 1221-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15558033>.
- Shiratsuchi, A, Osada, S, Kanazawa, S, Nakanishi, Y (1998): Essential role of phosphatidylserine externalization in apoptosing cell phagocytosis by macrophages, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 246), Nr. 2, S. 549-55. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9610400>.
- Skvara, H, Thallinger, C, Wacheck, V, Monia, BP, Pehamberger, H, Jansen, B, Selzer, E (2005): Mcl-1 blocks radiation-induced apoptosis and inhibits clonogenic cell death, *Anticancer Res* (Band 25), Nr. 4, S. 2697-703. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16080514>.
- Slee, EA, Adrain, C, Martin, SJ (1999): Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis, *Cell Death Differ* (Band 6), Nr. 11, S. 1067-74. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10578175>.
- Stein, GH, Dulic, V (1995): Origins of G1 arrest in senescent human fibroblasts, *Bioessays* (Band 17), Nr. 6, S. 537-43. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7575495>.
- Stewart, DP, Koss, B, Bathina, M, Perciavalle, RM, Bisanz, K, Opferman, JT (2010): Ubiquitin-independent degradation of antiapoptotic MCL-1, *Mol Cell Biol* (Band 30), Nr. 12, S. 3099-110. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20385764>.
- Strasser, A, Harris, AW, Bath, ML, Cory, S (1990): Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2, *Nature* (Band 348), Nr. 6299, S. 331-3. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2250704>.
- Strasser, A, O'Connor, L, Dixit, VM (2000): Apoptosis signaling, *Annu Rev Biochem* (Band 69), S. 217-45. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966458>.
- Strasser, A, Puthalakath, H, Bouillet, P, Huang, DC, O'Connor, L, O'Reilly, LA, Cullen, L, Cory, S, Adams, JM (2000): The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control,

- Ann N Y Acad Sci* (Band 917), S. 541-8. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11268382>.
- 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* (Band 56), Nr. 1, S. 43-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11949826>.
- Strik, H, Deininger, M, Streffer, J, Grote, E, Wickboldt, J, Dichgans, J, Weller, M, Meyermann, R (1999): BCL-2 family protein expression in initial and recurrent glioblastomas: modulation by radiochemotherapy, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (Band 67), Nr. 6, S. 763-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10567494>.
- Stroh, C, Schulze-Osthoff, K (1998): Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates, *Cell Death Differ* (Band 5), Nr. 12, S. 997-1000. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9894605>.
- Stupp, R, Hegi, ME, Mason, WP, van den Bent, MJ, Taphoorn, MJ, Janzer, RC, Ludwin, SK, Allgeier, A, Fisher, B, Belanger, K, Hau, P, Brandes, AA, Gijtenbeek, J, Marosi, C, Vecht, CJ, Mokhtari, K, Wesseling, P, Villa, S, Eisenhauer, E, Gorlia, T, Weller, M, Lacombe, D, Cairncross, JG, Mirimanoff, RO (2009): Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial, *Lancet Oncol* (Band 10), Nr. 5, S. 459-66. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19269895>.
- Susin, SA, Lorenzo, HK, Zamzami, N, Marzo, I, Snow, BE, Brothers, GM, Mangion, J, Jacotot, E, Costantini, P, Loeffler, M, Larochette, N, Goodlett, DR, Aebersold, R, Siderovski, DP, Penninger, JM, Kroemer, G (1999): Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature* (Band 397), Nr. 6718, S. 441-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9989411>.
- Taveras, JM, Thompson, HG, Jr., Pool, JL (1962): Should we treat glioblastoma multiforme? A study of survival in 425 cases, *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* (Band 87), S. 473-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13919885>.
- Tewari, M, Quan, LT, O'Rourke, K, Desnoyers, S, Zeng, Z, Beidler, DR, Poirier, GG, Salvesen, GS, Dixit, VM (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* (Band 81), Nr. 5, S. 801-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7774019>.
- Thornberry, NA (1998): Caspases: key mediators of apoptosis, *Chem Biol* (Band 5), Nr. 5, S. R97-103. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9578633>.
- Trivigno, D, Essmann, F, Huber, SM, Rudner, J (2012): Deubiquitinase USP9x confers radioresistance through stabilization of Mcl-1, *Neoplasia* (Band 14), Nr. 10, S. 893-904. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23097624>.

