

Aus dem
CharitéCentrum für Tumormedizin
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Bernd Dörken
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Virchow Klinikum

HABILITATIONSSCHRIFT

Tumorbiologische Relevanz und Regulation des p14^{ARF} Tumorsuppressorsignalweges

zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach

Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Philipp Hemmati

geboren am 19.12.1970
in Oberhausen

Eingereicht:
Dekanin:

Februar 2010
Frau Univ.-Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter:
2. Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. med. Wolf-Karsten Hofmann, Mannheim
Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Serve, Frankfurt am Main

Widmung

Meinen Eltern, Klara Hemmati und Dr. med. Shahryar Hemmati.

„Erkenne Dich selbst und lebe danach“

Dr. jur. Peter Mandelartz (1902 - †1961)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
2. Regulation der Apoptose	7
2.1 Caspasen.....	7
2.2 Extrinsischer und intrinsischer Apoptosesignalweg.....	8
2.3 Die Bcl-2 Genfamilie	9
2.4 BH3-only Proteine.....	11
2.5 Mitochondriale Apoptose und Exekution durch Caspasen	14
2.6 Caspase-unabhängiger und nicht-apoptotischer Zelltod	15
3. Regulation des Zellzyklus	16
3.1 Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) und Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren (CKI)	17
3.2 Zellzyklus-Restriktionspunkte	20
4. Der p14^{ARF} Tumorsuppressorsignalweg	23
4.1 Der ARF-Hdm-2-p53 Signalweg	24
4.2 p53-unabhängige Signalwege	25
4.3 Tumorbologische Relevanz des p14 ^{ARF} Signalweges.....	27
5. Fragestellung und Zielsetzung	30
6. Eigene Ergebnisse	31
6.1. Die Expression des p14 ^{ARF} Tumorsuppressors induziert p53- und Bax-unabhängige Apoptose.....	31
6.2 Pro-apoptisches Bak kompensiert den Verlust von Bax bei der p14 ^{ARF} -induzierten mitochondrialen Apoptose	32
6.3 Genetische Dissektion des p14 ^{ARF} -induzieren Zelltodes: Schlüsselrolle des CDK-Inhibitors p21 ^{CDKN1} und des BH3-only Proteins Puma/bbc3.....	34
6.4 Der Verlust von des CDK-Inhibitors p21 ^{Cip1/WAF-1} verhindert den p14 ^{ARF} -induzierten G1-Zellzyklusarrest und verstärkt die p14 ^{ARF} -induzierte Apoptose in humanen Tumorzellen	35
6.5 Der p14 ^{ARF} -vermittelte G2-Zellzyklusarrest in p53- und p21-defizienten Zellen wird durch Hemmung der p34cdc2 (CDK1) Kinase vermittelt	36
6.6 Kooperativer Effekt von p21 und 14-3-3sigma auf Zellzyklusarrest und Apoptoseinduktion durch p14 ^{ARF}	37

7. Diskussion	39
8. Ausblick	44
9. Zusammenfassung	45
10. Literaturverzeichnis	46
11. Danksagung	58
12. Eidesstattliche Erklärung	59

1. Einleitung

Die Homöostase adulter, sich ständig erneuernder Gewebe wird durch das fein abgestimmte Gleichgewicht aus Zellneubildung durch Proliferation einerseits und Zelluntergang durch programmierten Zelltod andererseits bestimmt. Die Steuerung der Proliferation erfolgt durch die Regulation des Zellzyklus. Neben exogenen Signalen, welche u.a. das Angebot an Wachstumsfaktoren und Nährstoffen sowie den Einfluss benachbarter Zellen vermitteln, werden auch endogene Signale, z.B. vermittelt durch DNA-Schädigung oder die Expression von Onkogenen oder Tumorsuppressoren, in die Regulation des Zellzyklus integriert. Die gezielte Elimination überflüssiger, gealterter oder gar gefährlicher Zellen erfolgt durch apoptotischen Zelltod. Dieser Mechanismus des „freiwilligen Suizids“ einer Zelle tritt vor allem dann in Kraft, wenn andere Maßnahmen zum Erhalt der zellulären Integrität, z.B. die Reparatur geschädigter DNA, ineffektiv sind oder nicht zeitgerecht erfolgen können. Um das reibungslose Ineinandergreifen all dieser Vorgänge zu ermöglichen, ist es erforderlich, dass Zellzyklus- und Apoptoseprogramme engmaschig miteinander verknüpft sind. Dies zeigt sich u.a. an der dualen Funktion des p14^{ARF} Tumorsuppressors, welcher unmittelbar Apoptose- und Zellzyklus-regulierende Funktion ausübt. Darüber hinaus ist der p14^{ARF}-Signalweg eng mit dem des Zellzyklusregulators p16^{INK4A} verbunden und bildet gemeinsam mit p53 und dem Retinoblastoma (Rb) Protein das *INK4A/ARF* Tumorsuppressornetzwerk.

Neben Störungen der regelhaften Differenzierung, sind die Deregulation von Zellzyklus- und Apoptoseprogrammen ein zentrales Charakteristikum maligner Tumorzellen. Hierbei spielen Störungen des p14^{ARF} Tumorsuppressorsignalweges eine essenzielle Rolle. Dies zeigt sich u.a. daran, dass weit mehr als die Hälfte aller malignen Tumoren eine Deregulation zentraler Komponenten dieses Signalweges aufweisen. Aufgrund der essenziellen Funktion von p14^{ARF} bei der Vermittlung von Zellzyklusarrest, Apoptose und Seneszenz, haben Störungen des p14^{ARF}-Signalweges nicht nur einen hohen tumorbiologischen Stellenwert, sondern besitzen bei einer Reihe von Tumorentitäten auch klinisch-prognostische Relevanz. Darüber hinaus eröffnen detaillierte Kenntnisse über die Wirkungsweise dieses Signalweges neue Perspektiven für die molekulare Diagnostik von Tumorerkrankungen und erlauben die Entwicklung innovativer, zielgerichteter Therapiestrategien.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Regulation von Apoptose- und Zellzyklusarrestprogrammen durch den p14^{ARF} Tumorsuppressor auf zellbiologischer und molekularer Ebene zu analysieren und die hieran beteiligten Signalwege funktionell zu dissezieren.

2. Regulation der Apoptose

Programmierter Zelltod ist ein genetisch determinierter Prozess und umfasst eine Reihe unterschiedlicher Zelltodtypen, von denen die Apoptose zu den am besten untersuchten Vorgängen zählt [1-4]. Apoptose spielt eine zentrale Rolle bei der Embryonalentwicklung multizellulärer Organismen und ist darüber hinaus auch entscheidend an der Homöostase adulter Organismen beteiligt. Insbesondere erlaubt Apoptose die gezielte Elimination überflüssiger, ungewollter oder gar gefährlicher, z.B. maligne entarteter, Zellen. Ferner ist der apoptotische Zelltod essenzieller Bestandteil der Reaktion des Organismus zur Elimination „gestresster“ Zellen, z.B. nach Einwirkung exogener (Entzug von Wachstumsfaktoren, Verlust von Zell-Zell-Kontakt, Hypoxie, oxidativer Stress,) und endogener Noxen (Aktivierung von Onkogenen, Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen, Störung des Zellzyklus, Fehlfaltung von Proteinen). Schließlich ist Apoptose auch für die Elimination überalterter Zellen relevant [3,5-8]. Im Vergleich zu anderen Formen des programmierten Zelltodes, z.B. der mitotischen Katastrophe, der Autophagozytose (Autophagie) oder bestimmten Formen der Nekrose, zeichnen sich apoptotische Zellen durch distinkte, fest definierte morphologische Kriterien aus. Hierzu gehören u.a. die Kernschrumpfung, die Kondensation des Kernchromatins, die Fragmentierung des Zellkerns und die Ausbildung apoptotischer Körperchen infolge von Zellmembranausstülpungen [8].

2.1 Caspasen

Die Caspasen sind eine Familien von Proteasen, den sog. Cysteinyllaspartasen, und spielen eine zentrale Rolle bei der Exekution von Apoptosesignalen [9,10]. Ähnlich dem Komplementsystem sind sie in Form einer Kaskade angeordnet und entfalten ihre Wirkung in einer sich rasch amplifizierenden Kettenreaktion. Caspasen werden als enzymatisch inaktive Zymogene (Procaspasen) synthetisiert und liegen dann im Zytoplasma bzw. im Zellkern vor. Die Procaspasen-2, -8, -9 und -10 sind sog. Initiatorcaspasen. Sie sind Teil des DISC (*death inducing signaling complex*) und interagieren mit diesem über die N-terminal gelegene CARD (*caspase-recruitment domain*). Die enzymatische Aktivierung der Caspasen erfolgt durch (auto-)katalytische Spaltung. Im Falle der Initiatorcaspasen ist hierfür die Komplexbildung im DISC entscheidend, da nur so die erforderliche räumliche Nähe mehrerer Caspasemoleküle erreicht werden kann. Über diesen Mechanismus wird eine akzidentelle Aktivierung der Caspasekaskade, welche unweigerlich den unfreiwilligen Suizid der betroffenen Zelle zur Folge hätte, wirkungsvoll verhindert. Demgegenüber bilden die Procaspasen-3, -6 und -7 die Gruppe der Effektorcaspasen. Sie sind für die unumkehrbare Einleitung der Endphase der Apoptose verantwortlich (siehe Abschnitt 2.5). Im Gegensatz zu den Initiatorcaspasen sind die Effektorcaspasen auch als freie Tetramere aktiv [3,10].

Die Inhibition aktivierter Caspasen bzw. die Blockade der Caspaseaktivierung erfolgt durch IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*). Zu diesen zählen u.a. Survivin, cIAP1/2 und XIAP. Funktionell dienen diese Proteine vor allem der Vermeidung einer akzidentellen Caspaseaktivierung. IAPs wiederum werden durch die im Rahmen der Apoptoseexekution freigesetzten Proteine Smac/DIABLO (*second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI*), Omi/HtrA2 oder ARTS (*apoptosis-related protein in the TGF- β signaling pathway*) blockiert. Dies wiederum garantiert eine maximale und kurzfristige Amplifikation des Apoptosesignals [3,11-14] (siehe Abschnitt 2.5).

2.2 Extrinsischer und intrinsischer Apoptosesignalweg

Aus konzeptioneller Sicht können zwei Apoptosesignalwege, der extrinsische und der intrinsische Weg, voneinander abgegrenzt werden [3,15] (**Abbildung 2.1**).

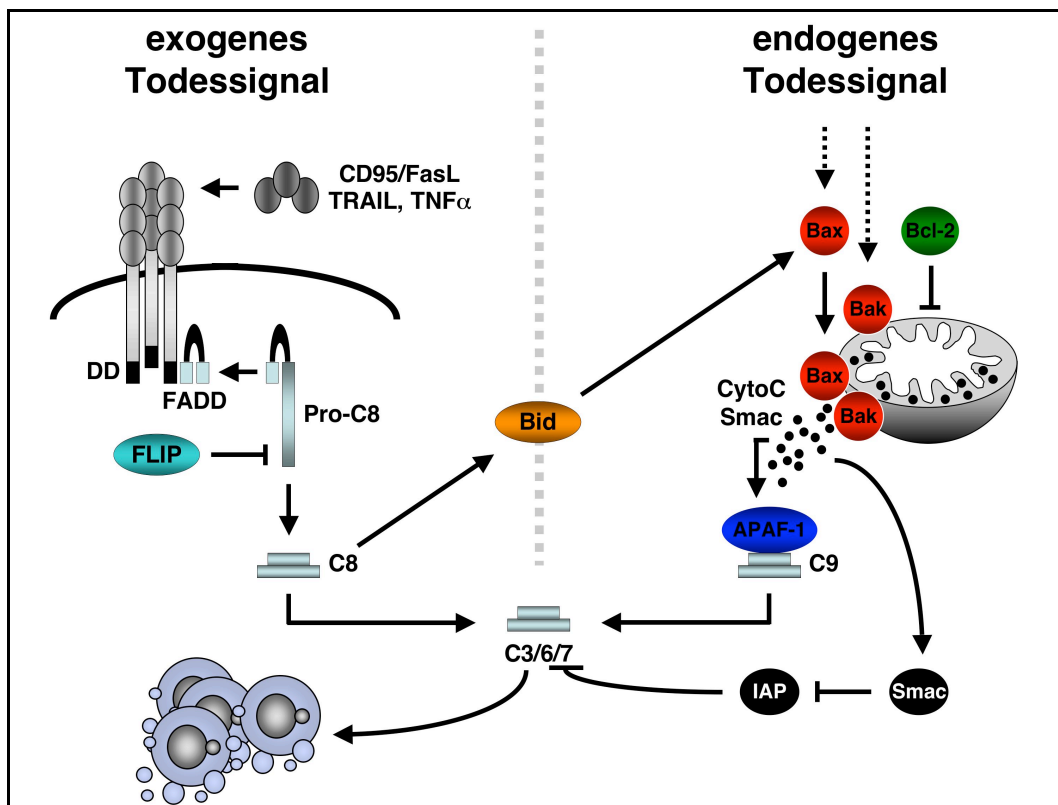


Abbildung 2.1: Extrinsischer und intrinsischer Apoptosesignalweg. Der extrinsische Apoptosesignalweg wird über die Ligation von Todesrezeptoren angestoßen. Hierdurch wird die Initiatorcaspase-8 (C8), rekrutiert und aktiviert. Der Komplex aus Todesrezeptor, Todesligand, FADD und Procaspase-8 wird als DISC (death inducing signaling complex) bezeichnet. Die aktivierte Caspase-8 vermittelt die Spaltung von Effektorcaspasen, z.B. der Procaspase-3 (C3). Der intrinsische Apoptosesignalweg wird über endogene Signale ausgelöst. Vermittelt durch BH3-only Proteine kommt es zur Aktivierung von Bax und/oder Bak, die dann in die äußere Mitochondrienmembran inserieren und Cytochrom c, (d)ATP sowie andere Faktoren freisetzen. Die Initiatorcaspase-9 (C9) bildet gemeinsam mit dem Adapterprotein APAF-1, Cytochrom c und (d)ATP den mitochondrialen DISC, welcher die Aktivierung der Effektorcaspase-3, -6 oder -7 vermittelt. Letztere werden durch IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*) gehemmt. Diese wiederum werden durch Smac (*second mitochondrial activator of caspases*) blockiert. Smac wird ebenfalls aus Mitochondrien freigesetzt. Der extrinsische und der intrinsische Apoptosesignalweg sind über das BH3-only Protein Bid verbunden: Caspase-8 vermittelt die Spaltung von Bid zu tBid (trunkiertes Bid). Hierdurch wird Bax aktiviert und der mitochondriale Apoptosesignalweg angeschaltet.

Der extrinsische Apoptosesignalweg wird über die Aktivierung Zellmembran-gebundener Rezeptoren, den sog. Todesrezeptoren, ausgelöst. Hierzu zählen der Tumornekrosefaktor- α (TNF α) Rezeptor 1 (TNF-R1), CD95 (APO-1, Fas), die TRAIL-Rezeptoren DR4 (*death receptor 4*, TRAIL-R1), und DR5 (TRAIL-R2) sowie DR3 und DR6. Der extrinsische Apoptosesignalweg dient primär der Vermittlung externer Todessignale. Hierbei spielt die Bindung von Todesliganden, z.B. CD95/FasL, TNF α oder TRAIL (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*), eine essenzielle Rolle. Todesliganden induzieren die Trimerisierung von Todesrezeptoren. Hierdurch kommt es zur intrazellulären Rekrutierung von Adaptermolekülen, z.B. FADD (*Fas associated death domain*), RIP (*receptor interacting protein 1*) oder RAIDD (*Rip-associated ICH-1/Ced3-homologous protein with a death domain*) an den Todesligand/-rezeptorkomplex. Dies erfolgt über dessen intrazellulär gelegene Todesdomäne DD (*death domain*) und induziert die Bindung und konsekutive Aktivierung der Initiatorcaspase Procaspase-8 (bzw. Procaspase-10 oder Procaspase-2). Der Komplex aus Todesligand, Todesrezeptor, Adaptermolekül und Procaspase-8 wird als DISC bezeichnet. Durch die nachfolgende Aktivierung von Effektorcaspasen, z.B. Procaspase-3, -6 oder -7, wird dann unumkehrbar die Endphase der Apoptose eingeleitet. Eine kompetitive Hemmung des DISC über Verdrängung, z.B. der Procaspase-8 aus dem Komplex, wird durch die anti-apoptotischen FLIP-Proteine vermittelt [3,16-19].

Der intrinsische Apoptosesignalweg wird durch „innere“ (zelluläre) Signale aktiviert. Hierzu zählen u.a. Stresssignale wie DNA-Schädigung (nukleärer Stress), die Akkumulation fehlgefalteter Proteine (durch das endoplasmatische Retikulum (ER) vermittelter Stress) oder der Entzug von Wachstumsfaktoren. Ein wesentliches Charakteristikum des intrinsischen Apoptosesignalweges ist, dass er zellorganellspezifisch exekutiert wird. Eine zentrale Rolle hierbei spielen vor allem die Mitochondrien und das ER, aber auch der Zellkern und die Lysosomen. Der intrinsische Apoptosesignalweg wird durch die Mitglieder der Bcl-2 Familie reguliert [3,16,20,21] (siehe Abschnitt 2.3).

Der intrinsische und der extrinsische Signalweg sind u.a. direkt über das BH3-only Protein Bid miteinander vernetzt. Die Aktivierung von Bid zu tBid (trunkiertes Bid) erfolgt über die Spaltung durch Caspase-8 bzw. Caspase-3. tBid wiederum induziert die Aktivierung des intrinsischen (mitochondrialen) Apoptosesignalweges [22,23] (siehe Abschnitt 2.5).

2.3 Die Bcl-2 Genfamilie

Die Mitglieder der Bcl-2 Genfamilie stellen zentrale Regulatoren der Apoptose dar und werden ihrer Funktion nach in anti- und pro-apoptotische Familienmitglieder unterteilt [2,4,24]. Letztere gliedern sich entsprechend des Vorhandenseins spezifischer Bcl-2 Homologie (BH) Domänen wiederum in die Bax- und die BH3-only Subfamilie

(Abbildung 2.2). BH3-only Proteine sind dadurch charakterisiert, dass sie strukturelle Homologien nur innerhalb der BH3-Domäne aufweisen.

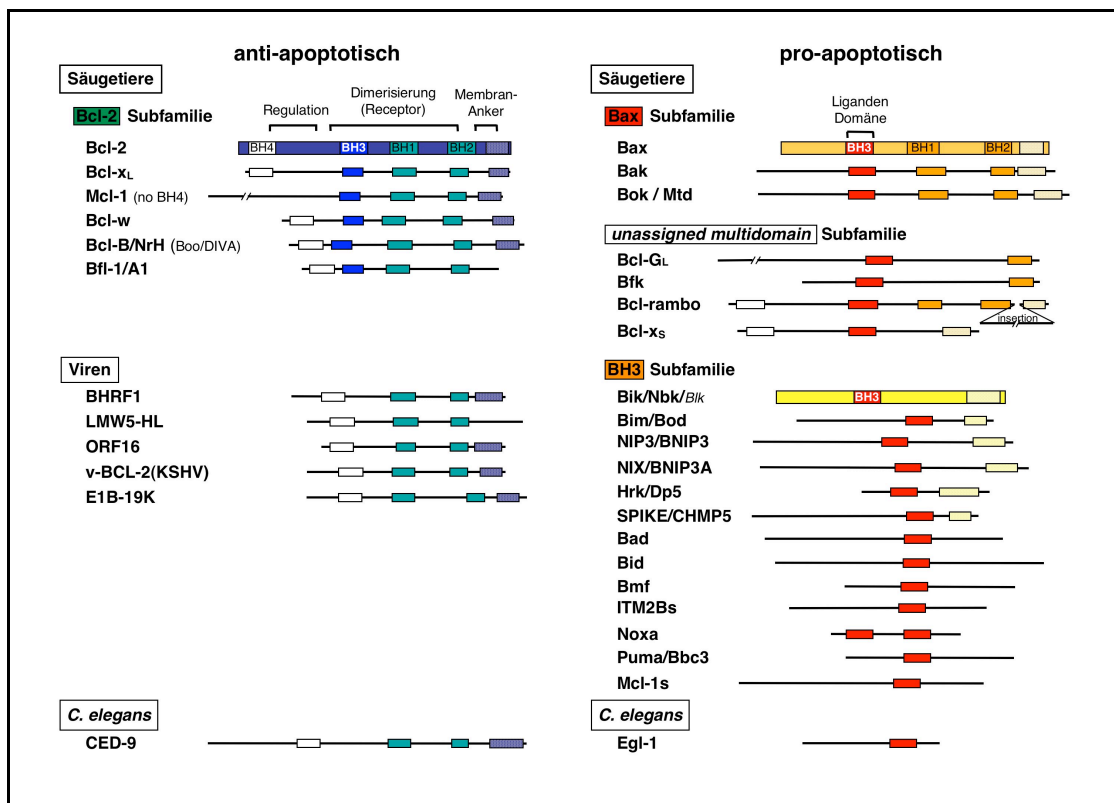


Abbildung 2.2: Die Bcl-2 Familie. Die anti-apoptotischen Familienmitglieder, z.B. Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 und A1, besitzen eine BH1, BH2, BH3 und eine BH4 Domäne. Die pro-apoptotischen Mitglieder Bax, Bak und Bok/Mtd haben BH1, BH2 und BH3 Domänen, während die BH3-only Proteine Homologien nur innerhalb der konservierten BH3-Domäne aufweisen.

Bcl-2, der Prototyp der anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine, wurde beim folliculären B-Zell Lymphom entdeckt. Die konstitutive Überexpression von Bcl-2 in diesen Zellen geht mit Apoptoseresistenz einher [25,26]. Darüber hinaus wird Bcl-2 in Brustdrüsen- und Prostataepithel, in Epithelien mit langlebigen Stammzellen, z.B. denen des Darms oder der Epidermis, sowie in nicht-proliferierenden Geweben, z.B. Neuronen, verstärkt exprimiert und wirkt dort Apoptose-hemmend. Vergleichbare Daten liegen für die anderen anti-apoptotischen Bcl-2 Homologe, z.B. Bcl-x_L und Mcl-1, vor [2,4,27].

Die pro-apoptotischen Bcl-2 Proteine Bax, Bak und Bok/Mtd (*Bcl-2-related ovarian killer/matador*) spielen eine essenzielle Rolle bei der Aktivierung, d.h. Permeabilisierung, der äußeren Mitochondrienmembran während der Initialphase der Apoptose. Hierbei kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c, (d)ATP und anderen Faktoren aus dem intermembranären Spalt, welche dann wiederum Caspasen aktivieren (siehe Abschnitt 2.2). Diese zentrale Funktion von Bax und Bak zeigt sich vor allem daran, dass Bax/Bak doppelt-defiziente Zellen nahezu vollständig resistent gegenüber pro-apoptotischen Stimuli sind, da ihnen die Fähigkeit zur Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien fehlt [28,29]. In zahlreichen

Modellsystemen wurde gezeigt, dass Bax und Bak redundante Funktion haben [16,27,28]. Hingegen belegen neuere Daten zur Apoptoseinduktion durch BH3-only Proteine, dass die differenzielle Aktivierung von Bax und/oder Bak weit komplexer ist. Diese wird vor allem durch das funktionelle Zusammenspiel der BH3-only Proteine mit den anti-apoptotischen Bcl-2 Homologen reguliert. Einerseits wird die Aktivität spezifischer BH3-only Proteine durch distinkte Apoptosestimuli induziert, andererseits wurde vor allem für die anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine ein Zelltyp-spezifisches Expressionsmuster gezeigt. Darüber hinaus wurde die präferenzielle Interaktion bestimmter BH3-only Proteine mit anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinen beschrieben, was die differenzielle Aktivierung von Bax und/oder Bak erklären könnte (siehe Abschnitt 2.4) [30-32]. Im Vergleich zu Bax und Bak ist der Stellenwert von Bok/Mtd bisher nur ansatzweise untersucht [33-36].

2.4 BH3-only Proteine

Die BH3-only Proteine nehmen eine besondere Stellung in der Apoptosesignalkaskade ein, da auf ihrer Stufe zahlreiche spezifische Apoptosesignale konvergieren. Im Vergleich zu Bax und Bak bzw. den anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern, weisen die BH3-only Proteine Homologien nur innerhalb der konservierten BH3-Domäne auf. BH3-only Proteine stellen Sensoren für eine Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Stresssignale dar und fungieren hierbei als übergeordnete Aktivatoren von Bax bzw. Bak [2,37,38] (**Abbildung 2.3**). Im Gegensatz zum Verlust von Bax und/oder Bak, der eine generelle Apoptoseresistenz vermittelt, bewirkt die Inaktivierung individueller BH3-only Proteine eine Resistenz gegenüber spezifischen Apoptosestimuli [2,38,39]. So vermittelt der Verlust von Bid eine Apoptoseresistenz nach Aktivierung von Todesrezeptoren [40]. Ferner wurde gezeigt, dass Bid auch an der Vermittlung von Apoptose nach DNA-Schädigung beteiligt ist [41,42]. Bim und Puma hingegen spielen eine wichtige Rolle bei der Elimination autoreaktiver bzw. Antigen-spezifischer T-Lymphozyten [43-46]. Apoptoseinduktion nach DNA-Schädigung, Hypoxie oder Expression von Onkogenen wird vor allem durch Puma bzw. Noxa vermittelt [47,48]. Auch tierexperimentelle Daten aus Puma *knock-out* Mäusen unterstreichen die essenzielle Funktion von Puma bzw. Noxa bei der Vermittlung p53-induzierter Apoptosesignale [49-51]. Neben der Regulation über einen p53-abhängigen Mechanismus, schützt der Verlust von Puma auch vor p53-unabhängiger Apoptoseinduktion [49]. Dies wurde u.a. für den Entzug von Wachstumsfaktoren und die Behandlung mit Glukokortikoiden, Staurosporin oder Phorbol ester gezeigt [40,52,53]. Zelltod nach Entzug von Wachstumsfaktoren, z.B. durch Serumentzug, bzw. Anoikis, wird u.a. auch durch Hrk bzw. Bmf vermittelt [54-57].

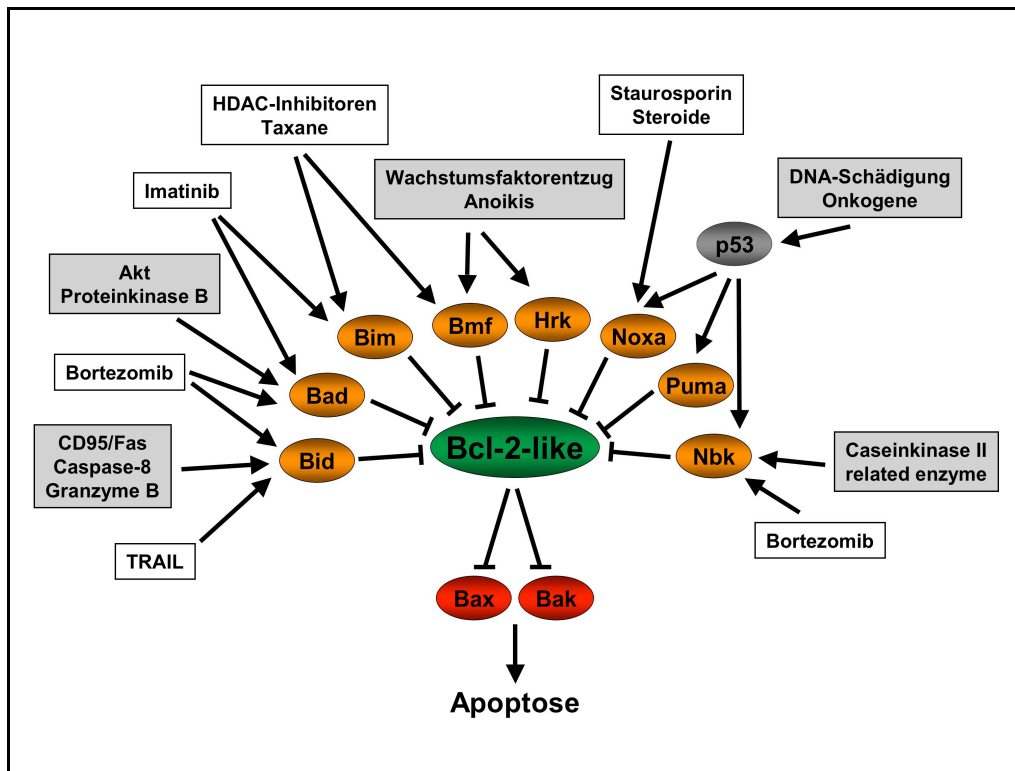


Abbildung 2.3: BH3-only Proteine - Sensoren zellulärer Stresssignale. Nach ihrer Aktivierung induzieren BH3-only Proteine Apoptose durch Interaktion mit anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinen (Bcl-2-like), z.B. Bcl-2, Bcl-x_L oder Bcl-w. Hierdurch kommt es zur Freisetzung pro-apoptotischer Bcl-2 Familienmitglieder, z.B. Bax und/oder Bak.

Ferner spielen BH3-only Proteine eine essenzielle Rolle bei der Vermittlung von Apoptose nach Exposition gegenüber Chemotherapeutika. Hierzu zählen nicht nur konventionelle Substanzen, sondern auch neue „molekulare“ Pharmaka, d.h. solche mit definierter biologischer Zielstruktur. So wird die toxische Wirkung von Spindelgiften, z.B. Taxanen oder Vinca-Alkaloiden, vor allem durch Bim und Bmf reguliert [52,58]. Die Tyrosinkinaseinhibitoren Imatinib und Gefitinib aktivieren Apoptose präferenziell über Bim und Bad [59-62]. Auch für den Proteasominhibitor Bortezomib und für Histondeacetylase-Inhibitoren wurde gezeigt, dass sie ihre toxische Wirkung über die BH3-only Proteine Bim, Nbk und Bmf ausüben. Im Gegenzug bewirkt der Verlust von Bim, Nbk und Bmf eine Resistenz gegenüber diesen Substanzen [58,63,64]. Schließlich ist der selektive Verlust spezifischer BH3-only Proteine für die Entwicklung und Progression maligner Tumore relevant. So begünstigt der Verlust von Bim die Lymphomentwicklung in *Eμ-myc* transgenen Mäusen [65,66]. Andere Arbeiten belegen, dass Nierenzellkarzinome einen selektiven Verlust der BH3-only Protein Nbk [67] und Bim [68] aufweisen. Der Verlust von Bmf beschleunigt die Entwicklung thymischer Lymphome nach ionisierender Bestrahlung [54]. Puma und Noxa vermitteln die Apoptose-induzierende Funktion von p53 [47,49,50]

Der genaue Wirkmechanismus der BH3-only Proteine wird kontrovers diskutiert [2,39]. Einerseits wurde gezeigt, dass BH3-only Proteine in hoher Affinität mit anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine, z.B. Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1, interagieren. In der Folge werden die an diese

gebundenen pro-apoptotischen Bcl-2 Proteine Bax oder Bak aus ihrer Bindung verdrängt (*displacement*) [30]. Hierdurch entfällt deren hemmender Einfluss auf Bax und Bak, so dass diese dann wiederum spontan eine aktivierende Konformationsänderung durchlaufen und Mitochondrien aktivieren können. Andererseits wird diskutiert, dass die BH3-only Proteine Bim, Bid und Puma Apoptose über direkte Bindung an Bax bzw. Bak aktivieren (*direct activation*) (**Abbildung 2.4**) [69-71].

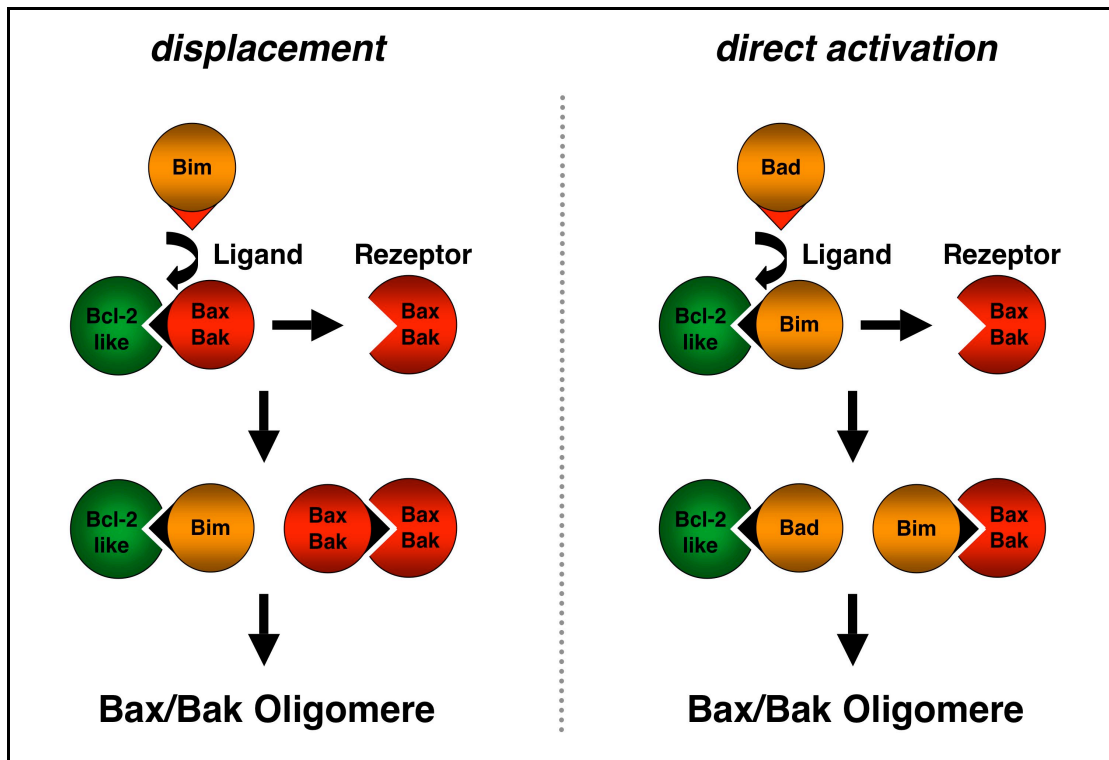


Abbildung 2.4: Wirkungsweise der BH3-only Proteine – *displacement versus direct activation*. Einerseits wurde gezeigt, dass BH3-only Proteine, z.B. Bim, Bax bzw. Bak aus ihrer Bindung zu anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinen verdrängen. Hierdurch wird eine (spontane) Konformationsänderung induziert in deren Folge Bax und/oder Bak aktiviert werden (*displacement*, links). Andererseits wird postuliert, dass die BH3-only Proteine Bim, Bid und Puma Apoptose durch direkte Aktivierung von Bax und/oder Bak auslösen (*direct activation*, rechts).

Während Bim und Puma pleiotrop wirken, weisen vor allem neuere Daten darauf hin, dass die meisten BH3-only Proteine selektiv mit anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinen interagieren: Bad und Bmf binden primär Bcl-2, Bcl-x_L und Bcl-w, Noxa scheint präferenziell Mcl-1 und Bfl-1/A1 aus der Bindung zu Bax und/oder Bak zu verdrängen [72]. Eine ähnliche Spezifität wird zwischen bestimmten pro- bzw. anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern vermutet [30,73]. Für Nbk wurde die selektive Aktivierung von Bax, nicht aber von Bak gefunden [31]. Mittlerweile gelang es, diesen Mechanismus aufzuklären: durch die Nbk-induzierte Stabilisierung des anti-apoptotischen Bcl-2 Homologs Mcl-1 kommt es zur selektiven Hemmung von Bak [32]. Weitere Arbeiten zeigten, dass das BH3-only Protein Nbk für Chemotherapie-induzierte Apoptose sensibilisiert [74,75]. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn p53 mutiert bzw. im Rahmen der Tumorgenese verloren gegangen ist [76,77].

Die an der Regulation der Expression und funktionellen Aktivität der BH3-only Proteine beteiligten Mechanismen sind in vieler Hinsicht ungeklärt [2,78]. Puma, Noxa und Hrk werden vor allem durch p53 transkriptionell reguliert [47,49]. Von Bim hingegen wurde die transkriptionelle Regulation über Mitglieder der *forkhead* Transkriptionsfaktorfamilie gezeigt [79]. Darüber hinaus wird die funktionelle Aktivität von Bim durch post-translationale Mechanismen beeinflusst. So werden Bim, aber auch Bmf, durch zytoskeletale Proteine, z.B. Mikrotubuli und Myosin-V Motorkomplexe, sequestriert [55,80]. Ferner wird die Aktivität der BH3-only Proteine über die selektive, häufig Zelltyp-spezifische Bindung an anti-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieder bestimmt [81,82]. Schließlich wird die Expression einzelner BH3-only Proteine durch proteasomale Degradation gesteuert [83-85]. Die post-translationale Modifikation spielt u.a. bei der Aktivierung von Bid, vermittelt durch Caspase-8-abhängige Spaltung, eine wichtige Rolle [22]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das BH3-only Protein Bad durch 14-3-3-Proteine sequestriert und damit funktionell inaktiviert wird [86,87].

2.5 Mitochondriale Apoptose und Exekution durch Caspasen

Mitochondrien sind wichtige Regulatoren und Verstärker von Apoptosesignalkaskaden [16,21]. Dabei spielt die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran eine entscheidende Rolle. Die hieran beteiligten Mechanismen sind jedoch in vielerlei Hinsicht unklar und werden kontrovers diskutiert [27,88]. Einerseits weisen zahlreiche Befunde auf die Poren-bildende Funktion der pro-apoptotischen Bcl-2 Proteine Bax und Bak hin [89,90]. Dem geht eine aktivierende N-terminale Konformationsänderung von Bax voraus. Dieser wiederum folgten die Translokation und die Insertion von Bax-Oligomeren in die äußere Mitochondrienmembran. Im Gegensatz zu Bax, welches primär zytoplasmatisch vorliegt, ist Bak konstitutiv in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und wird dort u.a. durch die Interaktion mit VDAC2 (*voltage-dependent anion channel 2*) gehemmt [91]. Auch Bak unterläuft eine aktivierende N-terminale Konformationsänderung, die von Oligomerisierung und Porenbildung gefolgt wird. Diese Prozesse bedingen letztlich die Freisetzung von Cytochrom c und anderer Faktoren, z.B. AIF, Hrk2, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 und Endonuklease G, aus dem intermembranären Spalt der Mitochondrien bzw. aus der mitochondrialen Matrix. Sekundär kommt es, durch den Einstrom von Ionen und Wasser, zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$). Über ein zunehmendes Anschwellen der Mitochondrien wird schließlich die Ruptur der äußeren und der inneren Membran ausgelöst [3,21,27]. Ferner scheinen eine Reihe weiterer Mechanismen an der Permeabilisierung von Mitochondrien beteiligt zu sein. Neben den von Bax und Bak gebildeten Kanälen wurden aus Bax/Bcl-2-Oligomeren bestehende Poren beschrieben [3,27,88]. Ferner können Bax und Bcl-2 spannungsabhängige Kanäle, wie z.B. den VDAC in der äußeren Mitochondrienmembran bzw. den ANT (*adenine nucleotide*

transporter) in der inneren Mitochondrienmembran, regulieren [88,91,92]. Schließlich wiesen neuere Daten darauf hin, dass die Fusion (*fusion*) und die Spaltung (*fission*) von Mitochondrien eine wichtige Rolle bei ihrer gezielten Aktivierung spielen [93].

Das während der Mitochondrienaktivierung freigesetzte Cytochrom c induziert in Verbindung mit (d)ATP und nachfolgender Bindung an die ced4-homologe Domäne des zytoplasmatischen Apoptoseaktivators APAF-1 dessen Konformationsänderung. Dies ermöglicht die Bindung der Procaspase-9 an die CARD-Domäne von APAF-1 [94]. Der Komplex aus APAF1, Cytochrom c, (d)ATP und Caspase-9 wird als mitochondrialer DISC bezeichnet [4]. Nach Aktivierung der Initiatorcaspase-9 werden konsekutiv die Effektorcaspasen-3, -6, und -7 proteolytisch gespalten und aktiviert. Diese degradieren schließlich eine Vielzahl regulatorischer und struktureller Proteine und leiten so unumkehrbar die Endphase der Apoptose ein [95,96]. Neben Cytochrom c wird u.a. auch Smac/DIABLO aus Mitochondrien freigesetzt. Hierdurch werden anti-apoptotische IAPs blockiert, was sowohl für intrinsische wie extrinsische Apoptosesignale sensibilisiert und für die Therapie von Tumorerkrankungen nutzbar gemacht werden kann [97-100]. Im Gegensatz zur Nekrose bleibt die Plasmamembranintegrität apoptotischer Zellen lange erhalten. Die verstärkte Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite erlaubt die rasche Elimination apoptotischer Zellen durch Phagozytose. Hierdurch wird eine Entzündungsreaktion des umgebenden Gewebes vermieden [101,102].

2.6 Caspase-unabhängiger und nicht-apoptotischer Zelltod

Neben den oben beschriebenen Caspase-abhängigen Mechanismen, weisen zahlreiche Untersuchungen auf die Existenz Caspase-unabhängiger programmierter Zelltodsignalwege hin [3,103,104]. Dabei können die oben beschriebenen morphologischen Kriterien der Apoptose zum Teil völlig fehlen. Auch „klassische“ Apoptosesignale können auf unterschiedliche Art ausgeführt werden. Es existieren demnach fließende Übergänge zwischen Apoptose und Nekrose. Diese wurden für Zelltod nach Exposition gegenüber $TNF\alpha$ oder nach DNA-Schädigung beschrieben [105]. Wird der ATP-Gehalt einer Zelle depletiert und gleichzeitig Apoptose induziert, kommt es zu einer Caspase-unabhängigen Zelltodform mit Nekrose-ähnlichem Zustand [106,107]. Hiervon abzugrenzen sind die nicht-apoptotischen Zelltodformen Nekrose, Autophagozytose (Autophagie) und mitotische Katastrophe. Letztere stellt eine aktiv regulierte Form des Zelltodes dar, welche der Elimination genetisch geschädigter Zellen, z.B. bei Störungen der DNA-Replikation/-reparatur oder nach Chromosomenfehlverteilung auftritt, dient [105]. Die mitotische Katastrophe ist nicht durch anti-apoptotische Bcl-2 Homologe hemmbar und verläuft Caspase-unabhängig [103]. Sie wird von Aneuploidie begleitet und ist morphologisch u.a. durch Kernschwellung und die Ausbildung von Mikronuklei charakterisiert [108].

3. Regulation des Zellzyklus

Der Zellzyklus beschreibt eine wiederkehrende Sequenz von Ereignissen, welche die komplette und fehlerfreie Duplikation der DNA und die anschließende Teilung der Zelle in zwei Tochterzellen zum Ziel hat. In eukaryotischen Zellen ist das Zellzyklusintervall als die Zeitspanne vom Abschluss der Mitose der Mutterzelle bis zum Abschluss der Mitose(n) der Tochterzelle(n) definiert. Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen wird in vier Phasen eingeteilt: die Gap-Phase 1 (G1-Phase), die Synthese-Phase (S-Phase), die Gap-Phase 2 (G2-Phase) und die Mitose-Phase (M-Phase). Letztere wird wiederum in die Metaphase, die Anaphase und die Interphase unterteilt. Ruhende, sich nicht teilende Zellen befinden sich in der Gap-Phase 0 (G0-Phase) des Zellzyklus [109-111].

Die strikte Abfolge sowie die intakte und engmaschige Regulation der vier Phasen des Zellzyklus einschließlich der Wahrnehmung von Fehlern bei der DNA-Duplikation und der Verteilung der Chromosomen auf die zwei Tochterzellen sind essenzielle Voraussetzung für die Wahrung der genetischen Stabilität eines Organismus.

Tumorzellen sind durch eine Deregulation des Zellzyklus charakterisiert. In Abhängigkeit vom Typ der Störung zeigt sich dies entweder in einer „unplanmäßigen“ oder unkontrollierten Proliferation von Zellen oder in genomischer (GIN) bzw. in chromosomaler Instabilität (CIN) [112-114] (**Abbildung 3.1**).

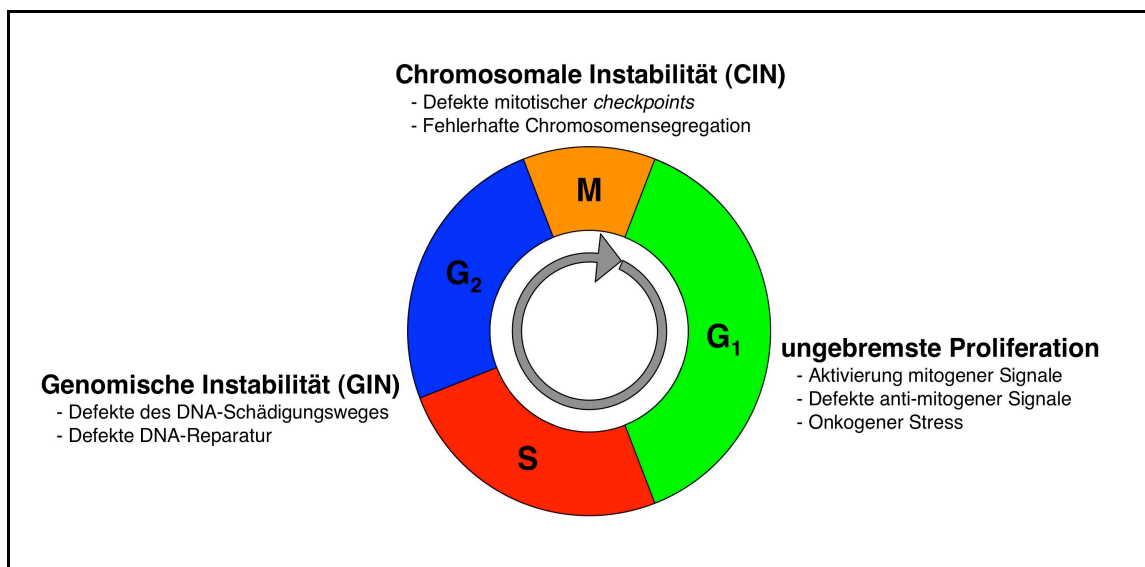


Abbildung 3.1: Deregulation des Zellzyklus. Die Aktivierung mitogener Signale bzw. defekte anti-mitogene Signale induzieren eine „unplanmäßige“ und ungebremste Proliferation von Zellen. Demgegenüber resultieren Defekte in der DNA-Reparatur oder im DNA-Schädigungssignalweg in genomischer Instabilität (GIN). Chromosomale Instabilität (CIN) wird durch Defekte mitotischer Checkpunkte oder durch fehlerhafte Chromosomensegregation ausgelöst.

Der korrekte Ablauf des Zellzyklus und die Wahrnehmung von Regulationsstörungen werden durch die sequenzielle Aktivierung bzw. Deaktivierung von Zellzyklus-Restriktionspunkten (*checkpoints*) gewährleistet. Zellzyklus-Restriktionspunkte sind funktionell definiert als

„Mechanismen, welche den vollständigen und fehlerfreien Abschluss eines Zellzyklusabschnittes überwachen und das Übertreten der Zelle in die nächste Zellzyklusphase erst danach erlauben“ [112,115-118]. Diese Mechanismen beinhalten einerseits die Kontrolle des bisherigen Fortschreitens in der entsprechenden Zellzyklusphase. Andererseits erlauben sie die Integration exogener (Wachstumssignale, Energieversorgung, Zell-Zell-Kontakt) und endogener Signale (Auftreten von DNA-Schädigung, Expression von Onkogenen oder Tumorsuppressoren). Zellzyklus-Restriktionspunkte operieren vornehmlich an den Übergängen der vier Zellzyklusphasen. Der DNA-Schädigungs-Restriktionspunkt (*DNA-damage checkpoint*) wiederum arretiert Zellen in derjenigen Zellzyklusphase, in welcher der Schaden wahrgenommen wird. Er dient vor allem der Abwehr konstant einwirkender exogener und endogener DNA-schädigender Noxen, z.B. ionisierende Strahlung, UV Strahlung, freie Radikale, chemische Noxen inkl. Chemotherapeutika. Neben der Induktion eines Zellzyklusarrestes, dienen Zellzyklus-Restriktionspunkte auch der Auslösung von Reparaturmechanismen oder, wenn nötig, der Aktivierung von Zelltodprogrammen [111,114].

3.1 Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) und Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren (CKI)

Die Cycline A, B, D, und E spielen eine essenzielle Rolle bei der Regulation der Zellzyklusprogression eukaryotischer Zellen. Ihre Expression variiert mit dem Zellzyklus, d.h. sie erfolgt Zellzyklusphasen-spezifisch [119,120]. Während die Cycline vom Typ D vor allem für die Progression durch die G1-Phase des Zellzyklus erforderlich sind, wird das Fortschreiten des Zellzyklus in der S-Phase hauptsächlich durch die Cycline vom Typ E gesteuert. Die Cycline vom Typ A regulieren präferenziell die Progression des Zellzyklus in der G2-Phase, wohingegen die Mitose durch die Cycline vom Typ B gesteuert wird. Die Expression der Cyclin-abhängigen Kinasen CDK1, CDK2, CDK4 und CDK6 oszilliert nicht, d.h. sie weisen im Verlauf des Zellzyklus ein weitgehend konstantes Expressionsniveau auf [114,121]. Die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen wird durch die Bindung der entsprechenden Cycline bestimmt [122,123]. Die Cyclin-abhängigen Kinasen sind daher auch nur in der (den) für sie spezifischen Phase(n) des Zellzyklus aktiv (**Abbildung 3.2**). Darüber hinaus tragen post-translationale Modifikationen, z.B. Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung, zur Steuerung der Aktivität Cyclin-abhängiger Kinasen bei [111,114,124].