- Tsujimoto, Y, Cossman, J, Jaffe, E, Croce, CM (1985): Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma, *Science* (Band 228), Nr. 4706, S. 1440-3. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3874430>.
- van Delft, MF, Wei, AH, Mason, KD, Vandenberg, CJ, Chen, L, Czabotar, PE, Willis, SN, Scott, CL, Day, CL, Cory, S, Adams, JM, Roberts, AW, Huang, DC (2006): The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized, *Cancer Cell* (Band 10), Nr. 5, S. 389-99. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17097561>.
- Vaux, DL, Cory, S, Adams, JM (1988): Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells, *Nature* (Band 335), Nr. 6189, S. 440-2. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3262202>.
- Vucic, D, Dixit, VM, Wertz, IE (2011): Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 12), Nr. 7, S. 439-52. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21697901>.
- Wang, S, Kollipara, RK, Srivastava, N, Li, R, Ravindranathan, P, Hernandez, E, Freeman, E, Humphries, CG, Kapur, P, Lotan, Y, Fazli, L, Gleave, ME, Plymate, SR, Raj, GV, Hsieh, JT, Kittler, R (2014): Ablation of the oncogenic transcription factor ERG by deubiquitinase inhibition in prostate cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 111), Nr. 11, S. 4251-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24591637>.
- Wang, Y, Ji, P, Liu, J, Broaddus, RR, Xue, F, Zhang, W (2009): Centrosome-associated regulators of the G(2)/M checkpoint as targets for cancer therapy, *Mol Cancer* (Band 8), S. 8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19216791>.
- Warr, MR, Acoca, S, Liu, Z, Germain, M, Watson, M, Blanchette, M, Wing, SS, Shore, GC (2005): BH3-ligand regulates access of MCL-1 to its E3 ligase, *FEBS Lett* (Band 579), Nr. 25, S. 5603-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16213503>.
- Wei, G, Twomey, D, Lamb, J, Schlis, K, Agarwal, J, Stam, RW, Opferman, JT, Sallan, SE, den Boer, ML, Pieters, R, Golub, TR, Armstrong, SA (2006): Gene expression-based chemical genomics identifies rapamycin as a modulator of MCL1 and glucocorticoid resistance, *Cancer Cell* (Band 10), Nr. 4, S. 331-42. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17010674>.
- Willis, SN, Chen, L, Dewson, G, Wei, A, Naik, E, Fletcher, JI, Adams, JM, Huang, DC (2005): Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins, *Genes Dev* (Band 19), Nr. 11, S. 1294-305. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15901672>.
- Wrana, JL (2009): The secret life of Smad4, *Cell* (Band 136), Nr. 1, S. 13-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19135880>.
- Wuilleme-Toumi, S, Robillard, N, Gomez, P, Moreau, P, Le Gouill, S, Avet-Loiseau, H, Harousseau, JL, Amiot, M, Bataille, R (2005): Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and

- shorter survival, *Leukemia* (Band 19), Nr. 7, S. 1248-52. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15902294>.
- Wuilleme-Toumi, S, Trichet, V, Gomez-Bougie, P, Gratas, C, Bataille, R, Amiot, M (2007): Reciprocal protection of Mcl-1 and Bim from ubiquitin-proteasome degradation, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 361), Nr. 4, S. 865-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17681275>.
- Wyllie, AH, Kerr, JF, Currie, AR (1980): Cell death: the significance of apoptosis, *Int Rev Cytol* (Band 68), S. 251-306. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7014501>.
- Wyman, C, Kanaar, R (2006): DNA double-strand break repair: all's well that ends well, *Annu Rev Genet* (Band 40), S. 363-83. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16895466>.
- Yang, T, Kozopas, KM, Craig, RW (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* (Band 128), Nr. 6, S. 1173-84. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7896880>.
- Yu, J, Zhang, L, Hwang, PM, Kinzler, KW, Vogelstein, B (2001): PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells, *Mol Cell* (Band 7), Nr. 3, S. 673-82. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463391>.
- Zha, J, Harada, H, Yang, E, Jockel, J, Korsmeyer, SJ (1996): Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L), *Cell* (Band 87), Nr. 4, S. 619-28. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8929531>.
- Zhang, J, Zhang, X, Xie, F, Zhang, Z, van Dam, H, Zhang, L, Zhou, F (2014): The regulation of TGF-beta/SMAD signaling by protein deubiquitination, *Protein Cell* (Band 5), Nr. 7, S. 503-17. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24756567>.
- 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* (Band 121), Nr. 7, S. 1085-95. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15989957>.
- Zois, CE, Koukourakis, MI (2009): Radiation-induced autophagy in normal and cancer cells: towards novel cytoprotection and radio-sensitization policies?, *Autophagy* (Band 5), Nr. 4, S. 442-50. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164950>.