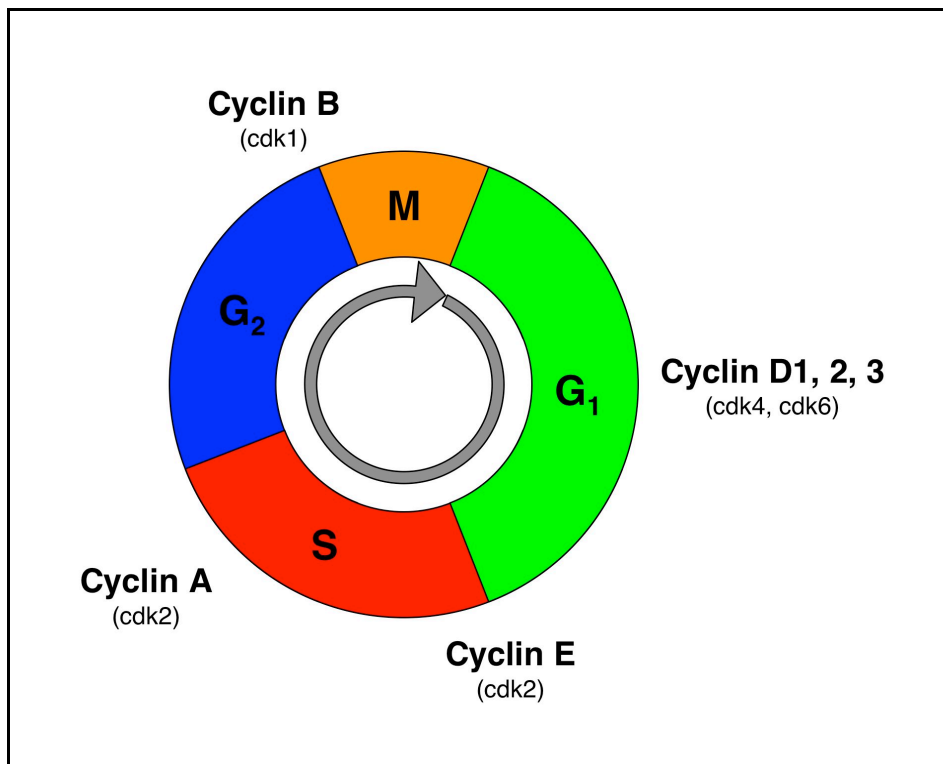


Abbildung 3.2: „Grundschema“ der Zellzyklusregulation. *Cycline regulieren die funktionelle Aktivität der entsprechenden Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK): G1-Phase: D-Typ Cycline, G1/S-Phase: E-Typ Cycline; S-Phase: A-Typ Cycline; G2/M-Phase: B-Typ Cycline. Vor allem hoch spezialisierte Zellen (hämatopoetische Zellen, Keimzellen, neuroendokrine Zellen) zeigen mitunter Abweichungen von diesem Grundschema.*

Der Beginn der G1-Phase des Zellzyklus wird durch eine rasch zunehmende Aktivität von CDK4 und CDK6 markiert. Diese wird durch die Hochregulation von D-Typ Cyclinen bestimmt und ist vor allem für das Fortschreiten in der frühen G1-Phase des Zellzyklus, aber auch für den Übergang in die S-Phase erforderlich. Die Expression der Cycline vom Typ D wird hauptsächlich durch exogene (z.B. Stimulation mit Wachstumsfaktoren), aber auch durch endogene Signale (Onkogenaktivierung, z.B. Expression von *RAS*) ausgelöst [114,125]. Mitogene Signale induzieren die Phosphorylierung des *Pocket*-Proteins Rb [126-128]. Hierdurch werden heterodimere Transkriptionsfaktoren, z.B. E2F/Dp, Myc/Max oder c-Jun/c-Fos, aus ihrer Bindung zu Rb freigesetzt und können dann ihrerseits die Expression S-Phase-spezifischer Gene anschalten [111,123,129]. Im Verlauf der G1-Phase des Zellzyklus kommt es zu einer zunehmenden Aktivierung der CDK2. Dies wird durch die Hochregulation von Cyclin E erreicht. Während die Aktivität von CDK4/6 beim Übertritt der Zellen in die S-Phase rasch abfällt, ist CDK2 im weiteren Verlauf der S-Phase aktiv. Vor allem die Initiation der DNA-Replikation wird durch Cyclin E-CDK2 Komplexe gesteuert [130]. Im zeitlichen Verlauf folgt dann die Aktivierung der CDK1, welche vor allem durch die langsame Akkumulation von Cyclin A im Verlauf der S-Phase ausgelöst wird. Im Gegensatz zu Cyclin E interagiert Cyclin A sowohl mit CDK1 und CDK2 und reguliert daher nicht nur die Progression des Zellzyklus in der G2-, sondern auch in der S-Phase. Mit Abnahme der

Expression von Cyclin E am Ende der S-Phase sinkt die Aktivität der CDK2 dann wieder ab [131,132]. Die Expression von Cyclin A hingegen sinkt erst beim Eintritt der Zellen in die Mitose ab. Das Durchlaufen der G2-Phase des Zellzyklus erfordert vor allem die Aktivität der CDK1. Neben der Hochregulation von Cyclin A wird dies durch zunehmende Expression von Cyclin B im Verlauf der G2-Phase des Zellzyklus gewährleistet. Die Expression von Cyclin B fällt jedoch in der M-Phase des Zellzyklus wieder ab. Am Übergang der G2-Phase in die Mitose bleibt die CDK1 Aktivität zunächst kurz erhalten, lässt aber dann mit der Komplettierung der Mitose nach. Dies fällt zeitlich mit der raschen Herunterregulation von Cyclin A und Cyclin B zusammen [111,114,123,131]. Die Regulation der Mitose ist komplexer und verläuft unter Beteiligung zahlreicher Proteinkomplexe, welche das Andocken des Spindelapparates und die nachfolgende korrekte Trennung der Schwesterchromatide erlaubt (siehe Abschnitt 3.2). In diesem Zusammenhang bemerkenswert ist, dass die Regulation des Zellzyklus in spezialisierten Zellen, z.B. den Zellen des hämatopoetischen Systems, in neuroendokrinen Zellen oder in Keimzellen, häufig von dem o.g. „Grundschema“ abweicht [111,114].

Die funktionelle Aktivität der Cyclin-CDK-Komplexe wird durch die Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren (CKI) blockiert. Diese werden in zwei Untergruppen unterteilt. Die CIP/KIP-Familie und die INK4-Familie. Zur CIP/KIP-Familie der CDK-Inhibitoren gehören $p21^{Cip1/WAF-1}$, $p27^{Kip1}$ und $p57^{Kip2}$ [133-136]. CDK-Inhibitoren zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, sowohl Cycline wie auch die entsprechende Cyclin-abhängige Kinase zu binden und damit zu inaktivieren [111,114]. Die CDK-Inhibitoren der CIP/KIP-Familie wirken pleiotrop, d.h. sie können alle Cyclin-abhängigen Kinasen blockieren, auch wenn ihre Affinität zu Cyclin D-CDK4/6 bzw. Cyclin E-CDK2 am größten ist. Die CDK-Inhibitoren $p16^{INK4A}$, $p15^{INK4B}$, $p18^{INK4C}$ und $p19^{INK4D}$ gehören zur INK4-Familie der CDK-Inhibitoren [135,137,138]. Sie weisen eine hohe Spezifität für Cyclin D-CDK4/6 Komplexe auf und wirken daher nahezu ausschließlich in der G1-Phase des Zellzyklus. Aufgrund ihrer Wirkungsweise üben die CDK-Inhibitoren Tumorsuppressorfunktion aus [114,139,140].

Tumorzellen zeichnen sich durch die Akkumulation von Mutationen aus, welche u.a. eine ungebremste und deregulierte Proliferation erlauben. Neben der Blockade von Zelltodprogrammen beinhaltet dies die verstärkte oder gar konstitutive Aktivierung mitogener Signalwege sowie die verminderte oder aufgehobene Reaktion des Zellzyklus auf anti-proliferative Stimuli. Darüber weisen Tumorzellen meist ein variables Maß an genomischer (GIN) sowie chromosomaler Instabilität (CIN) auf. Die Deregulation des Zellzyklus bzw. die Inaktivierung von Zellzyklus-Restriktionspunkten ist daher ein zentrales Charakteristikum der meisten, wenn nicht gar aller Tumorzellen [112-114,139].

3.2 Zellzyklus-Restriktionspunkte

Zellzyklus-Restriktionspunkte stellen wichtige Kontrollmechanismen dar, welche verhindern sollen, dass fehlerhafte DNA an die Tochterzellen weiter gegeben wird. Sie dienen einerseits der Erkennung fehlerhafter DNA-Abschnitte, z.B. nach Einwirken DNA-schädigender Ereignisse wie energiereiche Strahlung oder chemische Noxen. Andererseits werden sie durch Fehler bei der DNA-Replikation ausgelöst. Durch die Aktivierung von Zellzyklusarrest, welcher die Reparatur fehlerhafter DNA-Abschnitte erlaubt, oder das Auslösen von programmiertem Zelltod, für den Fall, dass irreparable Schäden vorliegen, stellen Zellzyklus-Restriktionspunkte einen integralen Abwehrmechanismus des Organismus gegen genetische Instabilität dar. Im Gegenzug hat ein Versagen von *checkpoint* Funktionen deletäre Folgen und ist ein zentrales Charakteristikum maligner Tumorzellen [112-114].

Die Deregulation des G1/S-Restriktionspunktes ist einer der häufigsten anzutreffenden Aberrationen maligner Tumorzellen. Die Aktivierung des G1/S-Restriktionspunktes verhindert die Replikation geschädigter DNA und geschieht unter Vermittlung mehrerer Signalwege [114,139]. So kommt es nach Erkennung fehlerhafter DNA zunächst zur Aktivierung der Checkpoint Kinase CHK1. Diese wiederum phosphoryliert die Cdc25A Phosphatase, was zur raschen Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation der Cdc25A führt. Hierdurch wird einerseits die für das Fortschreiten der Zellen von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus erforderlich Aktivierung der CDK2 blockiert [141,142]. Andererseits verhindert die Degradation von Cdc25A das Aufladen der Cdc45 auf Chromatin, wodurch die Initiation der DNA Replikation durch mangelnde Rekrutierung von DNA-Polymerasen verhindert wird [143,144]. Darüber hinaus werden der G1- und der G1/S-Restriktionspunkt durch p53 aktiviert. Die Expression von p53 induziert die Hochregulation des CDK-Inhibitors p21, wodurch es, vermittelt über die Inhibition von Cyclin E-CDK2, zu einer Arretierung des Zellzyklus am G1/S-Phase-Übergang kommt [143,145]. Darüber hinaus blockiert p21 auch Komplexe aus D-Typ Cyclinen und CDK4/6. Dies wiederum verhindert die Phosphorylierung von Rb und die damit verbundene Freisetzung heterodimerer Transkriptionsfaktoren, wie E2F/Dp oder c-Jun/c-Fos aus ihrer Bindung zu Rb [126-128]. Auch induziert p53 die Expression und Aktivität pro-apoptotischer Gene, u.a. Puma, Noxa und Bax [47,49,146-149]. *G1/S-checkpoint* Signale wirken also über die duale Aktivierung des DNA-Schädigungssignalweges und des p53/Rb-Signalweges. Dies erklärt, warum die Inaktivierung dieses Zellzyklus-Restriktionspunktes ein wesentlicher Mechanismus bei der Entstehung und Progression von Tumoren ist [114,139,150].

Der S-Phase Restriktionspunkt verhindert die Duplikation beschädigter oder gebrochener DNA-Stränge, die dann in der folgenden Mitose-Phase genomische Instabilität (GIN) nach sich zöge. Die Aktivierung dieses Restriktionspunktes ist vor allem für DNA-Schädigung nach ionisierender oder ultravioletter Strahlung beschrieben [141,143]. Im S-Phase Restriktionspunkt sind vor allem zwei Signalwege miteinander verbunden: der ATM/ATR-

CHK1-Cdc25A Signalweg und der ATM-Nbs1-SMC1 Signalweg [151]. In Abhängigkeit vom Typ des DNA-Schadens werden zunächst ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und/oder ATR (*ataxia telangiectasia related*) aktiviert, die dann wiederum CHK1 und nachfolgend Cdc25A phosphorylieren (siehe oben). Darüber hinaus induziert der S-Phase Restriktionspunkt die ATM-vermittelte Phosphorylierung von Nbs1. Dies wiederum ist Voraussetzung für die Aktivierung des Nbs1-Mre11-Rad50 Komplexes. Ferner löst die Aktivierung von Nbs1 die Phosphorylierung des Cohesinproteins SMC1 durch ATM aus [152,153]. Andere Mediatoren, u.a. p53BP1, BRCA1, FANCD2 und MDC1, sind ebenfalls an der Aktivierung und Exekution des Intra-S-Phase *checkpoints* beteiligt [154].

Die Aktivierung des G2/M-Restriktionspunktes verhindert das Übertreten von Zellen mit geschädigter DNA von der G2-Phase des Zellzyklus in die Mitose. Dies ist u.a. relevant, wenn Schädigungen der DNA in der G2-Phase aufgetreten sind bzw. eine Reparatur fehlerhafter DNA vor Beginn der Mitose (noch) nicht abgeschlossen wurde [112,123]. Hierzu wird vor allem der Cyclin B-CDK1 Komplex blockiert [155,156]. Dies geschieht über die Aktivierung von ATM und/oder ATR. Diese induzieren die Checkpunkt-Kinasen CHK1 und CHK2, welche die Phosphorylierung der Cdc25C Phosphatase auslösen. Hierdurch wird die Bindung der Cdc25C an das 14-3-3sigma Protein und die nachfolgende proteasomale Degradation von Cdc25C induziert [157,158]. Durch die Herunterregulation der Cdc25C Expression und Aktivität kann dann die CDK1-Kinase nicht mehr dephosphoryliert werden. Der Komplex aus CDK1 und Cyclin ist daher inaktiv, so dass die Zelle in der G2-Phase des Zellzyklus arretiert und nicht in die Mitose übertreten kann. Zudem aktivieren ATM und ATR auch p53. Dies wiederum induziert einerseits die vermehrte Expression des CDK-Inhibitors p21. Durch die zusätzliche, p21-vermittelte Blockade der CDK1 wird der G2-Arrest weiter verstärkt. Andererseits löst p53 die vermehrte Expression von 14-3-3sigma aus. Hierdurch können Cyclin B-CDK1 Komplexe im Zytoplasma sequestriert und in der Folge proteasomal abgebaut werden [157,158] (**Abbildung 3.3**).

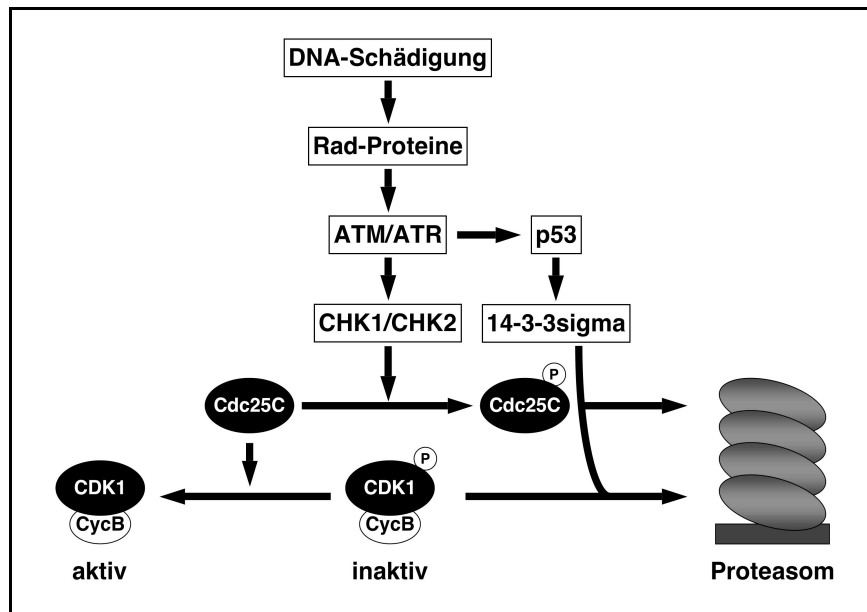


Abbildung 3.3: Der G2/M Restriktionspunkt. DNA-Schädigung induziert über die Aktivierung von ATM/ATR und CHK1/CHK2 die Phosphorylierung der Cdc25C Phosphatase. Diese wird vermehrt sequestriert und proteasomal degradiert. Hierdurch wird die Phosphorylierung der CDK1 herunterreguliert. Die Komplexe aus Cyclin B und CDK1 können nicht vollständig aktiviert werden, so dass die Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus arretieren. Auch die CDK1 wird, vermittelt durch 14-3-3sigma, vermehrt sequestriert und proteasomal degradiert.

Die korrekte Ausführung der Mitose mit symmetrischer Trennung der Schwesterchromatiden und Verteilung auf zwei Tochterzellen wird durch den M-Phase *checkpoint* reguliert [159]. Der Eintritt der Zellen in die Mitose-Phase des Zellzyklus wird durch die Aktivierung des APC/C (*anaphase promoting complex/cyclosome*) markiert. Der APC/C löst den proteasomalen Abbau regulatorischer Proteine aus. Hierzu zählen u.a. das Protein Pds1. Pds1 blockiert Cdc20, Esp1 und Cdc14 [160,161]. Durch die Herunterregulation von Pds1 entfällt dessen hemmende Wirkung auf Cdc20, welche dann an den APC/C bindet und aktiviert. Dies induziert den vermehrten Abbau von Cyclin B und vermittelt den Eintritt der Zellen in die Anaphase [162]. Die Stabilisierung von Esp1 aktiviert die Trennung der Schwesterchromatiden, während der Stabilisierung von Cdc14 die Dephosphorylierung von Cdh1 erlaubt [163]. Diese bildet dann wiederum einen Komplex mit dem APC/C und markiert das Ende der Mitose mit erfolgreicher Trennung der Schwesterchromatiden [164]. Sind zu Beginn der Mitose freie Kinetochore vorhanden oder liegt eine Störung des Spindelapparates vor, werden Mitose-hemmende Signalwege aktiviert. Diese erfolgen über die Bub-Kinasen, Mad-Proteine und Pds1. BubR1, Bub3 und Mad2 bilden den MCC (*mitotic checkpoint complex*). Dieser wird während der Interphase gebildet und verhindert die Segregation der Chromosomen und damit das Fortschreiten der Mitose durch Blockade des APC/C [165,166]. Andererseits wird Securin nicht degradiert, wodurch die Hemmung der Separase erhalten bleibt und die Schwesternchromatiden nicht getrennt werden können [159].

4. Der p14^{ARF} Tumorsuppressorsignalweg

p14^{ARF} (p19^{ARF} in der Maus) wird gemeinsam mit dem Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitor p16^{INK4A} am humanen *CDKN2A* (*INK4A/ARF*) Genlokus auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 (9p21) kodiert [167-169]. Durch die Nutzung unterschiedlicher Exons 1 (p16^{INK4A}: Exon 1 α ; p14^{ARF}/p19^{ARF}: Exon 1 β) und einer damit verbundenen Verschiebung des Leserasters (ARF = Alternative Reading Frame) kommt es trotz überlappender Nukleotidsequenzen (gemeinsames Exon 2) zur Bildung zweier Proteine, welche sich sowohl strukturell wie funktionell erheblich voneinander unterscheiden [168-170]. Gemeinsam mit Rb und p53 bilden p14^{ARF} und p16^{INK4A} ein komplexes Signalnetzwerk, welches eine essenzielle Rolle bei der Vermittlung von Zellzyklusarrest, Apoptose und Seneszenz spielt [140,171-173] (**Abbildung 4.1**). Insbesondere schützt p14^{ARF} Zellen vor hyperproliferativen Stimuli, welche durch die Expression zellulärer oder viraler Onkogene, z.B. *C-MYC*, *RAS*, *v-ABL*, oder *E1A*, ausgelöst werden [174-178]. Die Deregulation des *INK4A/ARF* Tumorsuppressornetzwerkes, z.B. durch Verlust (Deletion, Mutation) oder funktionelle Inaktivierung (Promotormethylierung) seiner zentralen Signalwegskomponenten, ist ein wichtiges Charakteristikum der meisten, wenn nicht gar aller malignen Tumore [140,179].

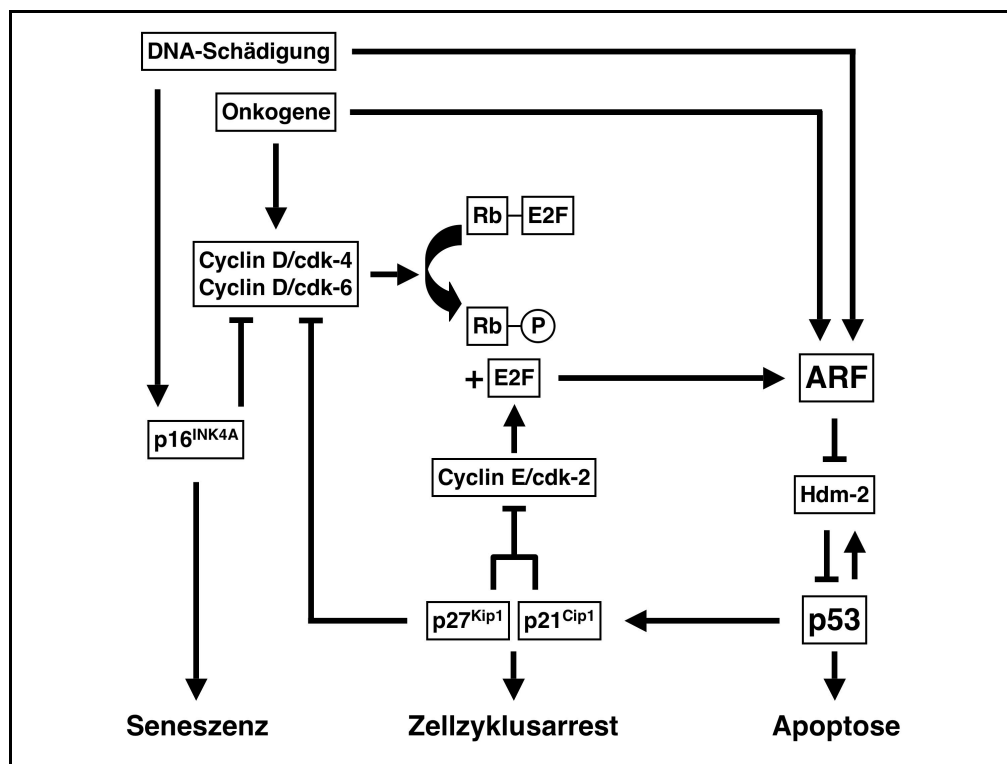


Abbildung 4.1: Das *INK4A/ARF* Tumorsuppressornetzwerk. DNA-Schädigung und Onkogenexpression aktivieren komplexe, teils überlappende Signalwege, welche die Induktion von Seneszenz, Zellzyklusarrest und Apoptose erlauben. Diese werden über p16^{INK4A}- bzw. p14^{ARF}/p19^{ARF}-vermittelte Aktivierung des Rb- und des p53-Signalweges weitergeleitet.

4.1 Der ARF-Hdm-2-p53 Signalweg

In den meisten normalen adulten Geweben wird p14^{ARF} sowohl auf mRNA-, wie auch auf Proteinebene kaum bzw. gar nicht exprimiert. Unter physiologischen Bedingungen wird die Expression von p14^{ARF} durch zelluläre oder virale Onkogene, z.B. *C-MYC*, *RAS*, *E2F*, *E1A*, oder *v-ABL*, bzw. durch zellulären Stress, z.B. DNA-Schädigung, Hypoxie oder Serumentzug, innerhalb weniger Stunden transkriptionell induziert [174-178,180]. Das p14^{ARF} Tumorsuppressorprotein wiederum bindet an Hdm-2 (Mdm-2 in der Maus), eine E3-Ubiquitinligase, die als wichtigster Antagonist von p53 gilt. Hierdurch wird die proteasomale Degradation von Hdm-2 induziert [176,181], was im Gegenzug die physikalische Stabilisierung von p53 durch verminderten proteasomalen Abbau bewirkt [182,183]. Dies wiederum geht mit einer vermehrten Aktivierung von p53-Zielgenen, z.B. Puma, Bax oder p21, einher, wodurch dann Apoptose bzw. Zellzyklusarrest ausgelöst werden (**Abbildung 4.2**).

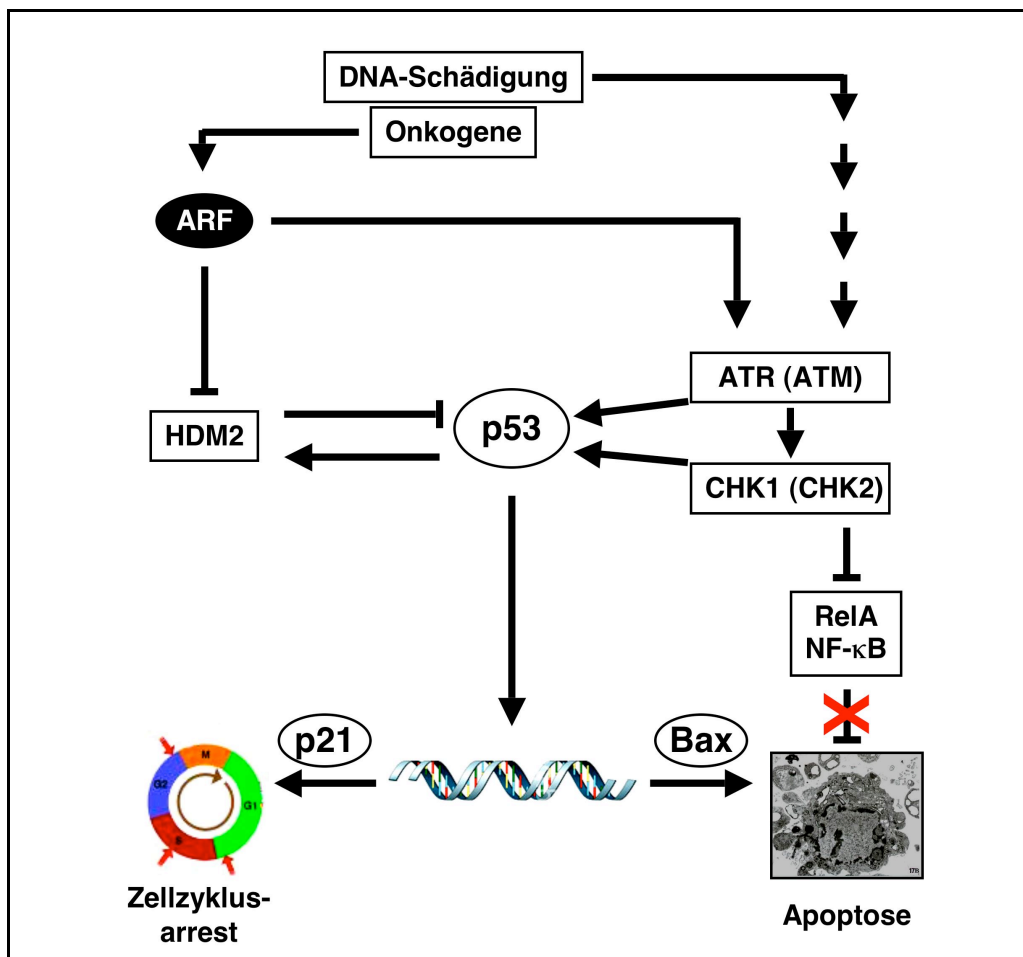


Abbildung 4.2: Der p14^{ARF}-Hdm-2-p53 Signalweg. Die Expression von Onkogenen führt zur p14^{ARF}/p19^{ARF}-vermittelten Stabilisierung von p53. Dies geschieht über die Blockade von Hdm-2 (Mdm-2). Hierdurch werden p53 Zielgene, z.B. p21, Puma oder Bax, angeschaltet. Die Aktivierung von p53 nach DNA-Schädigung wird u.a. auch durch ATM/ATR vermittelt. Durch Blockade des NF-κB Signalweges kommt es zur verminderter Expression Apoptosehemmender Gene, z.B. Mcl-1 oder Bcl-x_L, wodurch die Apoptose-induzierende Funktion von p14^{ARF} weiter verstärkt wird.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass p14^{ARF} auch eine zentrale Rolle bei der Vermittlung von DNA-Schädigungssignalen spielt [184-186]. Durch die p14^{ARF}-vermittelte Aktivierung von ATM und/oder ATR kommt es zur Induktion der Checkpointkinasen CHK1 und CHK2. Diese wiederum vermitteln einerseits die Aktivierung von p53 (u.a. über Phosphorylierung des Aminosäurerestes Serin-15), andererseits kommt es über Phosphorylierung des Aminosäurerestes Threonin-505 von RelA (p65) zur Blockade des NF-κB Signalweges [187,188]. Im Gegenzug bewirkt die verminderte Expression Apoptose-hemmender Gene, z.B. Mcl-1 oder Bcl-x_L, wodurch die Apoptose-induzierende Funktion von p14^{ARF} weiter verstärkt wird.

4.2 p53-unabhängige Signalwege

Initiale Befunde zeigten, dass Mutation von p14^{ARF} (p19^{ARF}), p53 und Hdm-2 (Mdm-2) *in vivo* nur sehr selten gemeinsam auftreten. Dies ließ vermuten, dass p14^{ARF} (p19^{ARF}), p53 und Hdm-2 (Mdm-2) in einer linearen Signalkaskade liegen. Dennoch weisen zahlreiche neuere Arbeiten darauf hin, dass p14^{ARF} Proliferation, Zelltod und Seneszenz auch über p53-unabhängige Signalwege reguliert [189,190]. So ist bemerkenswert, dass sich das Tumorspektrum in Mäusen, in denen p19^{ARF}, p53 und Mdm-2 durch bi-allelische Deletion inaktiviert sind (*triple knock-out*), deutlich von dem unterscheidet, was in Tieren, die nur eine (*single knock-out*) bzw. zwei (*double knock-out*) Gen-Inaktivierungen tragen, auftritt [191]. Ferner wurde in einem Mausmodell zur Onkogen-induzierten Tumorgenese gefunden, dass p19^{ARF} die Progression und Metastasierung *H-RAS*-induzierter Tumore über einen p53/mdm2-unabhängigen Signalweg hemmt [192]. Diese Befunde legen nahe, dass p19^{ARF}/p14^{ARF} eine p53/mdm2-unabhängige (Tumorsuppressor-) Funktion besitzt [189].

Auf zellbiologischer Ebene wurde gefunden, dass es durch Expression von p19^{ARF} in p53-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) gelingt einen Zellzyklusarrest zu induzieren [191,193]. Nachfolgende Arbeiten zeigten, dass ein Arrest in der G1- und in der S-Phase des Zellzyklus durch die p14^{ARF}-vermittelte, p53-unabhängige Degradation des Transkriptionsfaktors E2F ausgelöst wird [194-196]. Ferner wurde u.a. durch Arbeiten unserer Gruppe gezeigt, dass es durch Expression von p14^{ARF} gelingt, einen p53/p21-unabhängigen Zellzyklusarrest in der G2-Phase des Zellzyklus zu induzieren [197-199]. Im Gegensatz zum strikt p53/p21-vermittelten Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus wird dieser über die Blockade der CDK1-Kinase (Cdc2) und der Cdc25C-Phosphatase ausgelöst. Dies legt nahe, dass p14^{ARF} Zellzyklusarrest u.a. auch durch Aktivierung des DNA-Schädigungssignalweges auslöst [200,201]. In diesem Zusammenhang wurde auch gefunden, dass p14^{ARF} über die Aktivierung von ATM/ATR und der nachgeschalteten Checkpointkinasen CHK1/CHK2 einen Zellzyklusarrest induziert. Darüber hinaus wird Apoptose durch Blockade des NF-κB Signalweges begünstigt [184-188]. Als eine der ersten Gruppen konnten wir zeigen, dass die Aktivierung des

mitochondrialen Apoptosesignalweges nach Adenovirus-vermittelter Expression von p14^{ARF} unabhängig von p53 und dem pro-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglied Bax ist [202]. Dies wurde durch nachfolgende Arbeiten anderer Gruppen bestätigt [203-205].

Auch wenn auf mechanistischer Ebene die, an der Vermittlung p53-unabhängiger Effekte beteiligten Signalwege größtenteils unverstanden sind, scheinen vor allem Veränderungen in der subzellulären Lokalisation sowie die gesteigerte proteasomale Degradation zahlreicher Proteine nach Bindung an p14^{ARF} eine wichtige Rolle zu spielen. Hiervon betroffen sind u.a. Transkriptionsfaktoren, z.B. E2F/DP1 [194-196] oder HIF-1 α [206], transkriptionelle Repressoren, z.B. BCL6 und p120^{E4F} [207-209], sowie Topoisomerase I [210,211]. Neben Hdm-2/Mdm-2 interagiert p14^{ARF}/p19^{ARF} auch mit ARF-BP1/Mule, einer E3-Ubiquitinligase [212,213]. Ähnlich Hdm-2 (Mdm-2) reguliert ARF-BP1/Mule den proteasomalen Abbau zahlreicher Proteine. Hierzu zählen u.a. auch die Mitglieder der Bcl-2 Familie, insbesondere Mcl-1. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Expression von p14^{ARF}/p19^{ARF} die kovalente Bindung zahlreicher Proteine an SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) bewirkt [214-218]. Ähnlich der Kopplung an Ubiquitin, beeinflusst die Bindung an SUMO den intrazellulären Transport und den proteasomalen Abbau dieser Proteine [219]. Darüber hinaus steuert p14^{ARF} die zelluläre Proteinbiosynthese durch Kontrolle der ribosomalen RNA-Prozessierung. Dies geschieht über die Sequestrierung von Nucleophosmin (NPM) [210,220-223]. In diesem Zusammenhang bemerkenswert ist, dass die bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) mit normalem Karyotyp häufige NPM-Mutation NPMc+ in der Lage ist p14^{ARF} im Zytoplasma zu sequestrieren und damit funktionell zu inaktivieren [224-226]. Welchen Einfluss dies auf die Kontrolle Apoptose- bzw. Zellzyklus-regulierender Gene hat, wurde bisher jedoch nur ansatzweise untersucht [227,228]. Darüber hinaus reguliert p19^{ARF} die trans-aktivierende und trans-reprimierende Funktion des C-MYC Onkoproteins im Rahmen eines negativen Rückkopplungsmechanismus und übt somit direkten Einfluss auf die Proliferation und die Apoptosesensitivität von Tumorzellen aus [229].

Ein p53/Bax-unabhängiger, durch Bcl-x_L hemmbarer mitochondrialer Apoptosesignalweg, welcher nach Expression von p14^{ARF} aktiviert wird, wurde als erstes durch unsere Gruppe beschrieben [202]. Weiterhin zeigten wir, dass die pro-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder Bax und Bak nach Expression von p14^{ARF} abhängig vom p53-Status der Zelle differenziell aktiviert werden [230]. In aktuellen Arbeiten fanden wir, dass die differenzielle Regulation bestimmter BH3-only Proteine nach Expression von p14^{ARF} nicht nur maßgeblichen Einfluss auf die Apoptosesensitivität dieser Zellen hat, sondern auch an der o.g. gezielten Aktivierung von Bax und/oder Bak entscheidend beteiligt ist [231]. Ferner gelang es uns zu zeigen, dass die Sensibilität des mitochondrialen Apoptosesignalweges nach Expression von p14^{ARF} durch die Zellzyklusregulatoren p21 und 14-3-3sigma moduliert wird. Insbesondere fanden wir, dass der Verlust von p21 und/oder 14-3-3sigma für die Induktion von mitochondrialer Apoptose nach Expression von p14^{ARF} sensibilisiert. Neben

ihrem direkten Einfluss auf die Zellzyklusprogression, scheinen p21 und 14-3-3sigma auch direkt an der Regulation der mitochondrialen Apoptosesensitivität nach Expression von p14^{ARF} beteiligt zu sein [200,232]. Hinsichtlich der p53-unabhängigen Kontrolle des Zellzyklus fanden wir Hinweise für die funktionelle Relevanz des DNA-Schädigungssignalweges. So geht aus Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hervor, dass p14^{ARF} die Zellzyklusprogression in der G2/M-Phase durch Herunterregulation der CDK1-Kinaseaktivität steuert [185,197,198] (siehe Abschnitt 6).

4.3 Tumorbiologische Relevanz des p14^{ARF} Signalweges

Zahlreiche Befunde belegen, dass die funktionelle Inaktivierung des ARF-Signalweges eine hohe tumorbiologische Relevanz hat, d.h. eine wichtige Rolle bei der Entstehung und/oder Progression maligner Tumore spielt. Dies liegt vor allem daran, dass zahlreiche zelluläre oder virale Onkogene, z.B. *C-MYC*, *v-ABL*, *E1A* und *RAS*, Zellzyklusarrest, Apoptose bzw. Seneszenz über die p14^{ARF}-vermittelte Aktivierung des *INK4A/ARF*-Tumorsuppressor-netzwerkes auslösen [175-178]. So legten bereits erste Erkenntnisse zur Wirkungsweise von p14^{ARF}/p19^{ARF} in tierexperimentellen Modellen nahe, dass die Blockade p19^{ARF}-vermittelter Signale an der Entstehung und Progression Onkogen-getriggelter maligner Lymphome beteiligt ist. So spielt die (spontane) Inaktivierung des p19^{ARF}-Mdm-2-p53 Signalweges eine essenzielle Rolle bei der Entstehung und Progression, d.h. Akzeleration, *C-MYC*-induzierter B-Zell Lymphome *in vivo* [174,233]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass *INK4A/ARF*-Mutationen die Lymphomentwicklung durch Vermittlung von Therapieresistenz (über die Inaktivierung von p53) weiter verstärken [234]. In diesem Zusammenhang wurde auch beim Menschen gefunden, dass der Verlust bzw. die aberrante zytoplasmatische Expression von p14^{ARF} in aggressiven B-Zell Lymphomen des Erwachsenen mit einem ungünstigen Verlauf assoziiert ist [235,236]. Ähnliche Befunde liegen für das pädiatrische (sporadische) Burkitt-Lymphom [237], das Mantelzell-Lymphom [238] und primäre Lymphome des Zentralnervensystems [239,240] vor. Auch bei anderen Neoplasien des lymphatischen Systems, z.B. bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL), sind Veränderungen des p14^{ARF}-Signalweges anzutreffen. So wurde gezeigt, dass Alterationen der p14^{ARF} Expression ein wichtiges Charakteristikum von T-Zell Leukämien des Erwachsenen sind [241,242]. Während der Verlust der p14^{ARF} Expression bei B-Zell-Leukämien des Kindesalters klinisch-prognostische Relevanz hat [243], wurde dies bei der ALL des Erwachsenen bisher nicht bestätigt [244,245]. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist jedoch, dass der Verlust von p14^{ARF} das Ansprechen auf den Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib über die Blockade des BH3-only Proteins Bim verhindert [246,247]. Dies wiederum sollte entscheidenden Einfluss auf den Verlauf und die Prognose von Patienten mit Philadelphia-Chromosom positiver ALL oder chronischer myeloischer Leukämie (CML) haben. Bei der

AML wurde gezeigt, dass das aus der Translokation t(8;21) resultierende Fusionsprotein AML1/ETO die Expression von p14^{ARF} auf transkriptioneller Ebene supprimiert. Dies geschieht durch Bindung von AML1/ETO an den p14^{ARF} Promotor und die nachfolgende Aktivierung von Ko-Repressoren und Histondeacetylasen [248,249]. Ähnliche mechanistische Befunde liegen für das CBF β /MYH11 (*core binding factor beta/smooth muscle myosin heavy chain*) Fusionsprotein vor, welches aus der AML-typischen Inversion des Chromosoms 16 resultiert [250]. In diesem Zusammenhang wurde auch gezeigt, dass die Verminderung bzw. der Verlust der p14^{ARF} Expression bei Patienten mit AML mit einer ungünstigen Prognose verbunden ist [251,252]. Kürzlich wurden Mutationen von NPM1 als häufigste (molekular-) genetische Aberration bei Patienten mit AML und normalem Karyotyp beschrieben [226,227]. NPM1 ist ein nukleäres Phosphoprotein, welches essenzielle Funktion beim Transport prä-ribosomaler Partikel hat und permanent zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern ausgetauscht wird [253]. Durch Mutation im C-terminal gelegenen nukleären Lokalisationssignal (NLS) wird dieser Austausch blockiert. In der Folge kommt es zu einer permanenten zytoplasmatischen Lokalisation des mutierten NPM1 Proteins (NPMc+) [226,254]. NPM1 ist ein wichtiger Bindungspartner von p14^{ARF} [255-257] und reguliert dessen Stabilität und Funktion [258-261]. Die Expression von NPMc+ könnte also zur (partiellen) Inaktivierung des p14^{ARF} Tumorsuppressors führen, was wiederum für die Pathogenese der AML relevant sein könnte. Bemerkenswert ist, dass Patientin mit NPMc+-positiver AML eine günstige Prognose haben, sofern andere zyto- bzw. molekulargenetische Aberrationen fehlen [226,262]. Die Analyse der funktionellen Interaktion zwischen p14^{ARF}- und NPM/NPMc+-vermittelten Signalwegen ist somit höchst relevant und Gegenstand aktueller Untersuchungen [263,264]. Desweiteren scheint die funktionelle Inaktivierung von p14^{ARF} bei der CML am Übergang von der chronischen Phase in die Akzeleration bzw. Blastenkrise bedeutsam zu sein. Auch spielt die Deletion von p14^{ARF} bei der Ausbildung von Therapieresistenz gegenüber Interferon- α oder dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib eine essenzielle Rolle [247,265-268].

Darüber hinaus liegen bei einer Reihe von soliden Tumoren Befunde vor, die belegen, dass die Inaktivierung des p14^{ARF}-Signalweges klinisch-prognostische Bedeutung hat. So wurde gezeigt, dass bis zu 50% aller nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome einen Verlust der p14^{ARF} Expression aufweisen [269-271]. Dies wird meistens durch (Hyper-) Methylierung des p14^{ARF} Promotors bei gleichzeitiger Deletion eines der beiden Chromosomen 9p verursacht [272,273]. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist, dass in der Hälfte der Fälle eine gleichzeitige Mutation des p53 Tumorsuppressors vorliegt [271,274]. Dies wiederum unterstreicht, dass p14^{ARF} und p53 nicht zwangsläufig in einem strikt linearen Tumorsuppressorsignalweg liegen [189,271,275] (siehe Abschnitt 4.3). Gleichsam wurde bei bis zu 35% aller Mammakarzinome ein Verlust der Expression von p14^{ARF} gefunden [276-278]. Dieser wird am häufigsten durch Deletion von Chromosom 9p,

Promotormethylierung bzw. Überexpression des Transkriptionsfaktors TBX3 verursacht [276,278,279]. Auch hier besteht keine strenge Korrelation zwischen der Expression von p14^{ARF} und p53 [280]. Beim Kolonkarzinom wurde ebenfalls in bis zu 65% aller Fälle ein Verlust der Expression von p14^{ARF}, verursacht durch aberrante Promotormethylierung, gefunden [281,282]. Die ungünstige Prognose, vor allem bei gleichzeitigem Verlust der p16^{INK4A} Expression, könnte mit dem häufigeren Auftreten von Lymphknotenmetastasen und durch die verstärkte Vaskularisierung des Tumorgewebes in p14^{ARF}-defizienten Tumoren erklärt werden [283]. Bei bis zu 45% aller Blasenkarzinome vom Übergangszelltyp wurde eine bi-allelische Deletion des Exon 1 β von p14^{ARF} gefunden. Auch beim Magenkarzinom vom diffusen Typ wurde in bis zu 45% aller Tumore ein Verlust der Expression von p14^{ARF} nachgewiesen. Dieser wird sowohl durch Deletion wie auch durch Methylierung des p14^{ARF} Promotors hervorgerufen und könnte die ungünstige Prognose dieses Magenkarzinom-Subtyps über die Ausbildung von Therapieresistenz zum Teil erklären [284]. Auch andere Tumoren des oberen Gastrointestinaltraktes, z.B. das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus [285-288] und das Mundbodenkarzinom [289-292], zeigen in bis zu 75% aller Fälle eine funktionelle Inaktivierung des p14^{ARF} Tumorsuppressorsignalweges. Die zentrale Rolle einer Inaktivierung von p14^{ARF} und/oder p16^{INK4A} wird auch bei der Genese des duktales Pankreaskarzinoms vermutet. Besonders tierexperimentelle Daten belegen, dass die Deletion von *INK4A* und die gleichzeitige Aktivierung von *K-RAS*, welche ein wichtiges transformierendes Ereignis bei dieser Tumorentität darstellt, kooperieren und die sehr ungünstige Prognose dieses Tumortyps erklären [293-296]. Ähnliche Befunde zur klinisch-prognostischen Relevanz von p14^{ARF} liegen u.a. beim Nierenzellkarzinom [297], beim Prostatakarzinom [242], bei Kopf-Hals-Tumoren [298], bei Sarkomen [299,300] und bei Plattenepithelkarzinomen der Haut [301] vor.

5. Fragestellung und Zielsetzung

Der p14^{ARF} Tumorsuppressorsignalweg spielt eine zentrale Rolle bei der Induktion von Apoptose, Zellzyklusarrest bzw. Seneszenz und schützt Zellen vor Onkogen-induzierter Transformation. Initial publizierte Daten zur Wirkungsweise von p14^{ARF} ließen vermuten, dass sowohl die Apoptose- wie auch die Zellzyklus-regulierende Funktion von p14^{ARF} strikt an die Anwesenheit einer funktionellen p53/Hdm-2 Signalkaskade gebunden sind. Dennoch wiesen nachfolgende Arbeiten darauf hin, dass p14^{ARF} auch in Abwesenheit von p53 und/oder Mdm-2 (Hdm-2) Apoptose bzw. Zellzyklusarrest zu induzieren vermag. Die hieran beteiligten Signalwege waren jedoch gänzlich unbekannt.

Ein wesentliches Ziel der Arbeit war es daher, die an der Vermittlung der p53-unabhängigen Funktionen von p14^{ARF} beteiligten Signalwege zu identifizieren, diese zu charakterisieren und auf funktioneller Ebene zu dissezieren. Da die Inaktivierung des p14^{ARF} Tumorsuppressorsignalweges bei der Genese und Progression maligner Tumore sowie bei der Entwicklung von Apoptoseresistenz eine zentrale Rolle spielt, wurde ein besonderer Schwerpunkt auf die Analyse dieses Signalweges in humanen Tumorzelllinien gelegt.

Im Gegenzug könnte es durch funktionelle Reaktivierung des p14^{ARF} Signalweges gelingen, apoptoseresistente Tumorzellen gegenüber apoptotischen Stimuli zu sensibilisieren. Die Exploration des p14^{ARF}-Signalweges ist somit für die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapiestrategien höchst relevant. Mittels aktuell durchgeführter Arbeiten soll daher auch die Möglichkeit der funktionellen Rekonstitution von p14^{ARF} *in vitro* untersucht werden. Darüber hinaus zielen weitere Untersuchungen auf die (funktionelle) Analyse von Aberrationen des p14^{ARF}-Signalweges in klinisch relevanten hämatologischen Neoplasien und soliden Tumoren ab. Diese dienen vor allem der Untersuchung der klinisch-prognostischen Relevanz einer Deregulation des p14^{ARF}-Signalweges bei Tumorerkrankungen des Menschen.

6. Eigene Ergebnisse

Zunächst wurde ein adenovirales Vektorsystem zur Expression von humanem p14^{ARF} etabliert und funktionell charakterisiert. Im Vergleich zu anderen Expressionssystemen liegt der besondere Vorteil der Adenovirus-vermittelten Expression darin, dass es gelingt eine sehr effiziente Transduktion der Zielzellen sowie ein ausreichend hohes Expressionsniveau des Transgens zu erreichen.

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden hauptsächlich in genetisch definierten Defektmutanten, z.B. in p53-profizienten *versus* p53-defizienten, in Bax-profizienten *versus* Bax-defizienten bzw. in p21-profizienten *versus* p21-defizienten Zellen, durchgeführt. Ferner wurden zur Analyse der funktionellen Relevanz einzelner Defekte zahlreiche Sublinien hergestellt, in denen mutierte, deletierte oder funktionell inaktive Signalwegskomponenten, z.B. Bax, durch Reexpression des entsprechenden Wild-Typ Gens funktionell rekonstituiert wurden.

6.1. Die Expression des p14^{ARF} Tumorsuppressors induziert p53- und Bax-unabhängige Apoptose

(Hemmati PG, Gillissen B, von Haefen C, Wendt J, Stärck L, Güner D, Dörken B, and Daniel, PT: Adenovirus-mediated expression of p14^{ARF} induces p53 and Bax-independent apoptosis. *Oncogene* May 2002; 21(20):3149-61.

Der p53/Bax-Signalweg spielt eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der intrinsischen Apoptosesignalkaskade. Initial publizierte Daten zur Wirkungsweise von p14^{ARF} zeigten, dass p53 eine essenzielle Rolle bei der Vermittlung der p14^{ARF}-induzierten Apoptose spielt. Dennoch wiesen nachfolgende Untersuchungen darauf hin, dass p14^{ARF} auch in p53/mdm-2-defizienten Zellen eine Tumorsuppressorfunktion besitzt. Wir untersuchten daher, ob die Expression p14^{ARF} in p53-defizienten humanen Tumorzellen Apoptose induziert.

Hierzu wurde zunächst ein adenovirales Vektorsystem zur Expression von humanem p14^{ARF} etabliert und funktionell charakterisiert. Wie erwartet, gelang es mittels Expression von p14^{ARF} in humanen p53/Rb-profizienten U-2OS Osteosarkomzellen Apoptose zu induzieren. Weitergehende Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Expression von p14^{ARF} auch in p53-defizienten SAOS-2 Osteosarkomzellen sowie in DU145 Prostatakarzinomzellen, welche eine dominant-negativ wirkende p53 Mutation tragen, Apoptose auslöste. Dies ließ vermuten, dass die p14^{ARF}-induzierte Apoptose in humanen Tumorzellen nicht an die Anwesenheit von funktionellem p53 gekoppelt ist. Die Bestätigung dieser Befunde erfolgte dann in einem zweiten unabhängigen Tumorzelllinienmodell. In humanen HCT116 Kolonkarzinomzellen, in denen beide p53 Allele durch somatische homologe Rekombination

deletiert wurden (HCT116-p53^{-/-}), zeigten wir, dass die Apoptose nach Expression von p14^{ARF} im Vergleich zu isogenen p53-profizienten HCT116 Zellen (HCT116-p53^{+/+}) nicht abgeschwächt ist.