8 Anhang

8.1 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde vom 15.09.2011 bis 22.03.2015 an der Klinik für Radioonkologie der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Stephan M. Huber und PD Dr. rer. nat. Justine Rudner angefertigt.

Ich danke PD Dr. rer. nat. Justine Rudner und Prof. Dr. rer. nat. Stephan M. Huber für die spannende Themenstellung, für die Hilfestellungen und Ratschläge, für die uneingeschränkte Diskussionsbereitschaft und für die intensive und kollegiale Betreuung, die mit vielen Freiheiten verbunden war.

Ich bedanke mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Experimentelle Radioonkologie für das einzigartige Klima, für die freundliche Aufnahme und für die vielen wertvollen Anregungen während meiner Arbeit. Besonders Danke ich Sophia Hogh-Binder der besten Teamkollegin, die man sich wünschen kann, Dominik Klumpp, Benjamin Steegen und Milan Misovic für gute Ratschläge und gute Stimmung und Heidrun Faltin für ihre Geduld.

Ich danke Prof. Dr. Marlies Knipper für die Hilfe und Unterstützung und für das wiederholende Erinnern den roten Faden beizubehalten.

Ich danke dem Promotionskolleg für die anregenden Seminare, für die Kongressreise, für die Möglichkeit Freunde und Kollegen durch das Programm kennenzulernen und natürlich für die finanzielle Unterstützung.

Ich danke Frau Dr. Tanja Rieß für die Hilfe in allen organisatorischen Fragen und Problemen.

Ich danke meiner lieben Leila für die viele Unterstützung, Andreas Meiwes für anregende Diskussionen, das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie die viele Hilfe.

Ich danke Tom Laudes fürs Korrekturlesen.

8.2 Curriculum vitae

05/2015	Staatsexamen Humanmedizin Note: 1,66
10/2007 – 05/2015	Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen
2012 - 2013	Stipendiat des IZKF-Promotionskolleg Tübingen
08/2009	erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung – Note: 2,0
09/1996 – 07/2005	Besuch des Goethe-Gymnasiums Emmendingen
2005	„Jugend-forscht“ 2. Preis Regionalwettbewerb Biologie Abschluss: Abitur – Note: 2,0
09/1992 – 07/1996	Markgrafen-Grundschule Emmendingen
Promotion	
10/2011 – 03/2015	Klinik für Radioonkologie, Abteilung experimentelle Radioonkologie, Titel: „USP9x-vermittelte Strahlenresistenz durch Mcl-1-Stabilisierung in Glioblastomen“

8.3 Veröffentlichungen

F Wolfsperger^{1,5}, S A Hogh-Binder^{1,5}, J Schittenhelm², T Psaras³, V Ritter⁴, L Bornes⁴, S M Huber¹, V Jendrossek⁴ and J Rudner⁴ (2016) „Deubiquitylating enzyme USP9x regulates radiosensitivity in glioblastoma cells by Mcl-1-dependent and -independent mechanisms“ “Cell Death Disease”

8.4 Authentizitätserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorgelegte Arbeit mit dem folgenden Titel „USP9x-vermittelte Strahlenresistenz in Glioblastomen“ selbstständig, ohne

fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder anderen Quellen, insbesondere dem Internet, entnommen sind, sind als solche eindeutig und wiederauffindbar kenntlich gemacht. Alle diese Quellen sind vollständig und abschließend in einem Literaturverzeichnis angegeben. Die vorliegende Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht veröffentlicht.

8.5 Erklärung zum Eigenanteil

Die Versuche die in den Abbildungen 4,5,6,7,8,9,10,11,13,15,16,17,18,21,22 und 23 dargestellt sind habe ich selbst angesetzt und durchgeführt. 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 FACS Messungen wurden von mir ausgewertet und von Fr. PD Dr.rer.nat. Rudner überprüft.

Die Versuche, die in Abbildung 19 dargestellt sind, wurden von Fr. PD Dr. rer.nat. Rudner durchgeführt.

Die Versuche, die in den Abbildungen 3, 10 und 12 dargestellt sind, wurden von mir und Fr. PD Dr.rer.nat. Rudner gemeinsam durchgeführt.

Fr. PD 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.