DU145 Prostatakarzinomzellen tragen neben der o.g. dominant-negativ wirkenden p53-Mutation auch eine Mutation des pro-apoptotischen Bax Gens, welche zu einer Verschiebung des Leserasters (*frameshift*) führt. Da das zweite Bax Allel deletiert ist, sind DU145 Zellen vollständig Bax-defizient. Dies wiederum ließ vermuten, dass die Apoptose-induzierende Wirkung von p14^{ARF} nach Expression in DU145 Zellen nicht nur p53- sondern auch Bax-unabhängig abläuft. Um den Einfluss von pro-apoptotischem Bax auf die p14^{ARF}-induzierte Apoptose weiter zu untersuchen, wurde Bax mittels eines retroviralen Vektors in Bax-defiziente DU145 Zellen wieder eingebracht. Während die Wiederherstellung der Bax-Expression eine sensibilisierende Wirkung gegenüber Zytostatika-induzierter Apoptose hatte, wiesen wir keinerlei Einfluss der Reexpression von Bax auf die Apoptoseinduktion nach Expression von p14^{ARF} nach. Diese völlige Bax-Unabhängigkeit der p14^{ARF}-induzierten Apoptose wurde wiederum in einem zweiten unabhängigen System humaner Tumorzellen bestätigt. So zeigten wir, dass die Expression von p14^{ARF} in Bax-defizienten HCT116 Kolonkarzinomzellen (HCT116-Bax^{-/-}) im Vergleich zu isogenen Bax-profizienten HCT116 Zellen (HCT116-Bax^{+/+}) nicht abgeschwächt ist. Durch Expression von anti-apoptotischem Bcl-x_L gelang es jedoch, p14^{ARF}-induzierte Apoptose zu hemmen.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die p14^{ARF}-induzierte Apoptose in humanen Tumorzellen nicht an eine funktionelle p53/Bax-Signalkaskade gebunden ist. Stattdessen weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass es mittels Expression von p14^{ARF} gelingt, die intrinsische Apoptosesignalkaskade über einen p53/Bax-unabhängigen Signalweg zu aktivieren. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist, dass die Reexpression von Bcl-x_L den p14^{ARF}-induzierten mitochondrialen Apoptosesignalweg blockiert.

6.2 Pro-apoptisches Bak kompensiert den Verlust von Bax bei der p14^{ARF}-induzierten mitochondrialen Apoptose

(Hemmati PG, Güner D, Gillissen B, Wendt J, von Haefen C, Chinnadurai G, Dörken B, and Daniel PT: Bak functionally complements for loss of Bax during p14^{ARF}-induced mitochondrial apoptosis in human cancer cells. *Oncogene* Oct 2006; 25(50):6582-94.

Vorangehende Untersuchungen zur p14^{ARF}-induzierten Apoptose zeigten, dass die Expression von p14^{ARF} einen Bax-unabhängigen Apoptosesignalweges auslöst. Dieser wird über die Aktivierung von Mitochondrien vermittelt und ist durch Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 Homologis Bcl-x_L hemmbar. Dies ließ vermuten, dass der Verlust bzw. die funktionelle Inaktivierung von Bax durch das pro-apoptotische Bax Homolog Bak

wirkungsvoll kompensiert werden kann. Ziel dieses Ansatzes war es daher, den Stellenwert von Bax und Bak bei der Aktivierung der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade nach Expression von p14^{ARF} funktionell zu überprüfen.

Zunächst untersuchten wir, welchen Einfluss die Wiederherstellung der Bax Expression in p53/Bax-defizienten DU145 Prostatakarzinomzellen hat. Hierzu wurden mehrere Bax-rekonstituierte DU145 Zellklone gewählt, die sich durch ein unterschiedliches Bax Expressionsniveau voneinander unterscheiden. Während die Sensibilität gegenüber Zytostatika-induzierter Apoptose nach Reexpression von Bax in DU145 Zellen stark zunahm, hatte dies keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der Apoptoseinduktion nach Expression von p14^{ARF}. DU145 Zellen sind Bax-defizient, exprimieren jedoch Bak. Dies ließ vermuten, dass Bak den Verlust von Bax im Rahmen der p14^{ARF}-induzierten Apoptose kompensieren kann, während dies bei der Zytostatika-induzierten Apoptose nicht möglich ist. Um dies in einem zweiten unabhängigen Modell p53-profizienten Tumorzellen zu prüfen, wurde p14^{ARF} in genetisch modifizierte HCT116 Kolonkarzinomzellen eingebracht, die sich hinsichtlich der Expression von Bax bzw. Bak unterscheiden: Bax/Bak-profizient (HCT116-Bax+/Bak+), Bax-defizient/Bak-profizient (HCT116-Bax-/Bak+), Bax-profizient/Bak-defizient (HCT116-Bax+/Bak-) und Bax/Bak-defizient (HCT116-Bax-/Bak-). Während der Verlust von Bax oder Bak keinen Einfluss auf das Ausmaß der Apoptoseinduktion nach Expression von p14^{ARF} hatte, führte die gleichzeitige Deletion von Bax und Bak zu einer erheblichen Abschwächung der p14^{ARF}-induzierten Apoptose. Dies ging mit einer Hemmung der Aktivierung von Mitochondrien, d.h. mit der Blockade der Freisetzung von Cytochrom c und der nachfolgenden Aktivierung der Procaspase-9 und Procaspase-3/-7, einher. Bemerkenswert war jedoch, dass die Expression von p14^{ARF} auch in Bax/Bak-doppelt defizienten Tumorzellen Zelltod auslöste. Dieser war mit der Bax/Bak-unabhängigen Aktivierung von Caspasen verbunden und ging mit der vollständigen Inhibition des klonogenen Langzeitüberlebens dieser Zellen einher.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die p14^{ARF}-induzierte Apoptose sowohl in p53-profizienten, wie auch in p53-defizienten humanen Tumorzellen über den mitochondrialen Apoptosesignalweg abläuft. Während der Verlust von pro-apoptotischem Bax durch Bak im Rahmen der p14^{ARF}-induzierten Apoptose wirkungsvoll kompensiert wird, gelingt dies nicht für die Zytostatika-vermittelte Apoptose. Schließlich weisen unsere Daten darauf hin, dass die Expression von p14^{ARF} auch unabhängig von der Bax/Bak-vermittelten Aktivierung der Mitochondrien Zelltod auslöst. Dies geht mit der Spaltung von Caspasen einher und kann durch Blockade der Caspaseprozessierung mittels Caspaseinhibitoren gehemmt werden.

6.3 Genetische Dissektion des p14^{ARF}-induzierten Zelltodes: Schlüsselrolle des CDK-Inhibitors p21^{CDKN1} und des BH3-only Proteins Puma/bbc3

(Hemmati PG, Muer A, Overkamp T, Gillissen B, Wendt J, Dörken B, Daniel PT: Genetic dissection of p14^{ARF}-mediated cell death signaling reveals a key role for p21^{CDKN1} and the BH3-only protein Puma/bbc3. *Journal of Molecular Medicine* Jun 2010; 88(6):609-22

BH3-only Proteine, eine pro-apoptotische Subgruppe der Bcl-2 Familie, spielen eine zentrale Rolle der Vermittlung der Bax/Bak-abhängigen Aktivierung von Mitochondrien. Die bisher gewonnenen Daten zum Mechanismus der Apoptoseinduktion nach Expression von p14^{ARF} in p53-profizienten *versus* p53-defizienten humanen Tumorzelllinienmodellen ließen vermuten, dass die Regulation spezifischer BH3-only Proteine an der differentiellen Regulation des Bax- bzw. Bak-abhängigen Zelltodes beteiligt sind. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, welche BH3-only Proteine für die Aktivierung des p14^{ARF}-induzierten, p53-vermittelten mitochondrialen Apoptosesignalweges funktionell relevant sind.

Hierzu wurde p14^{ARF} in p53-profizienten HCT116 Kolonkarzinomzellen exprimiert und die mRNA Expression aller bekannten BH3-only Proteine mittels quantitativer *real-time* PCR im Zeitverlauf untersucht. Hier zeigte sich, dass es bereits 24 Stunden nach Expression von p14^{ARF} zu einer mehr als 5-fachen Induktion der Expression des BH3-only Proteins Puma kommt. Die transkriptionelle Hochregulation des Gens *puma* ging mit einem Anstieg der Puma Proteinexpression und der Induktion von apoptotischer DNA-Fragmentierung einher. Bemerkenswert war, dass HCT116-Zellen, in denen beide *puma* Allele durch somatische homologe Rekombination deletiert wurden (HCT116-Puma^{-/-}), nahezu vollständig resistent gegenüber der Apoptose-induzierenden Wirkung von p14^{ARF} waren. Diese Auswirkung des Verlustes von Puma auf die p14^{ARF}-induzierte Apoptose war besonders ausgeprägt in Zellen, in denen neben Puma auch der Zellzyklusregulator p21^{Cip1/WAF-1} deletiert war (HCT116-Puma^{-/-}/p21^{-/-}). Die Aktivierung eines Bax-abhängigen mitochondrialen Apoptosesignalweges wurde durch den Nachweis einer Aktivierungs-spezifischen Konformationsänderung des Bax Proteins, gefolgt von einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und der Aktivierung von Caspasen bestätigt. Die Relevanz des Verlustes von Puma im Vergleich zu anderen BH3-only Proteinen, z.B. Bim, Nbk, Noxa und Bad, erfolgte schließlich mittels funktioneller Rekonstitution von Puma in Puma-defizienten Zellen. Durch Reexpression von Puma ließ sich die Apoptosesensitivität Puma-defizienter Zellen gegenüber p14^{ARF} wieder vollständig herstellen. Bemerkenswert war ferner, dass der Verlust des Zellzyklusregulators p21 nur in Puma-profizienten, nicht aber in Puma-defizienten Zellen gegenüber der p14^{ARF}-induzierten Apoptose sensibilisiert.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass das BH3-only Protein Puma/bbc3 eine essenzielle Rolle bei der Aktivierung des Bax-vermittelten mitochondrialen Apoptosesignalweges nach Expression von p14^{ARF} spielt. Ferner belegen die Ergebnisse,

dass eine Deregulation des p21-vermittelten Zellzyklus-Restriktionspunktes die Aktivierung der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade verstärkt (siehe Abschnitt 6.5 und folgende).

6.4 Der Verlust von des CDK-Inhibitors p21^{Cip1/WAF-1} verhindert den p14^{ARF}-induzierten G1-Zellzyklusarrest und verstärkt p14^{ARF}-induzierte Apoptose in humanen Tumorzellen

(Hemmati PG, Normand G, Verdoodt B, von Haefen C, Hasenjäger A, Güner D, Wendt J, Dörken B and Daniel PT: Loss of p21 disrupts p14^{ARF}-induced G1 cell cycle arrest but augments p14^{ARF}-induced apoptosis in human carcinoma cells. **Oncogene** Jun 2005; 24(25):4114-28.

Der Zellzyklusregulator p21^{Cip1/WAF-1} spielt eine essenzielle Rolle bei der Vermittlung des p53-induzierten Arrestes in der G1-Phase des Zellzyklus. Die in den vorangehenden Arbeiten begleitend durchgeführten Untersuchungen zum Zellzyklusverhalten humaner Tumorzellen zeigten, dass p53-defiziente Zellen, z.B. SAOS-2, DU145 und HCT116-p53^{-/-}, nach Expression von p14^{ARF} keinen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus eingehen. Ursächlich hierfür könnte sein, dass die p53-vermittelte transkriptionelle Hochregulation des Zellzyklusregulators p21 nicht ablaufen kann. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss von p21 auf die Zellzyklus-regulierende Funktion des p14^{ARF} Tumorsuppressors zu untersuchen.

Um zu überprüfen, ob der p14^{ARF}-induzierte Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus an p53 und/oder p21 gekoppelt ist, wurde p14^{ARF} in isogenen p53-profizienten oder p53-defizienten (HCT116-p53^{+/+} oder HCT116-p53^{-/-}) bzw. in isogenen p21-profizienten oder p21-defizienten HCT116 Kolonkarzinomzellen (HCT116-p21^{+/+} oder HCT116-p21^{-/-}) exprimiert und anschließend das Zellzyklusverhalten untersucht. Hier zeigte sich, dass es nach Expression von p14^{ARF} ausschließlich in p53- und p21-profizienten Zellen gelingt, einen G1-Zellzyklusarrest auszulösen. Demgegenüber akkumulieren p53- oder p21-defiziente Zellen nach Expression von p14^{ARF} ausschließlich in der G2/M-Phase des Zellzyklus. In Zusammenschau mit den zuvor gewonnenen Daten bestätigt dies, dass die Fähigkeit von p14^{ARF} einen G1-Zellzyklusarrest zu induzieren strikt an die Anwesenheit einer funktionellen p53/p21-Signalkaskade gebunden ist.

Demgegenüber gelang es mittels der Expression von p14^{ARF} sowohl in p53-profizienten, wie auch in p53-defizienten HCT116- bzw. DU145 Karzinomzellen Apoptose zu induzieren. Weitergehende funktionelle Untersuchungen zeigten, dass die Expression von p14^{ARF} zur Aktivierung der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade führt. Dies ging mit dem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, der Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom c und der nachfolgender Aktivierung von Caspasen,

u.a. Caspase-9 und Caspase-3/-7, einher. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang war jedoch die Beobachtung, dass die Apoptosesensitivität p21-defizienter HCT116-p21^{-/-} Zellen im Vergleich zu p21-profizienten HCT116-p21^{+/+} Zellen nach Expression von p14^{ARF} erheblich gesteigert war.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass der p14^{ARF}-induzierte G1-Zellzyklusarrest nur in Anwesenheit einer funktionellen p53/p21-Signalkaskade ablaufen kann. Ferner kann abgeleitet werden, dass die Expression von p14^{ARF} sowohl in p53-profizienten wie auch in p53-defizienten Zellen den mitochondrialen Apoptosesignalweg aktiviert. Die Sensibilität der Tumorzellen gegenüber der p14^{ARF}-induzierten Apoptose wird durch den Verlust der Zellzyklus-regulierenden Funktion von p21^{Cip1/WAF-1} erheblich verstärkt. Schließlich weisen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten darauf hin, dass die durch Expression von p14^{ARF} aktivierten Signalwege für Zellzyklusarrest und mitochondriale Apoptose oberhalb von p53 dissoziieren.

6.5 Der p14^{ARF}-vermittelte G2-Zellzyklusarrest in p53- und p21-defizienten Zellen wird durch Hemmung der p34^{cdc2} (CDK1) Kinase vermittelt

(Normand G*, Hemmati PG*, Verdoodt B, von Haefen C, Wendt J, Güner D, May E, Dörken B and Daniel PT: p14^{ARF} induces G2 cell cycle arrest in p53- and p21-deficient cells by down-regulating p34^{cdc2} kinase activity. *The Journal of Biological Chemistry* Feb 2005, 280(8):7118-30.

* gemeinsame Erstautorenschaft

Die im Vorangehenden beschriebenen Ergebnisse zur Regulation des Zellzyklus durch p14^{ARF} zeigten, dass die Induktion eines G1-Zellzyklusarrestes nach Expression von p14^{ARF} durch p53 und p21 vermittelt wird. Demgegenüber beobachteten wir, dass es nach Expression von p14^{ARF} in p53- und/oder p21-defizienten Zellen (u.a. DU145, HCT116-p53^{-/-} oder HCT116-p21^{-/-}) zur Akkumulation von Zellen mit einem 4-fachen (4N) DNA-Gehalt kommt. Dies ließ vermuten, dass diese Zellen in der G2- oder in der Mitose-Phase des Zellzyklus arretieren. Die an der Regulation dieses p14^{ARF}-vermittelten G2/M-Zellzyklusarrestes beteiligten Signalwege waren jedoch gänzlich unbekannt und wurden daher weiter untersucht.

Die nachfolgenden Untersuchungen zum Zellzyklusverhalten p53/p21-defizienter Zellen nach Expression von p14^{ARF} erfolgten in den Tumorzelllinienmodellen DU145 (p53-defizient) und HCT116 (HCT116-p53^{+/+} und HCT116-p53^{-/-} bzw. HCT116-p21^{+/+} und HCT116-p21^{-/-}). Hier bestätigte sich, dass p53- bzw. p21-defiziente Zellen nach Expression von p14^{ARF} ausschließlich in der G2-Phase des Zellzyklus arretieren und im weiteren Verlauf nicht in die Mitosephase übertreten können. Dies zeigte sich u.a. daran, dass es nach

Expression von p14^{ARF} nicht zur Phosphorylierung des Mitose-spezifischen Proteins MPM-2 kommt. Weitergehende biochemische Analysen in den p14^{ARF}-exprimierenden, G2-arretierten Zellen ergaben, dass p14^{ARF} die Herunterregulation der CDK1- (p34^{cdc2}) Kinaseaktivität induziert. Dies ging mit einer Hemmung der Dephosphorylierung der CDK1 einher und wurde begleitet von einer aberranten, primär zytoplasmatischen Lokalisation des Proteins. Die funktionelle Relevanz dieser p14^{ARF}-vermittelten Hemmung der CDK1-Kinaseaktivität bei der Induktion des G2-Zellzyklusarrestes wurde mittels Reexpression einer konstitutiv aktiven CDK1 Mutante bestätigt. Hierdurch gelang es den p14^{ARF}-induzierten G2-Zellzyklusarrest aufzuheben. Dies wiederum ging mit einer massiven Induktion von apoptotischem Zelltod einher. Während eine direkte Interaktion zwischen p14^{ARF} und CDK1 mittels Ko-immunpräzipitation ausgeschlossen wurde, zeigten wir, dass die Expression von p14^{ARF} zu einer Hemmung der Proteinbiosynthese von CDK1 und zur Herunterregulation der „*up-steam*“ der CDK1 Kinase gelegen Cdc25C Phosphatase führt. Vor allem die Inhibition der Cdc25C Phosphatase erklärte auch, warum CDK1 nach Expression von p14^{ARF} nicht dephosphoryliert werden kann. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass p14^{ARF} in p53/p21-defizienten Zellen einen Arrest in der G2-Phases des Zellzyklus induziert, welcher primär über den DNA-Schädigungssignalweg, d.h. durch Hemmung der CDK1 Kinaseaktivität, vermittelt wird. Dies ist bemerkenswert und könnte Ausdruck eines bisher unbekanntem Schutzmechanismus (*fail-safe*) sein. Dieser könnte es Tumorzellen, die eine durch den Verlust von p53 und/oder p21 bedingte aberrante Zellzykluskontrolle am G1-Restriktionspunkt aufweisen, erlauben nach Aktivierung des p14^{ARF}-Signalweges in der G2-Phase des Zellzyklus zu arretieren.

6.6 Kooperativer Effekt von p21 und 14-3-3sigma auf Zellzyklusarrest und Apoptoseinduktion durch p14^{ARF}

(Hemmati PG, Normand G, Gillissen B, Wendt J, Dörken and Daniel PT: Cooperative effect of p21^{Cip1/WAF-1} and 14-3-3sigma on cell cycle arrest and apoptosis induction by p14^{ARF}. *Oncogene* Dec 2008; 27(53):6707-19.

In Vorarbeiten zeigten wir, dass der Verlust des Zellzyklusregulators p21^{Cip1/WAF-1} humane Tumorzellen gegenüber der p14^{ARF}-induzierten Apoptose sensibilisiert. Darüber hinaus fanden wir, dass p21-defiziente Zellen nach Expression von p14^{ARF} keinen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus eingehen. Stattdessen arretieren diese in der G2-Phase des Zellzyklus, was über die p14^{ARF}-vermittelte Hemmung der CDK1 Kinase vermittelt wird. Die Induktion eines stabilen Arrestes in der G2-Phase des Zellzyklus erfordert jedoch die funktionelle Aktivität des 14-3-3sigma Proteins. 14-3-3sigma-defiziente Zellen hingegen

können keinen stabilen Arrest in der G2-Phase des Zellzyklus eingehen. Wir untersuchten daher, welchen Einfluss die vollständige Deregulation des G2/M-Restriktionspunktes durch die kombinierte Inaktivierung des CDK-Inhibitors p21 und des G2/M Regulators 14-3-3sigma auf das Zellzyklusverhalten und die Apoptosesensitivität humaner Tumorzellen nach Expression von p14^{ARF} hat.

Die Expression von p14^{ARF} in p21-defizienten (HCT116-p21^{-/-}), 14-3-3sigma-defizienten (HCT116-sigma^{-/-}) bzw. in p21/14-3-3sigma doppelt-defizienten (HCT116-p21/14-3-3sigma^{-/-}) Zellen im Vergleich zu HCT116 Wild-Typ Zellen zeigte, dass der Verlust von 14-3-3sigma den p14^{ARF}-induzierten Arrest in der G2-Phase des Zellzyklus nicht verhindert. Während die Behandlung 14-3-3sigma-defizienter Zellen mit dem Topoisomerase II α -Inhibitor Epirubicin zur mitotischen Katastrophe führte, löste die Expression von p14^{ARF} in diesen Zellen mitochondriale Apoptose aus. Im Vergleich zu HCT116 Wild-Typ Zellen führte der Verlust von p21 oder 14-3-3sigma, besonders jedoch die kombinierte bi-allelische Deletion von p21 und 14-3-3sigma, zu einer massiven Erhöhung der Apoptosesensitivität dieser Zellen nach Expression von p14^{ARF}. Der p14^{ARF}-induzierten Apoptose in den p21 und/oder 14-3-3sigma-defizienten Zellen ging ein transienter Arrest in der G2-Phase des Zellzyklus voran. Dieser wurde durch die Herunterregulation der CDK1-Kinaseaktivität vermittelt. Im Vergleich zu 14-3-3sigma-profizienten Zellen, wurde der Eintritt in die Mitosephase in diesen Defektmutanten verhindert.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Expression von p14^{ARF} den distalen DNA-Schädigungssignalweg aktiviert. In Tumorzellen, in denen eine intakte G2/M-Restriktionspunktkontrolle durch Deletion bzw. funktionelle Inaktivierung von p53, p21 und 14-3-3sigma verhindert wird, führt dies zur raschen Induktion von apoptotischem Zelltod. Im Gegensatz dazu löst die Aktivierung des DNA-Schädigungssignalweges nach Exposition gegenüber Zytostatika mitotische Katastrophe aus. Ferner belegen diese Daten, dass sich die Deregulation des G2/M-Zellzyklusrestriktionspunktes maßgeblich auf die Apoptosesensitivität der Zielzellen auswirkt.

7. Diskussion

Der mitochondriale Apoptosesignalweg spielt eine zentrale Rolle bei der Vermittlung von Zelltod nach Expression des p14^{ARF} Tumorsuppressors. Erste Arbeiten unserer Gruppe hierzu zeigten, dass es mittels adenoviraler Expression von p14^{ARF} in humanen Tumorzellen gelingt einen p53/Bax-unabhängigen Apoptosesignalweg auszulösen. Dies war sowohl bei Vorliegen einer p53- bzw. Bax-Mutation, wie auch in Zellen, welche eine bi-allelische Deletion des p53- bzw. des Bax-Genes tragen, möglich und ging mit der Aktivierung der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade, d.h. mit dem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und der Spaltung von Caspasen, einher. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang war, dass die Aktivierung von Mitochondrien nach Expression von p14^{ARF} einerseits Bax-unabhängig verlief, andererseits jedoch durch Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 Homologs Bcl-x_L hemmbar war. Desweiteren war zu diesem Zeitpunkt völlig unklar, welche p53-unabhängigen Signalwege bei der Aktivierung der Mitochondrien nach Expression von p14^{ARF} relevant sind. Insbesondere die Funktion der p53-Homologe p63 und p73 und die des Bax-Homologs Bak waren bis dahin nicht untersucht und wurden daher in nachfolgenden Arbeiten funktionell diszeziert.

So gelang es uns zu zeigen, dass der Verlust von Bax in p53-profizienten Zellen durch das pro-apoptotische Bax-Homolog Bak nahezu vollständig kompensiert werden kann. Dies ist von hoher tumorbiologischer Relevanz, da zahlreiche Untersuchungen belegen, dass die funktionelle Inaktivierung der p53/Bax-Signalkasade ein häufiges Ereignis bei malignen Neoplasien des Menschen darstellt und, durch das Auslösen von Therapieresistenz, häufig prognostisch ungünstig ist. Bax/Bak-doppelt defiziente Zellen hingegen zeigen nach Expression von p14^{ARF} keine Aktivierung der Mitochondrien, gemessen am Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, der Freisetzung von Cytochrom c oder der Aktivierung der Procaspase-9. Dennoch sind diese Zellen nicht vollständig resistent gegenüber p14^{ARF}-induziertem Zelltod, was sich in folgenden Befunden äußert: 1) auch Bax/Bak-doppelt defiziente Zellen zeigen eine Aktivierung von Caspasen nach Expression von p14^{ARF}, 2) diese lässt sich in Anwesenheit von Caspaseinhibitoren vollständig blockieren, wodurch die Induktion von Zelltod verhindert wird und 3) auch der kombinierte Verlust von Bax und Bak erlaubt kein klonales Langzeitüberleben *in vitro*. Dies lässt vermuten, dass mitochondrien-unabhängige Signalwege an der Vermittlung des p14^{ARF}-induzierten Zelltodes beteiligt sind. Aktuelle Arbeiten sollen daher klären, welchen Stellenwert die Aktivierung alternativer Apoptosesignalwege hat. Erste Daten weisen auf eine Beteiligung ER-vermittelter Apoptosesignalwege hin. Die Relevanz einer Beteiligung des Todesrezeptorsignalweges im Rahmen der p14^{ARF}-induzierten Apoptose ist ebenfalls Gegenstand aktueller Untersuchungen der Arbeitsgruppe, denn auch dies könnte die Mitochondrien-unabhängigen Aktivierung der Procaspase-3 nach Expression von p14^{ARF}

erklären. Der Stellenwert der p53-Homologe p63 und p73 wird derzeit ebenfalls untersucht. Hier legen erste Ergebnisse nahe, dass p63 und p73 den Verlust der p53-Funktion nur zum Teil kompensieren.

In p53-profizienten Zellen hingegen gelang es uns zu zeigen, dass BH3-only Proteine eine essenzielle Rolle bei der Vermittlung der Apoptose-induzierenden Wirkung von p14^{ARF} spielen. Insbesondere das BH3-only Protein Puma spielt hier eine zentrale Rolle. Kurz nach Expression von p14^{ARF} in p53-profizienten Tumorzellen kommt es zur raschen Hochregulation von Puma auf mRNA und Proteinebene. Dies wiederum induziert konsekutiv die aktivierende N-terminale Konformationsänderung von Bax, welches dann Mitochondrien aktiviert, d.h. den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und die Freisetzung von Cytochrom c, auslöst. Demgegenüber geht die Expression von p14^{ARF} in Puma-defizienten Zellen mit einer erheblichen Abschwächung der mitochondrialen Apoptose einher. Diese kann jedoch durch Reexpression von Puma wieder vollständig hergestellt werden. Diese Daten sind neu und belegen einerseits die essenzielle Rolle der BH3-only Proteine bei der Vermittlung von Apoptosesignalen nach Expression des p14^{ARF} Tumorsuppressors. Andererseits legen die Ergebnisse den hohen tumorbiologischen Stellenwert des (selektiven) Verlustes von BH3-only Proteinen, z.B. von Puma, bei der Vermittlung von Apoptoresistenz in humanen Tumorzellen nahe. Welchen Einfluss dies auf den klinischen Verlauf und die Prognose von Patienten mit hämatologischen Neoplasien oder soliden Tumoren hat ist jedoch in vielerlei Hinsicht noch ungeklärt. Im Rahmen eines translationalen Projektes soll dies u.a. beim kolorektalen Karzinom sowie bei der AML und der ALL überprüft werden.

Demgegenüber erfolgt die Induktion von Apoptose nach Expression von p14^{ARF} in p53-defizienten Zellen ausschließlich über einen Bak-vermittelten mitochondrialen Signalweg. Auch die Reexpression von pro-apoptotischem Bax in diesen Zellen geht nicht mit einer relevanten Aktivierung von Bax einher. Dies ist bemerkenswert und deutet darauf hin, dass die zur Aktivierung von Bax erforderlichen Signale in p53-defizienten Zellen nicht oder zumindest nicht adäquat angeschaltet werden können. Neben p53, einem wichtigen transkriptionellen Aktivator von Bax und Bak, könnte vor allem die mangelnde Aktivierung der BH3-only Proteine in p53-defizienten Zellen hierfür verantwortlich sein. Ob dies an die Abwesenheit von p53 gekoppelt ist oder ob noch andere Faktoren relevant sind, ist derzeit unklar. Erste Ergebnisse weiterführender Arbeiten weisen jedoch auf erhebliche Unterschiede in der differenziellen Regulation von BH3-only Proteinen in p53-profizienten *versus* p53-defizienten Tumorzellen hin. Auch belegen aktuelle Befunde, dass die (zelltyp-spezifische) Regulation anti-apoptotischer Bcl-2 Homologe in diesem Kontext relevant sein könnte. So beobachteten wir, dass es nach Expression von p14^{ARF} in p53-defizienten Zellen zu einer Herunterregulation der Expression von anti-apoptotischem Mcl-1 und Bcl-x_L kommt. Dies könnte in der Tat die Bak-Abhängigkeit der p14^{ARF}-induzierten

Apoptose in p53-defizienten Zellen erklären: Im Vergleich zu Bcl-2 sind Mcl-1 und Bcl-x_L vor allem für die Inaktivierung von Bak, weniger von Bax, verantwortlich. Diese Hemmung entfällt nach Expression von p14^{ARF} in p53-defizienten Zellen, so dass Bak konsekutiv aktiviert werden kann. Die für die (selektive) Herunterregulation von Bcl-x_L und Mcl-1 verantwortlichen Signalwege hingegen sind noch nicht aufgeklärt und Gegenstand aktueller Arbeiten. Darüber hinaus fanden wir, dass es auch in p53-defizienten Zellen zur selektiven Hochregulation und Aktivierung von BH3-only Proteinen kommt. Über die präferenzielle Blockade von Mcl-1 und Bcl-x_L erklärt dies die selektive Aktivierung von Bak statt Bax in p53-defizienten *versus* p53-profizienten Zellen (**Abbildung 7.1**).

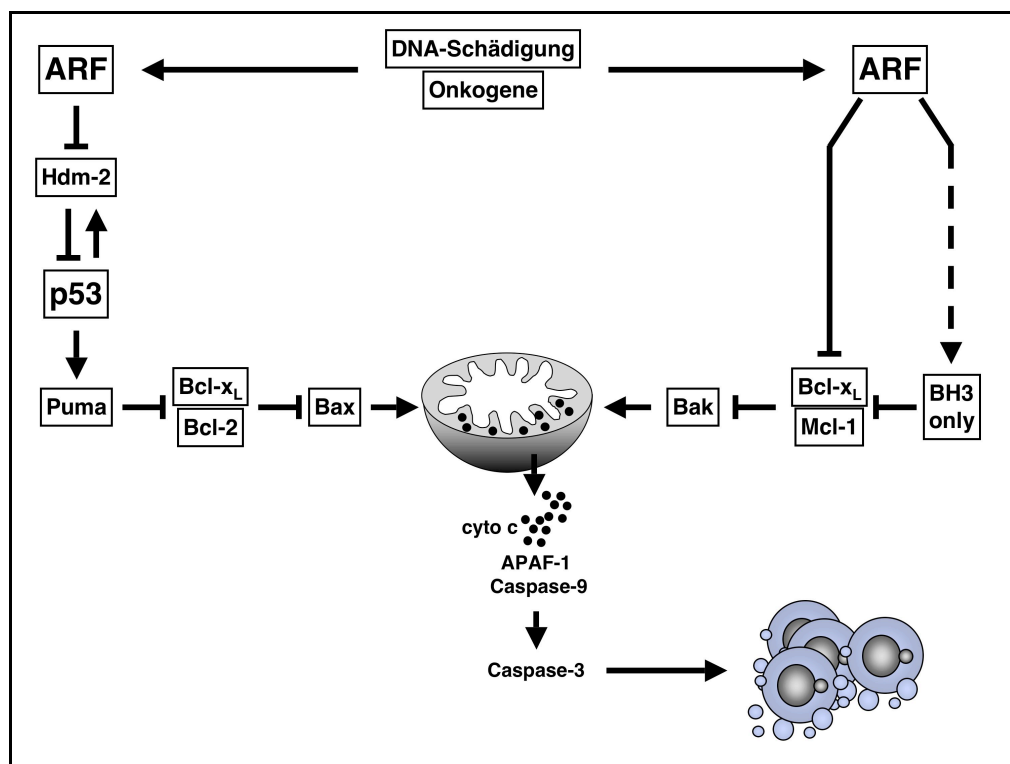


Abbildung 7.1: Regulation der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade durch den p14^{ARF} Tumorsuppressor. Die Induktion der p14^{ARF}-Expression erfolgt vor allem nach Aktivierung von Onkogenen oder nach DNA-Schädigung. In p53-profizienten Zellen führt dies über die Blockade von Hdm-2 zur Stabilisierung von p53. Dies wiederum induziert die vermehrte Expression des BH3-only Proteins Puma, welches dann Bcl-2 und Bcl-x_L aus ihrer Bindung zu Bax verdrängt. Bax kann dann eine aktivierende, N-terminale Konformationsänderung durchlaufen und in die äußere Mitochondrienmembran insertieren. Auch in p53-defizienten Zellen verläuft die Induktion des mitochondrialen Apoptosesignalweges über die Aktivierung von BH3-only Proteinen (u.a. Noxa und Nbk), welche konsekutiv anti-apoptotisches Bcl-x_L und Mcl-1 blockieren. Ferner wird die Expression von Bcl-x_L und Mcl-1 über einen BH3-only Protein-unabhängigen Signalweg herunterreguliert. Hierdurch entfällt die hemmende Wirkung auf Bak, welches dann aktiviert wird und Mitochondrien permeabilisieren kann. Beide Signalwege haben eine gemeinsame Endstrecke: Die Insertion von Bax bzw. Bak in die äußere Mitochondrienmembran induziert die Freisetzung von Cytochrom c und (d)ATP. Hierdurch kommt es zur Formation des mitochondrialen DISC, welcher dann Caspase-3 (und Caspase-7) aktivieren kann und unumkehrbar die Endphase der Apoptose einleitet.

Weiterhin gelang es uns neue Erkenntnisse zur Regulation des Zellzyklus durch p14^{ARF} zu erlangen. So zeigten wir, dass die Induktion eines Arrestes in der G1-Phase des Zellzyklus strikt an die Anwesenheit einer funktionellen p53/p21-Signalkaskade gebunden ist. Im Gegensatz dazu sind p53- bzw. p21-defiziente Zellen nach Expression von p14^{ARF} nicht in der Lage in der G1-Phase des Zellzyklus zu arretieren. Hingegen gehen diese Zellen nach Expression von p14^{ARF} einen Zellzyklusarrest in der G2-Phase ein. Mittels weitergehender Untersuchungen gelang es uns, den zugrunde liegenden Mechanismus aufzuklären [197]. Die Expression von p14^{ARF} induziert die Herunterregulation der für das Übertreten der Zellen aus der G2-Phase des Zellzyklus in die Mitose erforderlichen CDK1-Kinaseaktivität. Dies geschieht einerseits durch Blockade der Cdc25C-vermittelten Dephosphorylierung von CDK1, andererseits löst die Expression von p14^{ARF} eine vermehrte zytoplasmatische Sequestrierung und nachfolgende proteasomale Degradation der CDK1 aus. Diese Daten sind neu und zeigten zum ersten Mal, dass p14^{ARF} den DNA-Schädigungssignalweg über einen p53-unabhängigen Mechanismus aktiviert. Die Relevanz dieser Befunde wurde durch andere Gruppen, u.a. in einem *in vivo* Model, bestätigt. Dies lässt vermuten, dass der p14^{ARF}-induzierte G2-Zellzyklusarrest einen bis dahin unbekanntes *fail-safe* Mechanismus darstellen könnte, der es auch Zellen mit deregulierter Checkpunkt-Funktion, z.B. nach Verlust von p53 und/oder p21, erlaubt Onkogen-*getriggerte* Proliferationssignale zu antagonisieren. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist ferner, dass das Wiederherstellen der CDK1-Kinaseaktivität durch Reexpression diesen p14^{ARF}-induzierten G2-Arrest überwindet und dabei massiv Apoptose induziert. Dies wiederum spricht für die essenzielle Funktion des p14^{ARF}-Signalweges bei der Verknüpfung von Zellzyklusarrest- und Apoptoseprogrammen. Bei Vorliegen konkurrierender Signale, d.h. Zellzyklusarrest (vermittelt durch Expression von p14^{ARF}) *versus* Zellzyklusprogression (vermittelt durch Reexpression von CDK1) wird ein mitochondriales Apoptoseprogramm ausgelöst. Ferner unterstreichen diese Befunde, dass die Induktion von apoptotischem Zelltod eine zentrale Bedeutung für den Erhalt der genomischen Stabilität einer Zelle hat und dass der p14^{ARF}-Signalweg hieran beteiligt ist.

In nachfolgenden Arbeiten gelang es uns, die beteiligten Signalwege weiter zu dissezieren. Hier zeigten wir, dass neben p53 und p21 auch der G2/M-Regulator 14-3-3sigma essenzielle Funktion bei der Vermittlung eines stabilen G2-Arrestes nach Expression von p14^{ARF} hat. Dies bestätigt einerseits zuvor gewonnene Daten zum Einfluss der G2/M-Restriktionspunktkontrolle auf die p53-unabhängige Zellzyklusregulation durch p14^{ARF}. Andererseits weisen die Befunde darauf hin, dass die Expression von p14^{ARF} in Zellen, in denen die Checkpunkt-Funktion nach Deletion bzw. funktioneller Inaktivierung von p53, p21 und/oder 14-3-3sigma verloren gegangen ist, zur raschen Induktion von apoptotischem Zelltod führt. Im Gegensatz dazu löst die Aktivierung des DNA-Schädigungssignalweges nach Behandlung mit Zytostatika mitotische Katastrophe aus (**Abbildung 7.2**). Unklar und

daher Gegenstand aktueller Untersuchungen ist jedoch, ob die Apoptose nach Expression von p14^{ARF} aus der G2-Phase des Zellzyklus heraus erfolgt oder ob die Zellen zuvor in die Mitosephase übertreten.

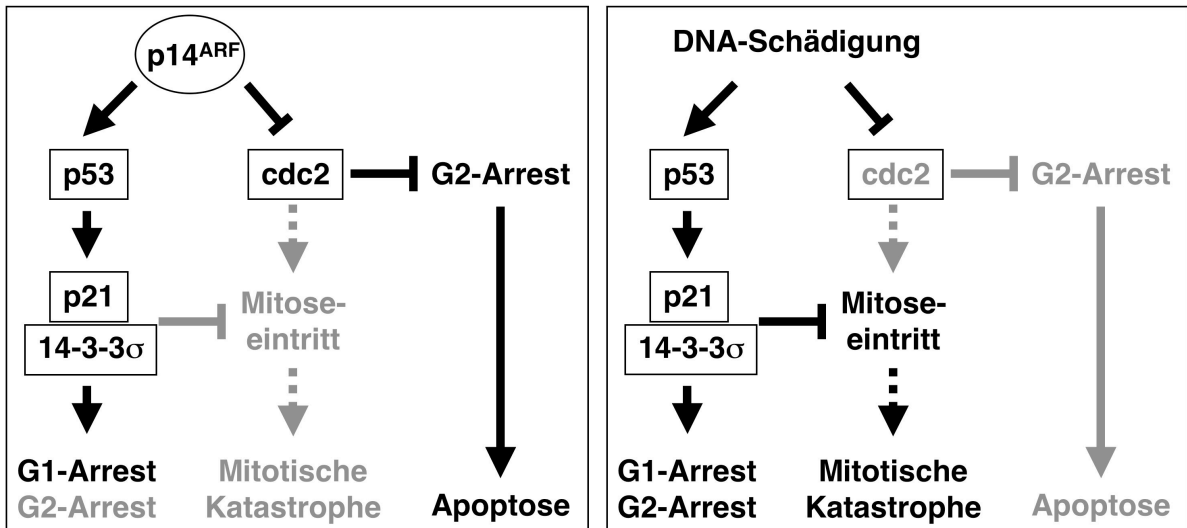


Abbildung 7.2: Modell zur Aktivierung von Zellzyklusarrest und Apoptose nach Expression des p14^{ARF}-Tumorsuppressors. Linke Seite: Während der p14^{ARF}-induzierte G1-Arrest in p53-profizienten Zellen über p53 und p21 vermittelt wird, kommt es in p53-defizienten Zellen über die Inaktivierung von CDK1 (cdc2) zur Induktion eines G2-Arrestes und nachfolgend mitochondrialer Apoptose. Hierdurch und über die Inaktivierung von CDK1 wird mitotische Katastrophe durch Blockade des Eintritts der Zellen in eine aberrante Mitose verhindert. Rechte Seite: Im Gegensatz hierzu induziert die Aktivierung des DNA-Schädigungssignalweges, z.B. nach Behandlung mit Chemotherapeutika oder Bestrahlung, einen Arrest in der G1- bzw. der G2-Phase des Zellzyklus. Bei Verlust von p21 und/oder 14-3-3sigma hingegen wird eine mitotische Katastrophe ausgelöst, da CDK1 nicht blockiert werden kann.

8. Ausblick

Mittels der durchgeführten Untersuchungen gelang es uns, die bei der Vermittlung von Apoptose und Zellzyklusarrest durch den p14^{ARF} Tumorsuppressor beteiligten Signalwege aufzuklären und auf funktioneller Ebene detailliert zu dissezieren. In diesem Zusammenhang gilt es nun weitere relevante Signalwege zu identifizieren und deren Funktionsweise zu analysieren. Einerseits ist die p53-unabhängige Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges nach Expression von p14^{ARF} noch nicht vollständig aufgeklärt. Was ist der funktionelle Stellenwert der p53-Homologe p63 und p73? Unter welchen Umständen können diese den Verlust von p53 kompensieren oder wird die Aktivierung von pro-apoptotischem Bax bzw. Bak durch andere Mechanismen vermittelt? Spielt die differenzielle Regulation der BH3-only Proteine hier eine Rolle? Wenn ja, werden diese auf transkriptionellem Wege oder durch post-translationale Mechanismen reguliert? Diese Fragestellungen sind völlig neu und bisher nicht oder nur ansatzweise untersucht. Ferner stellt sich die Frage, ob neben den Mitochondrien andere Zellorganellen an der Exekution p14^{ARF}-induzierter Zelltodsignalwege beteiligt sind. Vor allem der Einfluss des ER ist unbekannt und daher Gegenstand weiterer Untersuchungen der Arbeitsgruppe. Ferner wird detailliert geprüft werden, ob neben Apoptose auch andere Zelltodsignalwege bei der Umsetzung p14^{ARF}-vermittelter Signale mechanistisch relevant sind. Neben der Autophagozytose ist hier vor allem auch der Stellenwert der mitotischen Katastrophe zu untersuchen. Gleichsam werfen die gewonnenen Erkenntnisse zur Regulation des G2/M-Restriktionspunktes viele neue Fragen auf. Wie werden diese Signale an Cdc25C und CDK1 weitergeleitet? Hat p14^{ARF} eine Funktion im proximalen Anteil des DNA-Schädigungssignalweges? Wenn ja, wie werden diese Signale wahrgenommen?

Mittel- bis langfristig sollen die gewonnenen Erkenntnisse in die Diagnostik und die Entwicklung neuer Therapiestrategien maligner Tumorerkrankungen einfließen. Neben der (funktionellen) Analyse der *INK4A/ARF* Expression sind vor allem die mechanistischen Erkenntnisse zur Exekution p14^{ARF}-vermittelter Apoptosesignalwege unter Einbeziehung der BH3-only Protein-induzierten Aktivierung von Bax und/oder Bak relevant. Wann und unter welchen Bedingungen kann Bak den Verlust von Bax kompensieren? Wie können diese Bedingungen hergestellt werden? Könnte es möglich sein, dieses auf pharmakologischem Wege zu erreichen und so die in vielen Tumorentitäten deletäre Konsequenz einer Inaktivierung der p53/Bax-Signalkaskade wirkungsvoll zu durchbrechen? Auch diese Untersuchungen sind neu und gehen weit über die bisher publizierten Analysen zum prognostischen Stellenwert der *INK4A/ARF* Inaktivierung bei hämatologischen Neoplasien bzw. soliden Tumoren hinaus.

9. Zusammenfassung

Entgegen dem initial postulierten Paradigma einer strikten p53-Abhängigkeit p14^{ARF}-vermittelter Signale, belegen unsere Daten die Existenz eines p53/Bax-unabhängigen mitochondrialen Apoptosesignalweges. Dieser wird durch die BH3-only Protein-vermittelte Aktivierung des pro-apoptotischen Bcl-2 Homologs Bak exekutiert. Darüber hinaus kommt es zur Herunterregulation der Apoptose-hemmenden Bcl-2 Proteine Mcl-1 und Bcl-x_L, wodurch der Apoptose-induzierende Effekt nach Expression von p14^{ARF} weiter verstärkt wird. Demgegenüber wird die Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges in p53-profizienten Zellen präferenziell durch die p53-vermittelte Aktivierung des BH3-only Proteins Puma und dessen Effektor Bax ausgeführt. Der Verlust von Bax kann jedoch durch das pro-apoptotische Bak nahezu vollständig kompensiert werden. Die differenzielle Aktivierung von Bax und/oder Bak im Rahmen der p14^{ARF}-induzierten Apoptose unterstreicht die zentrale Rolle der BH3-only Proteine bei der Vermittlung und Integration von Apoptosesignalen.

Im Vergleich zur Apoptoseregulation ist die Induktion eines Arrestes in der G1-Phase des Zellzyklus nach Expression von p14^{ARF} strikt an einen funktionstüchtigen p53-Signalweg gekoppelt. Hierbei spielt vor allem die transkriptionelle und funktionelle Aktivierung des CDK-Inhibitors p21 eine zentrale Rolle. Nach Verlust, z.B. Deletion, von p53 und/oder p21 arretieren p14^{ARF}-exprimierende Zellen hingegen in der G2-Phase des Zellzyklus. Dies wird durch Aktivierung des DNA-Schädigungssignalweges, vermittelt *via* Herunterregulation der CDK1-Kinase, erreicht. Im Gegenzug resultiert ein Verlust der G2-Restriktionspunktkontrolle, z.B. durch Inaktivierung des CDK-Inhibitors p21 oder nach Deletion des G2/M-Regulators 14-3-3sigma, in einer Sensibilisierung gegenüber p14^{ARF}-induzierter Apoptose. Diese Abläufe könnten einen *fail-safe* Mechanismus darstellen, welcher es genomisch instabilen Zellen erlaubt, Zelltodprogramme auch nach Verlust von p53 und/oder p21 zu aktivieren.

Diese Befunde sind sehr bedeutsam, da der p14^{ARF} Tumorsuppressor eine zentrale Rolle bei der Vermittlung von Zellzyklusarrest, Apoptose und Seneszenz spielt. Weit mehr als die Hälfte aller Tumore weisen eine direkte oder indirekte Inaktivierung des p14^{ARF}-Signalweges auf. Umfangreiche experimentelle Daten belegen eindrucksvoll, dass diese Veränderungen nicht nur für die Entstehung und Progression einer Reihe von Tumorerkrankungen bedeutsam sind, sondern auch prognostischen Stellenwert haben. Die detaillierte Analyse und funktionelle Dissektion der beteiligten Apoptose- und Zellzyklus-regulierenden Signalwege ist daher nicht nur von rein zellbiologischem Interesse, sondern hat auch eine hohe klinische Relevanz. Zukünftig geplante Untersuchungen zielen daher nicht nur auf die weitere Signalwegsanalyse ab, sondern dienen vor allem auch der Untersuchung ihres prognostischen Stellenwertes bei klinisch relevanten Tumorentitäten.

10. Literaturverzeichnis

1. Cory S, Huang DC, Adams JM (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22:8590-8607
2. Adams JM, Cory S (2007) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26:1324-1337
3. Daniel P (2008) Molekulare Grundlagen der Apoptose. In: Ganten/Ruckpaul (ed) *Grundlagen der Molekularen Medizin*, 3rd Edition, Springer, Berlin Heidelberg, pp 159 - 203
4. Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Belka C, Güner D (2003) Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins. *Essays Biochem* 39:73-88
5. Matheu A, Maraver A, Collado M, Garcia-Cao I, Canamero M, Borrás C, Flores JM, Klatt P, Vina J, Serrano M (2009) Anti-aging activity of the Ink4/Arf locus. *Aging Cell* 8:152-161
6. Matheu A, Maraver A, Serrano M (2008) The Arf/p53 pathway in cancer and aging. *Cancer Res* 68:6031-6034
7. Schwerk C, Schulze-Osthoff K (2005) Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 19:1-13
8. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257
9. Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316
10. Callus BA, Vaux DL (2007) Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical. *Cell Death Differ* 14:73-78
11. Larisch S (2004) The ARTS connection: role of ARTS in apoptosis and cancer. *Cell Cycle* 3:1021-1023
12. Ekert PG, Vaux DL (2005) The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Curr Opin Cell Biol* 17:626-630
13. Fulda S (2009) Inhibitor of apoptosis proteins in hematological malignancies. *Leukemia* 23:467-476
14. Fulda S, Wick W, Weller M, Debatin KM (2002) Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat Med* 8:808-815
15. Krammer PH, Kaminski M, Kiessling M, Gulow K (2007) No Life Without Death. *Adv Cancer Res* 97C:111-138
16. Daniel PT (2000) Dissecting the pathways to death. *Leukemia* 14:2035-2044
17. Peter ME, Krammer PH (2003) The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10:26-35
18. Lavrik I, Golks A, Krammer PH (2005) Death receptor signaling. *J Cell Sci* 118:265-267
19. Fulda S, Debatin KM (2004) Signaling through death receptors in cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 4:327-332
20. Adams JM, Cory S (2007) Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* 19:488-496
21. Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305:626-629
22. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501
23. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490
24. Youle RJ, Strasser A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:47-59
25. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228:1440-1443
26. Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, Erikson J, Nowell PC, Croce CM (1984) Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* 224:1403-1406
27. Chipuk JE, Green DR (2008) How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 18:157-164
28. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292:727-730
29. Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB (2001) BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 15:1481-1486
30. 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* 19:1294-1305

31. Gillissen B, Essmann F, Graupner V, Starck L, Radetzki S, Dörken B, Schulze-Osthoff K, Daniel PT (2003) Induction of cell death by the BH3-only Bcl-2 homolog Nbk/Bik is mediated by an entirely Bax-dependent mitochondrial pathway. *Embo J* 22:3580-3590
32. Gillissen B, Essmann F, Hemmati PG, Richter A, Oztop I, Chinnadurai G, Dörken B, Daniel PT (2007) Mcl-1 determines the Bax dependency of Nbk/Bik-induced apoptosis. *J Cell Biol* 179:701-715
33. Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M, Hsueh AJ (1997) Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12401-12406
34. Inohara N, Ekhterae D, Garcia I, Carrio R, Merino J, Merry A, Chen S, Nunez G (1998) Mtd, a novel Bcl-2 family member activates apoptosis in the absence of heterodimerization with Bcl-2 and Bcl-XL. *J Biol Chem* 273:8705-8710
35. Yakovlev AG, Di Giovanni S, Wang G, Liu W, Stoica B, Faden AI (2004) BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem* 279:28367-28374
36. Rodriguez JM, Glozak MA, Ma Y, Cress WD (2006) Bok, Bcl-2-related Ovarian Killer, Is Cell Cycle-regulated and Sensitizes to Stress-induced Apoptosis. *J Biol Chem* 281:22729-22735
37. Strasser A (2005) The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5:189-200
38. Labi V, Erlacher M, Kiessling S, Villunger A (2006) BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy. *Cell Death Differ* 13:1325-1338
39. Willis SN, Adams JM (2005) Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 17:617-625
40. Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA, Korsmeyer SJ (1999) Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400:886-891
41. Kamer I, Sarig R, Zaltsman Y, Niv H, Oberkovitz G, Regev L, Haimovich G, Lerenthal Y, Marcellus RC, Gross A (2005) Proapoptotic BID is an ATM effector in the DNA-damage response. *Cell* 122:593-603
42. Zinkel SS, Hurov KE, Ong C, Abtahi FM, Gross A, Korsmeyer SJ (2005) A role for proapoptotic BID in the DNA-damage response. *Cell* 122:579-591
43. Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Bouillet P, Strasser A, Kappler J, Marrack P (2002) Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity* 16:759-767
44. Pellegrini M, Belz G, Bouillet P, Strasser A (2003) Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14175-14180
45. Hughes PD, Belz GT, Fortner KA, Budd RC, Strasser A, Bouillet P (2008) Apoptosis regulators fas and bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. *Immunity* 28:197-205
46. Fischer SF, Belz GT, Strasser A (2008) BH3-only protein Puma contributes to death of antigen-specific T cells during shutdown of an immune response to acute viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3035-3040
47. Yu J, Wang Z, Kinzler KW, Vogelstein B, Zhang L (2003) PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1931-1936
48. Shibue T, Takeda K, Oda E, Tanaka H, Murasawa H, Takaoka A, Morishita Y, Akira S, Taniguchi T, Tanaka N (2003) Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev* 17:2233-2238
49. Jeffers JR, Parganas E, Lee Y, Yang C, Wang J, Brennan J, MacLean KH, Han J, Chittenden T, Ihle JN, *et al.* (2003) Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* 4:321-328
50. Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A (2003) p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 302:1036-1038
51. Erlacher M, Michalak EM, Kelly PN, Labi V, Niederegger H, Coultas L, Adams JM, Strasser A, Villunger A (2005) BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood* 106:4131-4138
52. Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, Adams JM, Strasser A (1999) Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286:1735-1738
53. Villunger A, Scott C, Bouillet P, Strasser A (2003) Essential role for the BH3-only protein Bim but redundant roles for Bax, Bcl-2, and Bcl-w in the control of granulocyte survival. *Blood* 101:2393-2400
54. Labi V, Erlacher M, Kiessling S, Manzl C, Frenzel A, O'Reilly L, Strasser A, Villunger A (2008) Loss of the BH3-only protein Bmf impairs B cell homeostasis and accelerates {gamma} irradiation-induced thymic lymphoma development. *J Exp Med*
55. Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC, Strasser A (2001) Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 293:1829-1832
56. Inohara N, Ding L, Chen S, Nunez G (1997) harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *Embo J* 16:1686-1694

57. Sanz C, Benito A, Inohara N, Ekhterae D, Nunez G, Fernandez-Luna JL (2000) Specific and rapid induction of the proapoptotic protein Hrk after growth factor withdrawal in hematopoietic progenitor cells. *Blood* 95:2742-2747
58. Tan TT, Degenhardt K, Nelson DA, Beaudoin B, Nieves-Neira W, Bouillet P, Villunger A, Adams JM, White E (2005) Key roles of BIM-driven apoptosis in epithelial tumors and rational chemotherapy. *Cancer Cell* 7:227-238
59. Cragg MS, Kuroda J, Puthalakath H, Huang DC, Strasser A (2007) Gefitinib-induced killing of NSCLC cell lines expressing mutant EGFR requires BIM and can be enhanced by BH3 mimetics. *PLoS Med* 4:1681-1689; discussion 1690
60. Kuribara R, Honda H, Matsui H, Shinjyo T, Inukai T, Sugita K, Nakazawa S, Hirai H, Ozawa K, Inaba T (2004) Roles of Bim in apoptosis of normal and Bcr-Abl-expressing hematopoietic progenitors. *Mol Cell Biol* 24:6172-6183
61. Kuroda J, Kimura S, Strasser A, Andreeff M, O'Reilly LA, Ashihara E, Kamitsuji Y, Yokota A, Kawata E, Takeuchi M, *et al.* (2007) Apoptosis-based dual molecular targeting by INNO-406, a second-generation Bcr-Abl inhibitor, and ABT-737, an inhibitor of antiapoptotic Bcl-2 proteins, against Bcr-Abl-positive leukemia. *Cell Death Differ* 14:1667-1677
62. Kuroda J, Puthalakath H, Cragg MS, Kelly PN, Bouillet P, Huang DC, Kimura S, Ottmann OG, Druker BJ, Villunger A, *et al.* (2006) Bim and Bad mediate imatinib-induced killing of Bcr/Abl+ leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14907-14912
63. Qin JZ, Ziffra J, Stennett L, Bodner B, Bonish BK, Chaturvedi V, Bennett F, Pollock PM, Trent JM, Hendrix MJ, *et al.* (2005) Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res* 65:6282-6293
64. Zhang Y, Adachi M, Kawamura R, Imai K (2006) Bmf is a possible mediator in histone deacetylase inhibitors FK228 and CBHA-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 13:129-140
65. Egle A, Harris AW, Bouillet P, Cory S (2004) Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6164-6169
66. Hemann MT, Bric A, Teruya-Feldstein J, Herbst A, Nilsson JA, Cordon-Cardo C, Cleveland JL, Tansey WP, Lowe SW (2005) Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants. *Nature* 436:807-811
67. Sturm I, Stephan C, Gillissen B, Siebert R, Janz M, Radetzki S, Jung K, Loening S, Dörken B, Daniel PT (2006) Loss of the tissue-specific proapoptotic BH3-only protein Nbk/Bik is a unifying feature of renal cell carcinoma. *Cell Death Differ* 13:619-627
68. Zantl N, Weirich G, Zall H, Seiffert BM, Fischer SF, Kirschnek S, Hartmann C, Fritsch RM, Gillissen B, Daniel PT, *et al.* (2007) Frequent loss of expression of the pro-apoptotic protein Bim in renal cell carcinoma: evidence for contribution to apoptosis resistance. *Oncogene*
69. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2:183-192
70. Cartron PF, Gallenne T, Bougras G, Gautier F, Manero F, Vusio P, Meflah K, Vallette FM, Juin P (2004) The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol Cell* 16:807-818
71. 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* 17:525-535
72. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JL, 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* 17:393-403
73. 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* 17:1475-1486
74. Radetzki S, Kohne CH, von Haefen C, Gillissen B, Sturm I, Dörken B, Daniel PT (2002) The apoptosis promoting Bcl-2 homologues Bak and Nbk/Bik overcome drug resistance in Mdr-1-negative and Mdr-1-overexpressing breast cancer cell lines. *Oncogene* 21:227-238
75. Daniel PT, Pun KT, Ritschel S, Sturm I, Holler J, Dörken B, Brown R (1999) Expression of the death gene Bik/Nbk promotes sensitivity to drug-induced apoptosis in corticosteroid-resistant T-cell lymphoma and prevents tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Blood* 94:1100-1107
76. Oltsersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dinges J, Hajduk PJ, *et al.* (2005) An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435:677-681
77. Walensky LD, Kung AL, Escher I, Malia TJ, Barbuto S, Wright RD, Wagner G, Verdine GL, Korsmeyer SJ (2004) Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science* 305:1466-1470
78. Puthalakath H, Strasser A (2002) Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ* 9:505-512
79. 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* 10:1201-1204

80. Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 3:287-296
81. 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* 9:351-365
82. Zhu Y, Swanson BJ, Wang M, Hildeman DA, Schaefer BC, Liu X, Suzuki H, Mihara K, Kappler J, Marrack P (2004) Constitutive association of the proapoptotic protein Bim with Bcl-2-related proteins on mitochondria in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7681-7686
83. Akiyama T, Bouillet P, Miyazaki T, Kadono Y, Chikuda H, Chung UI, Fukuda A, Hikita A, Seto H, Okada T, *et al.* (2003) Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim. *Embo J* 22:6653-6664
84. Ley R, Balmanno K, Hadfield K, Weston C, Cook SJ (2003) Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J Biol Chem* 278:18811-18816
85. Putcha GV, Le S, Frank S, Besirli CG, Clark K, Chu B, Alix S, Youle RJ, LaMarche A, Maroney AC, *et al.* (2003) JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron* 38:899-914
86. 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* 87:619-628
87. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ (1995) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80:285-291
88. Tsujimoto Y, Nakagawa T, Shimizu S (2006) Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. *Biochim Biophys Acta* 1757:1297-1300
89. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneiter R, Green DR, Newmeyer DD (2002) Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111:331-342
90. Basanez G, Sharpe JC, Galanis J, Brandt TB, Hardwick JM, Zimmerberg J (2002) Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J Biol Chem* 277:49360-49365
91. Chandra D, Choy G, Daniel PT, Tang DG (2005) Bax-dependent Regulation of Bak by Voltage-dependent Anion Channel 2. *J Biol Chem* 280:19051-19061
92. Tsujimoto Y, Shimizu S (2000) VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ* 7:1174-1181
93. Youle RJ, Karbowski M (2005) Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:657-663
94. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489
95. Nicholson DW (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6:1028-1042
96. Zheng TS, Flavell RA (2000) Death by numbers. *Nat Biotechnol* 18:717-718
97. Loeder S, Zenz T, Schnaiter A, Mertens D, Winkler D, Dohner H, Debatin KM, Stilgenbauer S, Fulda S (2009) A novel paradigm to trigger apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 69:8977-8986
98. Fakler M, Loeder S, Vogler M, Schneider K, Jeremias I, Debatin KM, Fulda S (2009) Small molecule XIAP inhibitors cooperate with TRAIL to induce apoptosis in childhood acute leukemia cells and overcome Bcl-2-mediated resistance. *Blood* 113:1710-1722
99. Fulda S (2009) Therapeutic opportunities for counteracting apoptosis resistance in childhood leukaemia. *Br J Haematol*
100. Fischer U, Schulze-Osthoff K (2005) Apoptosis-based therapies and drug targets. *Cell Death Differ* 12 Suppl 1:942-961
101. Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S (2004) Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* 14:277-287
102. Lauber K, Bohn E, Krober SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, *et al.* (2003) Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113:717-730
103. Okada H, Mak TW (2004) Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 4:592-603
104. de Bruin EC, Medema JP (2008) Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat Rev* 34:737-749
105. Los M, Mozoluk M, Ferrari D, Stepczynska A, Stroh C, Renz A, Herceg Z, Wang ZQ, Schulze-Osthoff K (2002) Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol Biol Cell* 13:978-988

106. Scholz C, Richter A, Lehmann M, Schulze-Osthoff K, Dörken B, Daniel PT (2005) Arsenic trioxide induces regulated, death receptor-independent cell death through a Bcl-2-controlled pathway. *Oncogene* 24:7031-7042
107. Scholz C, Wieder T, Starck L, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Dörken B, Daniel PT (2005) Arsenic trioxide triggers a regulated form of caspase-independent necrotic cell death via the mitochondrial death pathway. *Oncogene* 24:1904-1913
108. Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B (2008) Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* 15:1153-1162
109. Norbury C, Nurse P (1992) Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem* 61:441-470
110. Baserga R, Wiebel F (1969) The cell cycle of mammalian cells. *Int Rev Exp Pathol* 7:1-30
111. Morgan D (2006) *The Cell Cycle*, 1st Edition, Sinauer Associates
112. Kastan MB, Bartek J (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432:316-323
113. Massague J (2004) G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432:298-306
114. Malumbres M, Barbacid M (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9:153-166
115. Weinert T, Hartwell L (1989) Control of G2 delay by the rad9 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci Suppl* 12:145-148
116. Bartek J, Lukas C, Lukas J (2004) Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:792-804
117. Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW (2005) On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* 5:773-785
118. Murray A (1994) Cell cycle checkpoints. *Curr Opin Cell Biol* 6:872-876
119. Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33:389-396
120. Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR, Jr., Garrels JI (1984) Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 309:374-376
121. van den Heuvel S, Harlow E (1993) Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* 262:2050-2054
122. Murray AW (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116:221-234
123. Morgan DO (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:261-291
124. Morgan DO, Fisher RP, Espinoza FH, Farrell A, Nourse J, Chamberlin H, Jin P (1998) Control of eukaryotic cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinases. *Cancer J Sci Am* 4 Suppl 1:S77-83
125. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G (1993) Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 7:812-821
126. DeCaprio JA, Ludlow JW, Lynch D, Furukawa Y, Griffin J, Piwnica-Worms H, Huang CM, Livingston DM (1989) The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* 58:1085-1095
127. Buchkovich K, Duffy LA, Harlow E (1989) The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 58:1097-1105
128. Chen PL, Scully P, Shew JY, Wang JY, Lee WH (1989) Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 58:1193-1198
129. Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC (1999) Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* 98:859-869
130. Krude T, Jackman M, Pines J, Laskey RA (1997) Cyclin/Cdk-dependent initiation of DNA replication in a human cell-free system. *Cell* 88:109-119
131. Hochegger H, Takeda S, Hunt T (2008) Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:910-916
132. Pagano M, Pepperkok R, Lukas J, Baldin V, Ansorge W, Bartek J, Draetta G (1993) Regulation of the cell cycle by the cdk2 protein kinase in cultured human fibroblasts. *J Cell Biol* 121:101-111
133. Lee MH, Reynisdottir I, Massague J (1995) Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 9:639-649
134. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366:701-704
135. Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366:704-707
136. Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J (1994) Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78:59-66
137. Guan KL, Jenkins CW, Li Y, O'Keefe CL, Noh S, Wu X, Zariwala M, Matera AG, Xiong Y (1996) Isolation and characterization of p19INK4d, a p16-related inhibitor specific to CDK6 and CDK4. *Mol Biol Cell* 7:57-70

138. Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y (1994) Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* 8:2939-2952
139. Sherr CJ (2000) Cell cycle control and cancer. *Harvey Lect* 96:73-92
140. Sherr CJ (2004) Principles of tumor suppression. *Cell* 116:235-246
141. Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J, Lukas J (2001) The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 410:842-847
142. Mailand N, Falck J, Lukas C, Syljuasen RG, Welcker M, Bartek J, Lukas J (2000) Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* 288:1425-1429
143. Falck J, Petrini JH, Williams BR, Lukas J, Bartek J (2002) The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet* 30:290-294
144. Liu P, Barkley LR, Day T, Bi X, Slater DM, Alexandrow MG, Nasheuer HP, Vaziri C (2006) The Chk1-mediated S-phase checkpoint targets initiation factor Cdc45 via a Cdc25A/Cdk2-independent mechanism. *J Biol Chem* 281:30631-30644
145. Sorensen CS, Syljuasen RG, Falck J, Schroeder T, Ronnstrand L, Khanna KK, Zhou BB, Bartek J, Lukas J (2003) Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* 3:247-258
146. Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B (2001) PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 7:673-682
147. Nakano K, Vousden KH (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7:683-694
148. 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* 288:1053-1058
149. Miyashita T, Reed JC (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293-299
150. Jänicke RU, Sohn D, Essmann F, Schulze-Osthoff K (2007) The multiple battles fought by anti-apoptotic p21. *Cell Cycle* 6:407-413
151. Gatei M, Sloper K, Sorensen C, Syljuasen R, Falck J, Hobson K, Savage K, Lukas J, Zhou BB, Bartek J, *et al.* (2003) Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* 278:14806-14811
152. Pichierri P, Averbek D, Rosselli F (2002) DNA cross-link-dependent RAD50/MRE11/NBS1 subnuclear assembly requires the Fanconi anemia C protein. *Hum Mol Genet* 11:2531-2546
153. Gatei M, Zhou BB, Hobson K, Scott S, Young D, Khanna KK (2001) Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and ATM and Rad3 related kinase mediate phosphorylation of Brca1 at distinct and overlapping sites. In vivo assessment using phospho-specific antibodies. *J Biol Chem* 276:17276-17280
154. Pichierri P, Rosselli F (2004) The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *Embo J* 23:1178-1187
155. Jin P, Gu Y, Morgan DO (1996) Role of inhibitory CDC2 phosphorylation in radiation-induced G2 arrest in human cells. *J Cell Biol* 134:963-970
156. Jin P, Hardy S, Morgan DO (1998) Nuclear localization of cyclin B1 controls mitotic entry after DNA damage. *J Cell Biol* 141:875-885
157. Hermeking H (2003) The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev Cancer* 3:931-943
158. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B (1997) 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1:3-11
159. Suijkerbuijk SJ, Kops GJ (2008) Preventing aneuploidy: the contribution of mitotic checkpoint proteins. *Biochim Biophys Acta* 1786:24-31
160. Shirayama M, Zachariae W, Ciosk R, Nasmyth K (1998) The Polo-like kinase Cdc5p and the WD-repeat protein Cdc20p/fizzy are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 17:1336-1349
161. Ciosk R, Zachariae W, Michaelis C, Shevchenko A, Mann M, Nasmyth K (1998) An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* 93:1067-1076
162. Tinker-Kulberg RL, Morgan DO (1999) Pds1 and Esp1 control both anaphase and mitotic exit in normal cells and after DNA damage. *Genes Dev* 13:1936-1949
163. Visintin R, Craig K, Hwang ES, Prinz S, Tyers M, Amon A (1998) The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell* 2:709-718
164. Hu F, Wang Y, Liu D, Li Y, Qin J, Elledge SJ (2001) Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP complex by Cdc5 and cell cycle checkpoints. *Cell* 107:655-665
165. Taylor SS, McKeon F (1997) Kinetochores localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell* 89:727-735
166. Taylor SS, Ha E, McKeon F (1998) The human homologue of Bub3 is required for kinetochores localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J Cell Biol* 142:1-11

167. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ (1995) Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83:993-1000
168. Mao L, Merlo A, Bedi G, Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ, Sidransky D (1995) A novel p16INK4A transcript. *Cancer Res* 55:2995-2997.
169. Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavtigian SV, Katcher H, Parry D, Peters G, Kamb A (1995) Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res* 55:2988-2994
170. Quelle DE, Cheng M, Ashmun RA, Sherr CJ (1997) Cancer-associated mutations at the INK4a locus cancel cell cycle arrest by p16INK4a but not by the alternative reading frame protein p19ARF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:669-673
171. Sharpless NE, DePinho RA (1999) The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* 9:22-30
172. Sherr CJ (2001) The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:731-737
173. Lowe SW, Sherr CJ (2003) Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 13:77-83
174. Eischen CM, Weber JD, Roussel MF, Sherr CJ, Cleveland JL (1999) Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev* 13:2658-2669
175. de Stanchina E, McCurrach ME, Zindy F, Shieh SY, Ferbeyre G, Samuelson AV, Prives C, Roussel MF, Sherr CJ, Lowe SW (1998) E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* 12:2434-2442
176. Palmero I, Pantoja C, Serrano M (1998) p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* 395:125-126
177. Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, Roussel MF (1998) Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 12:2424-2433
178. Radfar A, Unnikrishnan I, Lee HW, DePinho RA, Rosenberg N (1998) p19(Arf) induces p53-dependent apoptosis during abelson virus-mediated pre-B cell transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13194-13199
179. Sherr CJ (2000) The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 60:3689-3695
180. Inoue R, Asker C, Klangby U, Pisa P, Wiman KG (1999) Induction of the human ARF protein by serum starvation. *Anticancer Res* 19:2939-2943
181. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, *et al.* (1998) The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92:713-723
182. Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, *et al.* (1998) The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *Embo J* 17:5001-5014
183. Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D (1999) Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1:20-26
184. Li Y, Wu D, Chen B, Ingram A, He L, Liu L, Zhu D, Kapoor A, Tang D (2004) ATM activity contributes to the tumor-suppressing functions of p14ARF. *Oncogene* 23:7355-7365
185. Eymin B, Claverie P, Salon C, Leduc C, Col E, Brambilla E, Khochbin S, Gazzeri S (2006) p14ARF activates a Tip60-dependent and p53-independent ATM/ATR/CHK pathway in response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* 26:4339-4350
186. Pauklin S, Kristjuhan A, Maimets T, Jaks V (2005) ARF and ATM/ATR cooperate in p53-mediated apoptosis upon oncogenic stress. *Biochem Biophys Res Commun* 334:386-394
187. Rocha S, Garrett MD, Campbell KJ, Schumm K, Perkins ND (2005) Regulation of NF-kappaB and p53 through activation of ATR and Chk1 by the ARF tumour suppressor. *Embo J* 24:1157-1169
188. Rocha S, Campbell KJ, Perkins ND (2003) p53- and Mdm2-independent repression of NF-kappa B transactivation by the ARF tumor suppressor. *Mol Cell* 12:15-25
189. Sherr CJ (2006) Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer* 6:663-673
190. Sherr CJ, Bertwistle D, W DENB, Kuo ML, Sugimoto M, Tago K, Williams RT, Zindy F, Roussel MF (2005) p53-Dependent and -independent functions of the Arf tumor suppressor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70:129-137
191. Weber JD, Jeffers JR, Rehg JE, Randle DH, Lozano G, Roussel MF, Sherr CJ, Zambetti GP (2000) p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* 14:2358-2365
192. Kelly-Spratt KS, Gurley KE, Yasui Y, Kemp CJ (2004) p19Arf suppresses growth, progression, and metastasis of Hras-driven carcinomas through p53-dependent and -independent pathways. *PLoS Biol* 2:E242
193. Carnero A, Hudson JD, Price CM, Beach DH (2000) p16INK4A and p19ARF act in overlapping pathways in cellular immortalization. *Nat Cell Biol* 2:148-155
194. Eymin B, Karayan L, Seite P, Brambilla C, Brambilla E, Larsen CJ, Gazzeri S (2001) Human ARF binds E2F1 and inhibits its transcriptional activity. *Oncogene* 20:1033-1041.

195. Martelli F, Hamilton T, Silver DP, Sharpless NE, Bardeesy N, Rokas M, DePinho RA, Livingston DM, Grossman SR (2001) p19ARF targets certain E2F species for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4455-4460
196. Mason SL, Loughran O, La Thangue NB (2002) p14(ARF) regulates E2F activity. *Oncogene* 21:4220-4230
197. Normand G, Hemmati PG, Verdoodt B, von Haefen C, Wendt J, Güner D, May E, Dörken B, Daniel PT (2005) p14ARF induces G2 cell cycle arrest in p53- and p21-deficient cells by down-regulating p34cdc2 kinase activity. *J Biol Chem* 280:7118-7130
198. Eymin B, Leduc C, Coll JL, Brambilla E, Gazzeri S (2003) p14ARF induces G2 arrest and apoptosis independently of p53 leading to regression of tumours established in nude mice. *Oncogene* 22:1822-1835
199. Eymin B, Claverie P, Salon C, Brambilla C, Brambilla E, Gazzeri S (2006) p14ARF triggers G2 arrest through ERK-mediated Cdc25C phosphorylation, ubiquitination and proteasomal degradation. *Cell Cycle* 5:759-765
200. Hemmati PG, Normand G, Verdoodt B, von Haefen C, Hasenjäger A, Güner D, Wendt J, Dörken B, Daniel PT (2005) Loss of p21 disrupts p14(ARF)-induced G1 cell cycle arrest but augments p14(ARF)-induced apoptosis in human carcinoma cells. *Oncogene*
201. Rocha S, Perkins ND (2005) ARF the integrator: linking NF-kappaB, p53 and checkpoint kinases. *Cell Cycle* 4:756-759
202. Hemmati PG, Gillissen B, von Haefen C, Wendt J, Starck L, Güner D, Dörken B, Daniel PT (2002) Adenovirus-mediated overexpression of p14(ARF) induces p53 and Bax-independent apoptosis. *Oncogene* 21:3149-3161
203. Suzuki H, Kurita M, Mizumoto K, Nishimoto I, Ogata E, Matsuoka M (2003) p19ARF-induced p53-independent apoptosis largely occurs through BAX. *Biochem Biophys Res Commun* 312:1273-1277
204. Tsuji K, Mizumoto K, Sudo H, Kouyama K, Ogata E, Matsuoka M (2002) p53-independent apoptosis is induced by the p19ARF tumor suppressor. *Biochem Biophys Res Commun* 295:621-629
205. Matsuoka M, Kurita M, Sudo H, Mizumoto K, Nishimoto I, Ogata E (2003) Multiple domains of the mouse p19ARF tumor suppressor are involved in p53-independent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 301:1000-1010
206. Fatyol K, Szalay AA (2001) The p14ARF tumor suppressor protein facilitates nucleolar sequestration of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and inhibits HIF-1-mediated transcription. *J Biol Chem* 276:28421-28429
207. Suzuki H, Kurita M, Mizumoto K, Moriyama M, Aiso S, Nishimoto I, Matsuoka M (2005) The ARF tumor suppressor inhibits BCL6-mediated transcriptional repression. *Biochem Biophys Res Commun* 326:242-248
208. Shvarts A, Brummelkamp TR, Scheeren F, Koh E, Daley GQ, Spits H, Bernards R (2002) A senescence rescue screen identifies BCL6 as an inhibitor of anti-proliferative p19(ARF)-p53 signaling. *Genes Dev* 16:681-686
209. Rizos H, Diefenbach E, Badhwar P, Woodruff S, Becker TM, Rooney RJ, Kefford RF (2003) Association of p14ARF with the p120E4F transcriptional repressor enhances cell cycle inhibition. *J Biol Chem* 278:4981-4989
210. Ayrault O, Andrique L, Larsen CJ, Seite P (2004) Human Arf tumor suppressor specifically interacts with chromatin containing the promoter of rRNA genes. *Oncogene* 23:8097-8104
211. Karayan L, Riou JF, Seite P, Migeon J, Cantereau A, Larsen CJ (2001) Human ARF protein interacts with topoisomerase I and stimulates its activity. *Oncogene* 20:836-848
212. Chen D, Kon N, Li M, Zhang W, Qin J, Gu W (2005) ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* 121:1071-1083
213. Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X (2005) Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* 121:1085-1095
214. Woods YL, Xirodimas DP, Prescott AR, Sparks A, Lane DP, Saville MK (2004) p14 Arf promotes small ubiquitin-like modifier conjugation of Werners helicase. *J Biol Chem* 279:50157-50166
215. Weber JD, Kuo ML, Bothner B, DiGiammarino EL, Kriwacki RW, Roussel MF, Sherr CJ (2000) Cooperative signals governing ARF-mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex. *Mol Cell Biol* 20:2517-2528
216. Chen L, Chen J (2003) MDM2-ARF complex regulates p53 sumoylation. *Oncogene* 22:5348-5357
217. Rizos H, Woodruff S, Kefford RF (2005) p14ARF interacts with the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 and promotes the sumoylation of its binding partners. *Cell Cycle* 4:597-603
218. Xirodimas DP, Chisholm J, Desterro JM, Lane DP, Hay RT (2002) P14ARF promotes accumulation of SUMO-1 conjugated (H)Mdm2. *FEBS Lett* 528:207-211
219. Tago K, Chiocca S, Sherr CJ (2005) Sumoylation induced by the Arf tumor suppressor: a p53-independent function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7689-7694
220. Rizos H, McKenzie HA, Ayub AL, Woodruff S, Becker TM, Scurr LL, Stahl J, Kefford RF (2006) Physical and functional interaction of the p14ARF tumor suppressor with ribosomes. *J Biol Chem* 281:38080-38088

221. Ayrault O, Andrique L, Fauvin D, Eymin B, Gazzeri S, Seite P (2006) Human tumor suppressor p14ARF negatively regulates rRNA transcription and inhibits UBF1 transcription factor phosphorylation. *Oncogene* 25:7577-7586
222. Zhang Y (2004) The ARF-B23 connection: implications for growth control and cancer treatment. *Cell Cycle* 3:259-262
223. Lindstrom MS, Zhang Y (2006) B23 and ARF: friends or foes? *Cell Biochem Biophys* 46:79-90
224. den Besten W, Kuo ML, Williams RT, Sherr CJ (2005) Myeloid leukemia-associated nucleophosmin mutants perturb p53-dependent and independent activities of the Arf tumor suppressor protein. *Cell Cycle* 4:1593-1598
225. Colombo E, Martinelli P, Zamponi R, Shing DC, Bonetti P, Luzi L, Volorio S, Bernard L, Pruneri G, Alcalay M, *et al.* (2006) Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the leukemia-associated NPM mutant. *Cancer Res* 66:3044-3050
226. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, *et al.* (2005) Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 352:254-266
227. Alcalay M, Tiacci E, Bergomas R, Bigerna B, Venturini E, Minardi SP, Meani N, Diverio D, Bernard L, Tizzoni L, *et al.* (2005) Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+ AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. *Blood* 106:899-902
228. Cheng K, Grisendi S, Clohessy JG, Majid S, Bernardi R, Sportoletti P, Pandolfi PP (2007) The leukemia-associated cytoplasmic nucleophosmin mutant is an oncogene with paradoxical functions: Arf inactivation and induction of cellular senescence. *Oncogene* 26:7391-7400
229. Qi Y, Gregory MA, Li Z, Brousal JP, West K, Hann SR (2004) p19ARF directly and differentially controls the functions of c-Myc independently of p53. *Nature* 431:712-717
230. Hemmati PG, Güner D, Gillissen B, Wendt J, von Haefen C, Chinnadurai G, Dörken B, Daniel PT (2006) Bak functionally complements for loss of Bax during p14ARF-induced mitochondrial apoptosis in human cancer cells. *Oncogene* 25:6582-6594
231. Hemmati PG, Mürer A, Gillissen B, Overkamp T, Dörken B, Daniel PT Induction of mitochondrial apoptosis signaling by p14ARF critically depends on the BH3-only Protein Puma. submitted to *Oncogene*
232. Hemmati PG, Normand G, Gillissen B, Wendt J, Dörken B, Daniel PT (2008) Cooperative effect of p21Cip1/WAF-1 and 14-3-3sigma on cell cycle arrest and apoptosis induction by p14ARF. *Oncogene* 27:6707-6719
233. Eischen CM, Alt JR, Wang P (2004) Loss of one allele of ARF rescues Mdm2 haploinsufficiency effects on apoptosis and lymphoma development. *Oncogene* 23:8931-8940
234. Schmitt CA, McCurrach ME, de Stanchina E, Wallace-Brodeur RR, Lowe SW (1999) INK4a/ARF mutations accelerate lymphomagenesis and promote chemoresistance by disabling p53. *Genes Dev* 13:2670-2677
235. Sanchez-Aguilera A, Sanchez-Beato M, Garcia JF, Prieto I, Pollan M, Piris MA (2002) p14(ARF) nuclear overexpression in aggressive B-cell lymphomas is a sensor of malfunction of the common tumor suppressor pathways. *Blood* 99:1411-1418
236. Gronbaek K, Worm J, Ralfkiaer E, Ahrenkiel V, Hokland P, Guldborg P (2002) ATM mutations are associated with inactivation of the ARF-TP53 tumor suppressor pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 100:1430-1437
237. Wilda M, Bruch J, Harder L, Rawer D, Reiter A, Borkhardt A, Woessmann W (2004) Inactivation of the ARF-MDM-2-p53 pathway in sporadic Burkitt's lymphoma in children. *Leukemia* 18:584-588
238. Hutter G, Scheubner M, Zimmermann Y, Kalla J, Katzenberger T, Hubler K, Roth S, Hiddemann W, Ott G, Dreyling M (2006) Differential effect of epigenetic alterations and genomic deletions of CDK inhibitors [p16(INK4a), p15(INK4b), p14(ARF)] in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 45:203-210
239. Zhang SJ, Endo S, Saito T, Kouno M, Kuroiwa T, Washiyama K, Kumanishi T (2005) Primary malignant lymphoma of the brain: frequent abnormalities and inactivation of p14 tumor suppressor gene. *Cancer Sci* 96:38-41
240. Hayashi Y, Iwato M, Arakawa Y, Fujisawa H, Thoma Y, Hasegawa M, Tachibana O, Yamashita J (2001) Homozygous deletion of INK4a/ARF genes and overexpression of bcl-2 in relation with poor prognosis in immunocompetent patients with primary central nervous system lymphoma of the diffuse large B-cell type. *J Neurooncol* 55:51-58
241. Gardie B, Cayuela JM, Martini S, Sigaux F (1998) Genomic alterations of the p19ARF encoding exons in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 91:1016-1020
242. Konishi N, Nakamura M, Kishi M, Nishimine M, Ishida E, Shimada K (2002) Heterogeneous methylation and deletion patterns of the INK4a/ARF locus within prostate carcinomas. *Am J Pathol* 160:1207-1214
243. Calero Moreno TM, Gustafsson G, Garwicz S, Grandér D, Jonmundsson GK, Frost BM, Makiperna A, Rasool O, Savolainen ER, Schmiegelow K, *et al.* (2002) Deletion of the Ink4-locus (the p16ink4a, p14ARF and p15ink4b genes) predicts relapse in children with ALL treated according to the Nordic protocols NOPHO-86 and NOPHO-92. *Leukemia* 16:2037-2045

244. Faderl S, Kantarjian HM, Manshour T, Chan CY, Pierce S, Hays KJ, Cortes J, Thomas D, Estrov Z, Albitar M (1999) The prognostic significance of p16INK4a/p14ARF and p15INK4b deletions in adult acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 5:1855-1861
245. Mirebeau D, Acquaviva C, Suci S, Bertin R, Dastuge N, Robert A, Boutard P, Mechinaud F, Plouvier E, Otten J, *et al.* (2006) The prognostic significance of CDKN2A, CDKN2B and MTAP inactivation in B-lineage acute lymphoblastic leukemia of childhood. Results of the EORTC studies 58881 and 58951. *Haematologica* 91:881-885
246. Mullighan CG, Williams RT, Downing JR, Sherr CJ (2008) Failure of CDKN2A/B (INK4A/B-ARF)-mediated tumor suppression and resistance to targeted therapy in acute lymphoblastic leukemia induced by BCR-ABL. *Genes Dev* 22:1411-1415
247. Williams RT, Roussel MF, Sherr CJ (2006) Arf gene loss enhances oncogenicity and limits imatinib response in mouse models of Bcr-Abl-induced acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6688-6693
248. Linggi B, Muller-Tidow C, van de Locht L, Hu M, Nip J, Serve H, Berdel WE, van der Reijden B, Quelle DE, Rowley JD, *et al.* (2002) The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Nat Med* 8:743-750
249. Hiebert SW, Reed-Inderbitzin EF, Amann J, Irvin B, Durst K, Linggi B (2003) The t(8;21) fusion protein contacts co-repressors and histone deacetylases to repress the transcription of the p14ARF tumor suppressor. *Blood Cells Mol Dis* 30:177-183
250. Moreno-Miralles I, Pan L, Keates-Baleeiro J, Durst-Goodwin K, Yang C, Kim HG, Thompson MA, Klug CA, Cleveland JL, Hiebert SW (2005) The inv(16) cooperates with ARF haploinsufficiency to induce acute myeloid leukemia. *J Biol Chem* 280:40097-40103
251. Müller-Tidow C, Metzelder SK, Buerger H, Packeisen J, Ganser A, Heil G, Kugler K, Adiguzel G, Schwable J, Steffen B, *et al.* (2004) Expression of the p14ARF tumor suppressor predicts survival in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 18:720-726
252. Shikami M, Miwa H, Nishii K, Kyo T, Tanaka I, Shiku H, Kita K, Nitta M (2006) Low p53 expression of acute myelocytic leukemia cells with t(8;21) chromosome abnormality: association with low p14(ARF) expression. *Leuk Res* 30:379-383
253. Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, Cheng K, Khandker L, Manova K, Pandolfi PP (2005) Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature* 437:147-153
254. Mariano AR, Colombo E, Luzi L, Martinelli P, Volorio S, Bernard L, Meani N, Bergomas R, Alcalay M, Pelicci PG (2006) Cytoplasmic localization of NPM in myeloid leukemias is dictated by gain-of-function mutations that create a functional nuclear export signal. *Oncogene*
255. Bertwistle D, Sugimoto M, Sherr CJ (2004) Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Mol Cell Biol* 24:985-996
256. Brady SN, Yu Y, Maggi LB, Jr., Weber JD (2004) ARF impedes NPM/B23 shuttling in an Mdm2-sensitive tumor suppressor pathway. *Mol Cell Biol* 24:9327-9338
257. Colombo E, Marine JC, Danovi D, Falini B, Pelicci PG (2002) Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol* 4:529-533
258. Colombo E, Bonetti P, Lazzerini Denchi E, Martinelli P, Zamponi R, Marine JC, Helin K, Falini B, Pelicci PG (2005) Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability. *Mol Cell Biol* 25:8874-8886
259. den Besten W, Kuo ML, Tago K, Williams RT, Sherr CJ (2006) Ubiquitination of, and sumoylation by, the Arf tumor suppressor. *Isr Med Assoc J* 8:249-251
260. Enomoto T, Lindstrom MS, Jin A, Ke H, Zhang Y (2006) Essential role of the B23/NPM core domain in regulating ARF binding and B23 stability. *J Biol Chem* 281:18463-18472
261. Korgaonkar C, Hagen J, Tompkins V, Frazier AA, Allamargot C, Quelle FW, Quelle DE (2005) Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Mol Cell Biol* 25:1258-1271
262. Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, Frohling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Spath D, Morgan M, Benner A, *et al.* (2008) Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 358:1909-1918
263. Sportoletti P, Grisendi S, Majid SM, Cheng K, Clohessy JG, Viale A, Teruya-Feldstein J, Pandolfi PP (2008) Npm1 is a haploinsufficient suppressor of myeloid and lymphoid malignancies in the mouse. *Blood*
264. Bolli N, De Marco MF, Martelli MP, Bigerna B, Pucciarini A, Rossi R, Mannucci R, Manes N, Pettrossi V, Pileri SA, *et al.* (2009) A dose-dependent tug of war involving the NPM1 leukaemic mutant, nucleophosmin, and ARF. *Leukemia* 23:501-509
265. Nagy E, Beck Z, Kiss A, Csoma E, Telek B, Konya J, Olah E, Rak K, Toth FD (2003) Frequent methylation of p16INK4A and p14ARF genes implicated in the evolution of chronic myeloid leukaemia from its chronic to accelerated phase. *Eur J Cancer* 39:2298-2305
266. Kusy S, Larsen CJ, Roche J (2004) p14ARF, p15INK4b and p16INK4a methylation status in chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma* 45:1989-1994
267. Kusy S, Cividin M, Sorel N, Brizard F, Guilhot F, Brizard A, Larsen C, Roche J (2003) p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a methylation status in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 101:374-375

268. Cividin M, Ayrault O, Sorel N, Seite P, Brizard F, Blanchet O, Mahon FX, Guilhot F, Larsen C, Chomel JC, *et al.* (2006) Expression of the cell cycle regulators p14(ARF) and p16(INK4a) in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 30:1273-1278
269. Vonlanthen S, Heighway J, Tschan MP, Borner MM, Altermatt HJ, Kappeler A, Tobler A, Fey MF, Thatcher N, Yarbrough WG, *et al.* (1998) Expression of p16INK4a/p16alpha and p19ARF/p16beta is frequently altered in non-small cell lung cancer and correlates with p53 overexpression. *Oncogene* 17:2779-2785
270. Sanchez-Cespedes M, Reed AL, Buta M, Wu L, Westra WH, Herman JG, Yang SC, Jen J, Sidransky D (1999) Inactivation of the INK4A/ARF locus frequently coexists with TP53 mutations in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 18:5843-5849
271. Mori S, Ito G, Usami N, Yoshioka H, Ueda Y, Kodama Y, Takahashi M, Fong KM, Shimokata K, Sekido Y (2004) p53 apoptotic pathway molecules are frequently and simultaneously altered in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 100:1673-1682
272. Zochbauer-Muller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD (2001) Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 61:249-255
273. Hsu HS, Wang YC, Tseng RC, Chang JW, Chen JT, Shih CM, Chen CY (2004) 5' cytosine-phosphoguanine island methylation is responsible for p14ARF inactivation and inversely correlates with p53 overexpression in resected non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10:4734-4741
274. Eymin B, Gazzeri S, Brambilla C, Brambilla E (2002) Mdm2 overexpression and p14(ARF) inactivation are two mutually exclusive events in primary human lung tumors. *Oncogene* 21:2750-2761
275. Park MJ, Shimizu K, Nakano T, Park YB, Kohno T, Tani M, Yokota J (2003) Pathogenetic and biologic significance of TP14ARF alterations in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 141:5-13
276. Silva J, Silva JM, Dominguez G, Garcia JM, Cantos B, Rodriguez R, Larrondo FJ, Provencio M, Espana P, Bonilla F (2003) Concomitant expression of p16INK4a and p14ARF in primary breast cancer and analysis of inactivation mechanisms. *J Pathol* 199:289-297
277. Silva J, Dominguez G, Silva JM, Garcia JM, Gallego I, Corbacho C, Provencio M, Espana P, Bonilla F (2001) Analysis of genetic and epigenetic processes that influence p14ARF expression in breast cancer. *Oncogene* 20:4586-4590
278. Bean GR, Bryson AD, Pilie PG, Goldenberg V, Baker JC, Jr., Ibarra C, Brander DM, Paisie C, Case NR, Gauthier M, *et al.* (2007) Morphologically normal-appearing mammary epithelial cells obtained from high-risk women exhibit methylation silencing of INK4a/ARF. *Clin Cancer Res* 13:6834-6841
279. Yarosh W, Barrientos T, Esmailpour T, Lin L, Carpenter PM, Osann K, Anton-Culver H, Huang T (2008) TBX3 is overexpressed in breast cancer and represses p14 ARF by interacting with histone deacetylases. *Cancer Res* 68:693-699
280. Vestey SB, Sen C, Calder CJ, Perks CM, Pignatelli M, Winters ZE (2004) p14ARF expression in invasive breast cancers and ductal carcinoma in situ--relationships to p53 and Hdm2. *Breast Cancer Res* 6:R571-585
281. Kang MY, Lee BB, Ji YI, Jung EH, Chun HK, Song SY, Park SE, Park J, Kim DH (2008) Association of interindividual differences in p14ARF promoter methylation with single nucleotide polymorphism in primary colorectal cancer. *Cancer* 112:1699-1707
282. Lind GE, Thorstensen L, Lovig T, Meling GI, Hamelin R, Rognum TO, Esteller M, Lothe RA (2004) A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Mol Cancer* 3:28
283. Gibson SL, Dai CY, Lee HW, DePinho RA, Gee MS, Lee WM, Furth EE, Brensinger C, Enders GH (2003) Inhibition of colon tumor progression and angiogenesis by the Ink4a/Arf locus. *Cancer Res* 63:742-746
284. Iida S, Akiyama Y, Nakajima T, Ichikawa W, Nihei Z, Sugihara K, Yuasa Y (2000) Alterations and hypermethylation of the p14(ARF) gene in gastric cancer. *Int J Cancer* 87:654-658
285. Ito S, Ohga T, Saeki H, Watanabe M, Kakeji Y, Morita M, Yamada T, Maehara Y (2007) Promoter hypermethylation and quantitative expression analysis of CDKN2A (p14ARF and p16INK4a) gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 27:3345-3353
286. Smeds J, Berggren P, Ma X, Xu Z, Hemminki K, Kumar R (2002) Genetic status of cell cycle regulators in squamous cell carcinoma of the oesophagus: the CDKN2A (p16(INK4a) and p14(ARF)) and p53 genes are major targets for inactivation. *Carcinogenesis* 23:645-655
287. Sarbia M, Geddert H, Klump B, Kiel S, Iskender E, Gabbert HE (2004) Hypermethylation of tumor suppressor genes (p16INK4A, p14ARF and APC) in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Int J Cancer* 111:224-228
288. Huang Y, Peters CJ, Fitzgerald RC, Gjerset RA (2009) Progressive silencing of p14ARF in oesophageal adenocarcinoma. *J Cell Mol Med* 13:398-409
289. Sailasree R, Abhilash A, Sathyan KM, Nalinakumari KR, Thomas S, Kannan S (2008) Differential roles of p16INK4A and p14ARF genes in prognosis of oral carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:414-420
290. Ishida E, Nakamura M, Ikuta M, Shimada K, Matsuyoshi S, Kirita T, Konishi N (2005) Promotor hypermethylation of p14ARF is a key alteration for progression of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 41:614-622

291. Kresty LA, Mallery SR, Knobloch TJ, Li J, Lloyd M, Casto BC, Weghorst CM (2008) Frequent alterations of p16INK4a and p14ARF in oral proliferative verrucous leukoplakia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:3179-3187
292. Kresty LA, Mallery SR, Knobloch TJ, Song H, Lloyd M, Casto BC, Weghorst CM (2002) Alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) in patients with severe oral epithelial dysplasia. *Cancer Res* 62:5295-5300
293. Bardeesy N, Aguirre AJ, Chu GC, Cheng KH, Lopez LV, Hezel AF, Feng B, Brennan C, Weissleder R, Mahmood U, *et al.* (2006) Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5947-5952
294. Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson DA, Horner J, Redston MS, DePinho RA (2003) Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 17:3112-3126
295. Ghiorzo P, Pastorino L, Bonelli L, Cusano R, Nicora A, Zupo S, Queirolo P, Sertoli M, Pugliese V, Bianchi-Scarra G (2004) INK4/ARF germline alterations in pancreatic cancer patients. *Ann Oncol* 15:70-78
296. Bardeesy N, Morgan J, Sinha M, Signoretti S, Srivastava S, Loda M, Merlino G, DePinho RA (2002) Obligate roles for p16(Ink4a) and p19(Arf)-p53 in the suppression of murine pancreatic neoplasia. *Mol Cell Biol* 22:635-643
297. Kasahara T, Bilim V, Hara N, Takahashi K, Tomita Y (2006) Homozygous deletions of the INK4a/ARF locus in renal cell cancer. *Anticancer Res* 26:4299-4305
298. Weber A, Bellmann U, Bootz F, Wittekind C, Tannapfel A (2002) INK4a-ARF alterations and p53 mutations in primary and consecutive squamous cell carcinoma of the head and neck. *Virchows Arch* 441:133-142
299. Oda Y, Yamamoto H, Takahira T, Kobayashi C, Kawaguchi K, Tateishi N, Nozuka Y, Tamiya S, Tanaka K, Matsuda S, *et al.* (2005) Frequent alteration of p16(INK4a)/p14(ARF) and p53 pathways in the round cell component of myxoid/round cell liposarcoma: p53 gene alterations and reduced p14(ARF) expression both correlate with poor prognosis. *J Pathol* 207:410-421
300. Weihrauch M, Markwarth A, Lehnert G, Wittekind C, Wrbitzky R, Tannapfel A (2002) Abnormalities of the ARF-p53 pathway in primary angiosarcomas of the liver. *Hum Pathol* 33:884-892
301. Brown VL, Harwood CA, Crook T, Cronin JG, Kelsell DP, Proby CM (2004) p16INK4a and p14ARF tumor suppressor genes are commonly inactivated in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 122:1284-1292

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Mentor und Freund Herrn Professor Dr. med. Peter T. Daniel. Er hat mir das Feld der Apoptose-Forschung eröffnet und gab mir jegliche Hilfe und Unterstützung für meine wissenschaftliche Entwicklung und den Aufbau einer eigenen Arbeitsgruppe. Seine scharfe und analytische Sicht wissenschaftlicher Sachverhalte hat nicht nur meine Arbeit, sondern mein gesamtes wissenschaftliches Denken wesentlich geprägt. Durch seine immer verständnisvolle und aufmunternde Art, hat er dafür gesorgt auch schwere Zeiten zu überstehen.

Danken möchte ich darüber hinaus ganz besonders Herrn Professor Dr. med. Bernd Dörken. Er hat meinen Werdegang von Beginn an jederzeit großzügig unterstützt und mir die erforderlichen Rahmenbedingungen und Freiräume gegeben. So lenkte und unterstützte er mich stets dabei, meinen klinischen und wissenschaftlichen Werdegang eigenständig zu gestalten und kritisch zu hinterfragen.

Ebenso bedanke ich mich ganz besonders bei Frau Professor Dr. med. Renate Arnold. Sie hat einen wichtigen Teil meiner klinischen Ausbildung gestaltet und dabei alle meine Vorhaben jederzeit nachdrücklich unterstützt. Ihre warme und einfühlsame Art im Umgang mit Menschen sowie ihre Hingabe und Disziplin sind mir ein großes Vorbild.

Danken möchte auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Herrn Dr. rer. nat. Bernd Gillissen, Herrn Dr. rer. nat. Guillaume Normand, Herrn Dipl. Biol. Tim Overkamp und Frau Dipl. Ing. Annika Mürer für ihr großes persönliches Engagement, die stets konstruktive Zusammenarbeit und die vielen anregenden und produktiven Diskussionen. Darüber hinaus danke ich Frau Antje Richter und Frau Anja Richter für die großartige Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung zahlreicher Experimente.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Frau Petra für Ihre Liebe und Geduld, die mir stets ein unschätzbare und fortwährender Rückhalt sind, von ganzem Herzen danken.

Auch danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich zu jeder Zeit unterstützten.

12. Eidesstattliche Erklärung

gemäß § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift