

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie,
Onkologie und Tumorimmunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Funktion der Proteine Bax und Bak in der Initiation von
Apoptose durch das BH3-only-Protein Harakiri

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nicolas Terliesner

aus Stadtlohn

Datum der Promotion: 26.02.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Zusammenfassung	1
2 Abstract	2
3 Einleitung	3
3.1 Tumorgenese und zielgerichtete Chemotherapie	3
3.2 Zelltod	4
3.3 Apoptose.....	4
3.3.1 Zentrale Apoptosemediatoren: Caspasen	5
3.3.2 Apoptoseinitiation	7
3.3.3 Die Bcl-2-Proteinfamilie	10
3.3.4 Harakiri und Death Protein 5	17
3.3.5 Bedeutung der Bcl-2-Proteine und des Proteins Hrk für Tumorentstehung und -überleben	21
3.3.6 An der Bcl-2-Proteinfamilie angreifende spezifische Therapien	23
3.4 Fragestellung	25
4 Material und Methoden.....	26
4.1 Material.....	26
4.1.1 Geräte	26
4.1.2 Software	27
4.1.3 Chemikalien und Enzyme	28
4.1.4 Primer	30
4.1.5 Ribonukleinsäuren.....	31
4.1.6 Plasmidvektoren	31
4.1.7 Antikörper	31
4.1.8 Kits	32
4.1.9 Bakterien	32
4.1.10 Humane Zelllinien.....	32
4.2 Methoden.....	33
4.2.1 Molekularbiologische Methoden	33
4.2.2 Zellbiologische Methoden	40
4.2.3 Proteinbiochemie.....	43
4.2.4 Durchflusszytometrie	46
4.2.5 Statistische Auswertung	49

5	Ergebnisse	50
5.1	Herstellung des rekombinanten Adenovirus Ad-Hrk	50
5.2	Expression des Proteins Hrk und Transkriptionsregulation mittels Tet-Off-System.....	53
5.3	Hrk induziert DNA-Fragmentierung in HCT-116-Zellen	54
5.4	Hrk-induzierte DNA-Fragmentierung ist Bax-abhängig und Bak-unabhängig ..	56
5.5	Bax-Expression bleibt auch im zeitlichen Verlauf entscheidend für Apoptoseinduktion	58
5.6	Hrk-induzierter Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ist Bax-abhängig und Bak-unabhängig.....	59
5.7	Hrk-induzierte Procaspase 3-Spaltung ist Bax-abhängig und Bak-unabhängig	60
5.8	Knockdown von <i>mcl-1</i> sensitiviert Bax-defiziente Zellen gegenüber Hrk-induzierter DNA-Fragmentierung	61
5.9	Knockdown von <i>mcl-1</i> sensitiviert Bax-defiziente Zellen gegenüber Hrk-induziertem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ..	62
5.10	Knockdown von <i>mcl-1</i> sensitiviert Bax-defiziente Zellen gegenüber Hrk-induzierter Procaspase 3-Spaltung	64
6	Diskussion.....	66
6.1	Hrk induziert Apoptose in HCT-116-Zellen	66
6.2	Hrk-induzierte Apoptose ist abhängig von Bax und unabhängig von Bak.....	68
6.3	Knockdown von <i>mcl-1</i> sensitiviert Bax-defiziente Zellen gegenüber Hrk-induzierter Apoptose	70
6.4	Bedeutung der Ergebnisse für die translationale Forschung	74
6.5	Ausblick	78
7	Literaturverzeichnis.....	80
	Eidesstattliche Versicherung	i
	Lebenslauf.....	ii
	Danksagung	iii

Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Membranpotential
A1	Bcl-2-related protein A1
Ad	Adenovirus
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
AP-1	Activation protein-1
APAF-1	Apoptotic protease-activating factor-1
APS	Ammoniumpersulfat
ATF	Activating transcription factor
Bad	Bcl-2-associated agonist of cell death
Bak	Bcl-2-homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-b	Apoptosis regulator Bcl-b
Bcl-w	Bcl-2-like protein 2
Bcl-x _L	Bcl-2-like protein 1
Bcr/Abl	Breakpoint cluster region/Abelson tyrosine-protein kinase 1
BGH	Bovine growth hormone
BH	Bcl-2 homology domain
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
Bmf	Bcl-2 modifying factor
BNIP3	Bcl-2/E1B-19K-interacting protein 3
Bok	Bcl-2 related ovarian killer
c	Konzentration
CAPS	3-(Cyclohexylamino) Propan-1-Sulphonsäure
CARD	Caspase recruitment domain
Caspase	CysteinyI-Aspartat-spezifische Protease
cDNA	Komplementäre DNA
CMV	Cytomegalievirus
CVL	Crude virus lysate
d	Tag

dADP	Desoxyadenosindiphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DED	Death effector domain
DISC	Death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP5	Death protein 5
DRE	Downstream regulatory element
DREAM	DRE antagonist modulator
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetal calf serum
Fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HNPCC	Hereditäres nichtpolypöses Colonicarcinom
Hrk	Harakiri
HRP	Merrettich (horseradish)-Peroxidase
IBM	Inhibitor of apoptosis binding motif
IC ₅₀	Zur Halbierung der Bindungsanzahl benötigte Konzentration
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMS	Mitochondrialer Intermembranraum (intermembrane space)
iNOS	Inducible NO-Synthase
jBid	JNK-mediated cleaved Bid
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid
JNK	Jun N-terminal kinase
kb	Kilobasenpaare
KD	Knockdown

l	Liter
LB	Luria-Bertani
LITR	Left inverted terminal repeat
LOH	Heterozygotieverlust
m	Meter
M	Molar
m/v	Masse pro Volumen
Mcl-1	Myeloid cell leukemia 1
min	Minute
miRNA	Micro-RNA
MOI	Multiplicity of infection
MOMP	Permeabilitätserhöhung der OMM (mitochondrial outer membrane permeabilization)
Nbk	Natural born killer
NF-κB	Nuclear factor-κB
NGF	Nerve growth factor
OMM	Äußere Mitochondrienmembran (outer mitochondrial membrane)
ORF	Open reading frame
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAH	Polyaromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphate-buffered saline 0,9%
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFU	Plaque forming units
PI	Propidiumiodid
Puma	p53 up-regulated modulator of apoptosis
RITR	Right inverted terminal repeat
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat

siRNA	Small inhibitory RNA
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspase
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SV40	Simian virus 40
tBid	Truncated Bid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRE	Tetracycline-responsive element
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tTA	Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator
U	Unit
v/v	Volumen pro Volumen
Wt	Wildtyp
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis proteins
λ	Wellenlänge

1 Zusammenfassung

In malignen Zellen ist Apoptose häufig dysreguliert. Entscheidend bei der Regulierung der Apoptoseinduktion ist die Bcl-2-Proteinfamilie, deren Vertreter mittels Bcl-2-homologen Domänen (BH 1-4) interagieren. Die Proteinfamilie umfasst antiapoptotische Proteine wie Mcl-1 und proapoptotische wie Bax und Bak. Harakiri (Hrk) gehört zur proapoptotischen Untergruppe der lediglich die BH3-Domäne aufweisenden BH3-only-Proteine, die Bax und Bak durch Hemmung der antiapoptotischen Proteine aktivieren. Da die Expression von Hrk in verschiedenen Neoplasien erniedrigt ist, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welche Expressionsmuster von Bax und Bak Neoplasien einer Tumorthherapie mittels Substitution von Hrk zugänglich machen.

Um die durch Hrk aktivierten Signalwege zu untersuchen, wurde ein rekombinanter adenoviraler Vektor (Ad-Hrk) zur regulierbaren Überexpression von Hrk hergestellt. Mit dem Vektor transfizierte Hrk-negative HCT-116-Coloncarcinomzellen zeigen unter sog. On-Bedingungen eine deutliche Hrk-Expression. Die durchflusszytometrische Bestimmung der Rate hypodiploider Zellen erwies, dass die ektope Expression von Hrk in Wildtyp-HCT-116-Zellen Apoptose induziert. Um eine Abhängigkeit Hrk-induzierter Apoptose von Bax und Bak zu adressieren, wurde Hrk zusätzlich in HCT-116-Zellen mit spezifischem Verlust von Bax, Bak oder Bax *und* Bak überexprimiert. Im Gegensatz zu Bax-profizienten Zellen erwiesen sich Bax-defiziente HCT-116-Zellen unabhängig vom Bak-Expressionsstatus als resistent gegenüber Hrk. Hrk-Expression führte in Bax-profizienten Zellen, nicht aber in Bax-defizienten Zellen zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, zur Caspase 3-Aktivierung und zur DNA-Fragmentierung. Die Hrk-Resistenz Bax-negativer/Bak-positiver HCT-116-Zellen konnte interessanterweise durch siRNA-vermittelte Herunterregulation des Bak-Inhibitors Mcl-1 überwunden werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine erniedrigte Bax-Expression in Kombination mit Mcl-1-Expression ein Resistenzfaktor gegenüber Hrk-induzierter Apoptose ist. Folglich kommen nur Bax exprimierende oder Mcl-1-negative Neoplasien für eine Hrk substituierende Tumorthherapie in Frage. Da der Verlust von Bax und die Expression von Mcl-1 in Tumorzellen jedoch häufig vorkommen, ist vermutlich selbst in solchen Neoplasien ein Teil der Zellen resistent gegenüber Hrk-Substitution. Daher sollten entsprechende klinische Studien Kombinationstherapien mit einem Pharmakon nutzen, das diese Zellen mittels Inhibition von Mcl-1 sensibilisieren kann.

2 Abstract

Apoptosis is frequently dysregulated in malignant neoplasia. A crucial role in the regulation of apoptosis induction is played by the Bcl-2 family of proteins, which interact via Bcl-2 homology domains (BH1-4). The protein family comprises antiapoptotic proteins, such as Mcl-1, as well as proapoptotic proteins, such as Bax and Bak. Harakiri (Hrk) belongs to the subgroup of proapoptotic proteins which exhibit only the BH3 domain and are therefore called BH3-only proteins. These proteins activate Bax and Bak by inhibiting the antiapoptotic Bcl-2 family members. As the expression of *hrk* is suppressed in different types of neoplasia, Hrk is a potential target of a therapy that focusses on inducing apoptosis in tumour cells. The aim of this study is to determine which expression patterns of Bax and Bak in tumours are suitable for Hrk functionally substituting tumour therapies.

To investigate the signaling pathways downstream of Hrk, a recombinant adenoviral vector system (Ad-Hrk) for controlled overexpression of the protein was established. HCT-116 colon carcinoma cells transfected with Ad-Hrk show a distinct expression of Hrk if incubated under so-called On-conditions. Flow cytometric analysis of the rate of hypodiploid cells revealed induction of apoptosis in wild type HCT-116 cells after ectopic expression of Hrk. To address a potential dependency of Hrk-induced apoptosis from Bax and Bak, Hrk was overexpressed also in HCT-116 cells with specific loss of Bax, Bak or both. In contrast to Bax-proficient cells, Bax-deficient HCT-116 cells turned out to be resistant to Hrk. This was irrespective of the expression status of Bak. In Bax proficient, but not in Bax deficient cells, expression of Hrk lead to loss of the mitochondrial membrane potential, activation of Caspase 3 and DNA fragmentation. Interestingly, the resistance of Bax negative/Bak positive HCT-116 cells towards Hrk was overcome by siRNA-mediated downregulation of the Bak inhibitor Mcl-1.

The results demonstrate that a reduced expression of Bax in combination with the expression of Mcl-1 is a resistance factor against Hrk induced apoptosis. Hence only Bax expressing or Mcl-1 negative neoplasms are suitable for an Hrk substituting tumour therapy. As the loss of Bax and the expression of Mcl-1 are frequently found in tumour cells, presumably even in such neoplasms a part of the cells is resistant towards substitution of Hrk. Therefore accordant clinical studies ought to be based on combination therapies with drugs which can sensitize these cells by inhibition of Mcl-1.

3 Einleitung

3.1 Tumorgenese und zielgerichtete Chemotherapie

Der Verlust der Homöostase zwischen Zellproliferation und Zelltod spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung maligner Gewebsneoplasien. Bei physiologischem regenerativem Gewebe besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der Anzahl der eliminierten und der neu entstandenen Zellen. Bei malignen Tumoren hingegen erfolgt eine unkontrollierte, überschießende Proliferation, während gleichzeitig eine Fehlregulation des Zelltods mit konsekutiv verringerter Zelltodrate vorliegt.

Die Ursache einer solchen Fehlregulation ist in der Mutation und der Veränderung der Expression von Genen zu finden: den Zelltod unterdrückende Protoonkogene werden durch Überaktivierung zu Onkogenen, zelltodfördernde Tumorsuppressorgene werden inaktiviert. Eine bedeutende Rolle spielen dabei sowohl genetische Veränderungen als auch epigenetische Phänomene. Dabei besteht eine Abhängigkeit des Tumorwachstums von der pathologischen Expression dieser onkogener Faktoren, was als Oncogene Addiction bezeichnet wird.¹ Eine Ausschaltung solcher Faktoren führt zu Tumorregression.

Das Ziel jeder kurativen Tumorthherapie ist die Beseitigung aller Tumorzellen. Einen zunehmend wichtigeren Therapieansatz bietet im Unterschied zu der traditionellen die zielgerichtete Chemotherapie: Hierbei entscheiden, statt der Tumorentität, vorrangig die pathologischen Veränderungen der molekularen Signalwege, die das Tumorwachstum bedingen, über die Zusammensetzung der Pharmakotherapie.¹ Die Dringlichkeit einer derartigen Neuausrichtung der Tumorthherapie ergibt sich aus dem häufigen Versagen der traditionellen Chemotherapie, die ohne chirurgische Tumorexzision oder Tumorbestrahlung insbesondere bei soliden Tumoren in der Regel kein kuratives Therapiekonzept darstellt.

Klassischen Tumorentitäten können mittlerweile spezifische molekularpathologische Veränderungen zugeordnet werden, darüber hinaus wird die Möglichkeit einer für jeden Tumor individuelle Analyse von Onko- und Tumorsuppressorgenen angestrebt.¹⁻³ Substanzen, mit denen eben diese molekularen Pathologien spezifisch therapiert werden können, geben neue Hoffnung selbst für mit schlechter Prognose assoziierte Neoplasien. Die Grundvoraussetzung für eine solche zielgerichtete Pharmakotherapie ist allerdings – zunächst für die Entwicklung und später für den korrekten Einsatz von

Pharmaka – die Kenntnis der Signalwege, an denen die Therapie angreifen soll. Einen der Hauptangriffspunkte stellen Zelltodsignalwege dar, denen sich diese Arbeit widmet.

3.2 Zelltod

„Zelltod“ ist ein Oberbegriff, unter dem mehrere Arten von Zelltod geführt werden. Zytomorphologische Befunde als traditionelle Unterscheidungskriterien von Zelltodformen werden aktuell durch molekularbiologische Befunde ersetzt.⁴ Die Apoptose und Nekrose stellen die beiden am eindeutigsten voneinander zu differenzierenden Hauptformen dar.⁴ Neben Apoptose und Nekrose werden je nach Publikation andere zelluläre Ereignisse als separate Formen von Zelltod angesehen, deren generelle Einordnung oder Abgrenzbarkeit diskutiert wird: Hierzu gehören insbesondere der Autophagie-assoziierte Zelltod und die Mitotische Katastrophe sowie erst kürzlich beschriebene, noch schwierig einzuordnende Zelltodarten oder spezifischen Zellen zugeordnete Formen wie die Keratinisierung.⁴

Die Nekrose zeigt sich zytomorphologisch durch Zellschwellung, Organellenschwellung und Plasmamembranruptur mit konsekutivem Verlust intrazellulären Materials in den Extrazellulärraum, was eine Entzündungsreaktion des umgebenden Gewebes bewirkt.⁵ Sie gilt als nicht-programmierter, pathologischer Zelltod im Gegensatz zur Apoptose.⁶ Die Induktion der Nekrose kann allerdings auf molekularer Ebene durchaus reguliert sein, sie wird dann in vielen Fällen Nekroptose genannt.^{4, 5}

3.3 Apoptose

Das Phänomen der Apoptose wurde 1972 von Kerr, Wyllie und Curry benannt und von der oben beschriebenen Nekrose abgegrenzt.⁶ Apoptose spielt sowohl eine Rolle in der physiologischen Zelleliminierung in der Embryogenese, in sich ständig regenerierenden Geweben und bei Immunantworten als auch bei pathologischem Zellverlust in hyporegenerativem Gewebe, wie es bei neurodegenerativen Erkrankungen, beispielsweise Morbus Alzheimer, der Fall ist.⁷ Ebenso ist die Apoptose der durch zytostatische Chemo- und Strahlentherapie vorrangig induzierte Zelltodmechanismus.⁷

Die zytomorphologischen Kriterien der Apoptose sind in der ersten Phase Zellabrundung mit Retraktion von Pseudopodien, Verringerung des Zellvolumens (Pyknose), Chromatinkondensierung, nukleäre Fragmentierung (Karyorrhexis) mit DNA-Fragmentierung und Vesikelabschnürungen der Plasmamembran (Blebbing) und in der zweiten Phase Phagozytose der Residualstrukturen (Apoptotic bodies) durch

Phagozyten (s. Abb. 3.1).^{6, 7} Eine Entzündungsreaktion bleibt hierbei in der Regel aus, da die Plasmamembran intakt bleibt.^{6, 7}

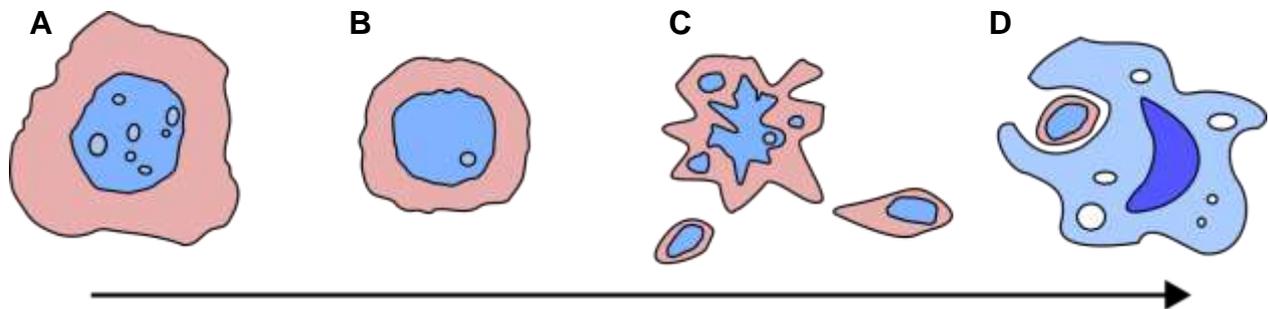


Abb. 3.1: Schema zur Zytomorphologie der Apoptose. A: nichtapoptotische Zelle; B: Pyknose, Chromatinkondensierung; C: Karyorrhexis, Blebbing; D: Phagozytose der Residualstrukturen durch Makrophagen

Die Apoptose mündet über diverse intrazelluläre Signalwege in der Aktivierung von Enzymen, die den Abbau intrazellulärer Strukturen katalysieren. Im Allgemeinen wird die Apoptose eingeteilt in die Initiations- und die Exekutionsphase, die in aktuellen Modellen durch einen virtuellen „point of no return“ voneinander getrennt werden, der allerdings in verschiedenen Konstellationen variieren kann. Weiterhin lässt sich die Initiationsphase dadurch unterteilen, wo sie ausgelöst wird: Der extrinsische Signalweg wird rezeptorvermittelt aktiviert, der intrinsische Signalweg dagegen ist in der Regel eine Antwort auf intrazelluläre Stresssignale.⁸ Diese Auftrennung der Initiation ist jedoch nicht vollständig, da die beiden Signalwege miteinander in Verbindung stehen, der intrinsische Signalweg beispielsweise auch rezeptorvermittelt aktiviert werden kann.

3.3.1 Zentrale Apoptosemediatoren: Caspasen

Eine zentrale Rolle in der Apoptose wird der Proteinfamilie der Cysteinyln-Aspartat-spezifischen Proteasen (Caspasen) zugeschrieben. Die Caspasen bilden eine funktionell heterogene Gruppe von 12 Proteasen (Caspase 1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -12, -14).⁹ Caspasen ohne direkt Apoptose-assoziierte Funktion sind die an inflammatorischen Prozessen beteiligten Caspasen 1, -4, -5, und 12 und die an der Keratinisierung beteiligte Caspase 14.⁹ Alle übrigen Caspasen werden durch apoptotische Initiationssignale aktiviert und katalysieren ihrerseits die limitierte Proteolyse apoptoserelevanter Proteine.⁹ Somit fungieren sie als Bindeglieder zwischen

Apoptoseinitiation und -exekution und außerdem als wesentliche Mediatoren der Apoptoseexekution.

Synthetisiert werden die Caspasen als Procaspasen, also als inaktive Zymogene, mit einer großen, einer kleinen und einer Prodomäne.⁹ Die Aktivierung erfolgt durch Spaltung in die drei einzelnen Domänen. Aktive Caspasen liegen als Heterotetramere mit je 2 kleinen und großen Untereinheiten vor, das katalytische Zentrum beinhaltet die konservierten Aminosäuren Cystein und Histidin.^{9, 10} Die Caspasen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität.⁹

Es werden Initiatorcaspasen (Caspase 2, -8, -9, -10) mit langer von Effektorcaspasen (Caspase 3, -6, -7) mit kurzer Prodomäne unterschieden.⁹ Die lange Prodomäne der Initiatorcaspasen beinhaltet die Caspase recruitment domain (CARD) oder Death effector domain (DED), die für die Bindung aktivierender Proteinkomplexe nötig sind, und so – neben der aktivierenden Spaltung durch andere Caspasen – eine paraproteolytische Aktivierung und im Anschluss daran die Autoproteolyse ermöglichen.^{9, 11-14} Die Aktivierung von Effektorcaspasen dagegen erfolgt ausschließlich mittels limitierter Proteolyse.^{9, 15, 16}

Aus den Eigenschaften der Caspasen ergibt sich ein Muster der Caspaseaktivierung und somit der apoptotischen Signalwege: Zunächst konvergieren initiatorische Signalwege über aktivierte Initiatorcaspasen in der Aktivierung der Effektorcaspasen, diese modulieren dann die Funktion von >300 Substraten, welche schließlich die verschiedenen Aspekte des Apoptosevorgangs exekutieren.⁹

Die Aktivität der Effektorcaspasen ist streng reguliert. Aktiviert werden Effektorprocaspasen direkt durch die von Initiatorcaspasen katalysierte Spaltung. Inhibiert werden sie insbesondere durch das Protein X-linked inhibitor of apoptosis proteins (XIAP).¹⁷ Dieses hemmt die Caspasen erstens durch Bindung an deren aktives Zentrum und an eine weitere Bindungsstelle, das Inhibitor of apoptosis binding motif (IBM), zweitens leitet es ihren Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System ein.¹⁸⁻²⁰

Die vielfältigen Effekte der Substratspaltungen durch Caspasen beinhalten die Inaktivierung von XIAP und des Proteasoms als einen das Apoptosesignal verstärkenden Feedback-Mechanismus.^{21, 22} Ebenfalls wird die Aktivität an der Initiation beteiligter Proteine wie der Initiatorcaspasen und diverser Bcl-2-Proteine, die unten detailliert beschrieben werden, durch deren Prozessierung moduliert.²³⁻²⁵ Diese Feedback-Mechanismen tragen zur Unumkehrbarkeit der Apoptose bei – somit lässt

sich die ausreichende Aktivierung von Effektorcaspasen am ehesten als „point of no return“ der Apoptose einordnen.

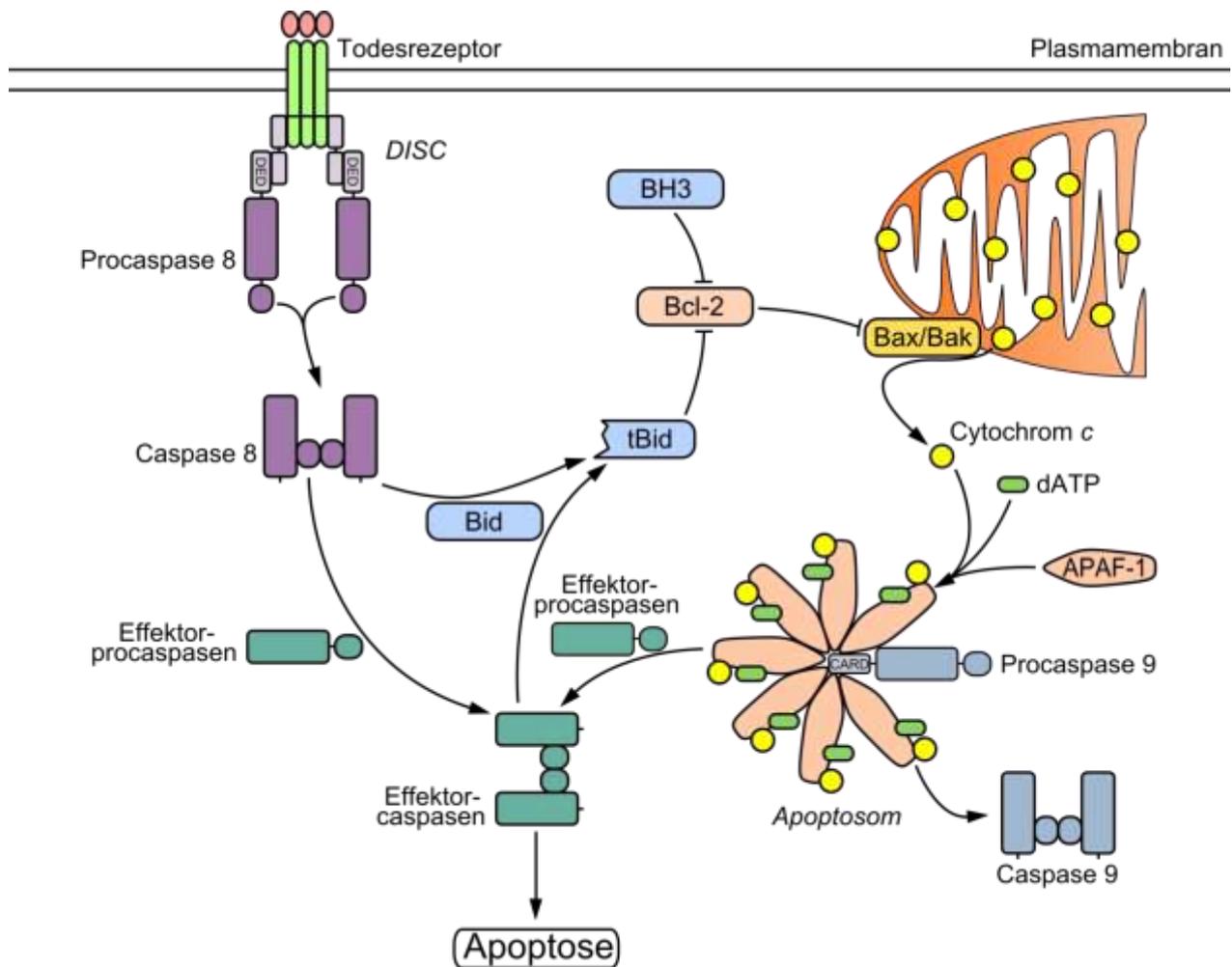


Abb. 3.2: Schema zum extrinsischen und intrinsischen Signalweg der Apoptoseinitiation. Beide Signalwege konvergieren in der Aktivierung von Effektorcaspasen. Mittels Trunkierung und Aktivierung von Bid wird rezeptorvermittelt der mitochondriale Signalweg aktiviert. Bcl-2: antiapoptotische Bcl-2-Proteine; BH3: BH3-only-Proteine; hellgrün: Rezeptor der TNF-Superfamilie (Todesrezeptor); rot: aktivierender Ligand; orange: Mitochondrium. Detaillierte Erklärung: s. Text.

3.3.2 Apoptoseinitiation

Die Induktion der Apoptose in ihren oben beschriebenen Einzelheiten bedeutet den Untergang der Zelle. Folglich muss die Apoptose so genau reguliert sein, dass die Zelle im physiologischen Zustand vor Apoptose bewahrt wird – in pathologischen Zellen wie potentiellen Tumorzellen dagegen und auch in Zellen, die Entwicklungs- oder gewebserneuernden Vorgängen geopfert werden, Apoptose stattfindet. Diese

schwerwiegende Entscheidung über Leben und Tod der Zelle bedarf einer regulatorischen Initiationsphase der Apoptose, in der überlebens- und todesfördernde Signale gegeneinander abgewogen werden.

Wie bereits erwähnt, lässt sich die Apoptoseinitiation in zwei verschiedene Initiationswege (extrinsisch und intrinsisch) auftrennen, die jedoch miteinander in Kontakt stehen (s. Abb. 3.2).⁸

3.3.2.1 Der extrinsische Initiationsweg

Der extrinsische, rezeptorvermittelte Signalweg hat seinen Startpunkt in der Aktivierung eines sogenannten Todesrezeptors aus der Superfamilie der Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Rezeptoren durch Ligandenbindung und Oligomerisierung.²⁶

Nach Aktivierung des Rezeptors entsteht an der intrazellulären Rezeptordomäne der sogenannte Death-inducing signaling complex (DISC).²⁶ Nach Rekrutierung der Procaspase 8, Homodimersierung und folgender Autoproteolyse dieser am DISC aktiviert die Caspase 8 zytosolische Substrate.²⁷

Diese sind insbesondere die Effektorcaspasen 3 und -7, nach deren Aktivierung Apoptose exekutiert wird.^{15, 27} Auch das Protein BH3 interacting domain death agonist (Bid), das zur Gruppe der unten beschriebenen BH3-only-Proteine gehört, wird einer durch Caspase 8 katalysierten Spaltung zu truncated Bid (tBid) unterzogen. Dadurch wird es aktiviert und der extrinsische mit dem intrinsischen Apoptoseinitiationsweg gekoppelt.^{27, 28}

3.3.2.2 Aktivierung der Caspase 9 im mitochondrialen Signalweg

Der intrinsische, mitochondrial vermittelte Signalweg hat seinen Startpunkt in einer Vielfalt intrazellulärer Stresstimuli, zu denen insbesondere DNA Damage durch Behandlung mit ionisierender Strahlung oder Chemotherapeutika sowie Chemotherapeutika-induzierter Endoplasmatisches Retikulum (ER)-Stress gehören.^{29,}

³⁰ Diese Stresssignale verursachen über spezifische Signalwege eine Permeabilitätserhöhung der äußeren Mitochondrienmembran (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP), die die zur Caspaseaktivierung notwendige Freisetzung apoptotischer Proteine aus dem mitochondrialen Intermembranraum (intermembrane space, IMS) ins Zytosol ermöglicht.^{30, 31}

Nach MOMP entweicht das Protein Cytochrom c, das in nichtapoptotischen Zellen einen Teil der Atmungskette bildet, aus dem IMS ins Zytosol, wo es an das Protein

Apoptotic protease activating factor-1 (APAF-1) bindet.^{8, 32} Dieser Proteinkomplex heptamerisiert daraufhin unter Hydrolyse von (d)ATP zu (d)ADP zu einer radförmigen Struktur, die Apoptosom genannt wird.^{8, 16, 27} Durch Interaktion der dabei exponierten CARD-Domäne von APAF-1 mit der CARD-Domäne der Procaspase 9 wird diese rekrutiert und aktiviert, woraufhin sie die Aktivierung der Effektorprocaspase 3 und -7 katalysiert.^{16, 27}

Im Gegensatz zur Procaspase 8 wird die Procaspase 9 ausreichend durch Konformationsänderungen bei der Rekrutierung ins Apoptosom aktiviert, die Autoprozessierung zur Caspase 9 dagegen scheint eine Limitation derer Aktivität zu sein: Die prozessierte Caspase 9 wird durch Procaspase 9 aus dem Proteinkomplex verdrängt, wodurch ihre enzymatische Aktivität abnimmt - unter anderem auf Grund einer stärkeren Inhibition der Caspase- als der Procaspase 9 durch XIAP.^{18, 27, 33}

Weitere Proteine, die nach MOMP aus dem IMS ins Zytosol diffundieren und mit der Aktivierung der Effektorprocaspasen interferieren, sind Second mitochondria-derived activator of caspase (Smac) und Omi.^{34, 35} Beide binden das Protein XIAP und inhibieren dieses, wodurch Caspase 9 und die Effektorcaspasen enthemmt werden.

In aktuellen Modellen zur MOMP wird in der Regel ein isoliertes Mitochondrium betrachtet. Im Gesamtzusammenhang der Zelle spielt es jedoch durchaus eine Rolle, ob die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (outer mitochondrial membrane, OMM) nur eines oder aller Mitochondrien erhöht ist. Es konnte gezeigt werden, dass sich die MOMP innerhalb der Zelle von einem Mitochondrium in Wellen zu anderen Mitochondrien ausbreitet.³⁶ In die MOMP-Ausbreitung scheinen hier auch andere Organellen wie das ER involviert.³⁶

3.3.2.3 Verbindung beider Signalwege

Die Verstärkung des Rezeptorsignals durch Spaltung von Bid zu tBid spielt eine wichtige Rolle bei der Todesligand-vermittelten Apoptose.^{28, 30} In sogenannten Typ I-Zellen erfolgt nach Bindung von Todesliganden eine direkte Aktivierung von Effektorcaspasen durch Caspase 8. In Typ II-Zellen dagegen sind die durch tBid vermittelte Freisetzung mitochondrialer Proteine und die Aktivierung von Caspase 9 essentiell für die Aktivierung von Effektorcaspasen.³⁷⁻³⁹ Hierbei spielt das Protein Smac eine entscheidende Rolle, indem es die Hemmung der Effektorcaspasen durch den Antagonisten XIAP aufhebt, welcher in Typ II-Zellen nach Ligandenbindung an den Todesrezeptor stabilisiert wird.^{38, 40}

3.3.3 Die Bcl-2-Proteinfamilie

Der Namensgeber der Bcl-2-Proteinfamilie, das Protein B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), wurde im Jahr 1984 von Tsujimoto et al. als Produkt des Gens identifiziert, welches auf Grund der für das Follikuläre Lymphom typischen Translokation 14;18 überexprimiert und dadurch zum Onkogen wird.^{41, 42} Später sind verschiedene Proteine entdeckt worden, die strukturell homologe Domänen zu Bcl-2 aufweisen. Zusammen bilden sie eine evolutionär konservierte Proteinfamilie.³⁰

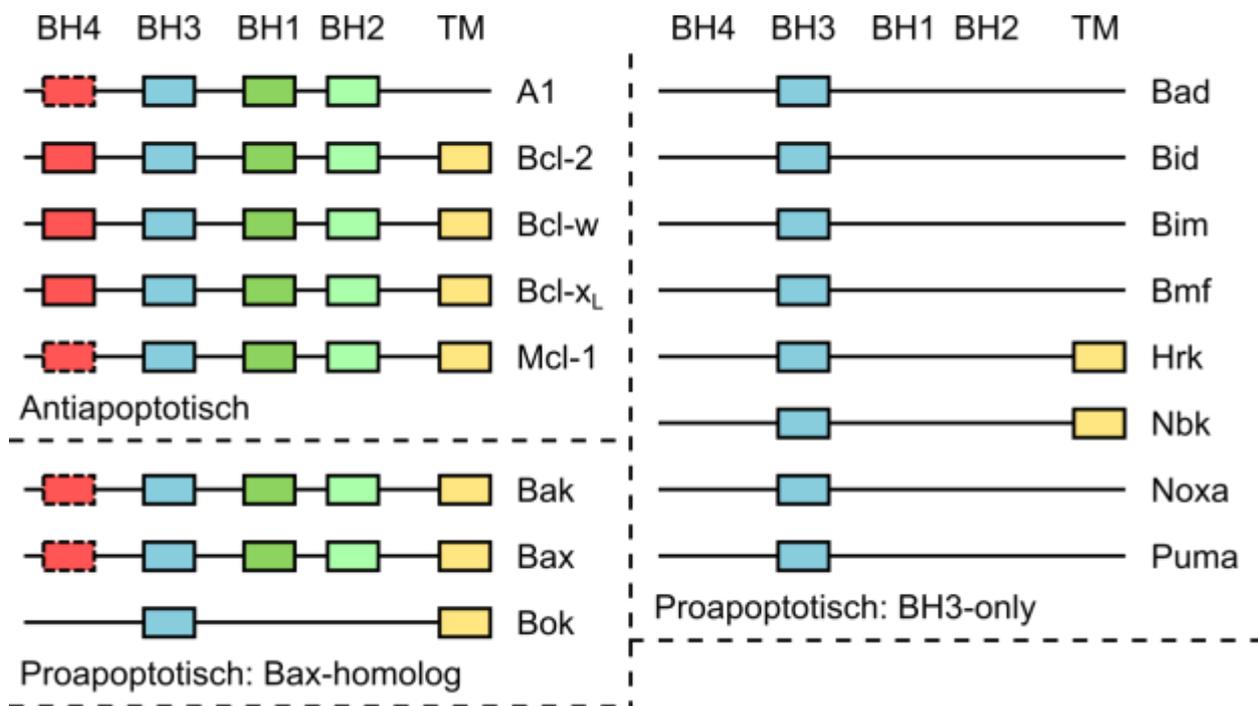


Abb. 3.3: Strukturvergleich der Subgruppen der Bcl-2-Proteinfamilie. In proapoptotischen Bcl-2-Proteinen ist je nach Modell keine BH4-Domäne vorhanden, in BH3-only-Proteinen zusätzlich keine BH1- und BH2-Domäne. Aus der Reihe der BH3-only-Proteine weisen nur Hrk und Nbk eine Transmembrandomäne auf. Die Zuerkennung der BH4-Domänen zu Mcl-1, A1, Bax und Bak, hier mit gestrichelter Umrandung, wird noch diskutiert. TM: Transmembrandomäne.

Mittels der Bcl-2-Proteine findet eine fein regulierte Umwandlung der intrazellulären Stresssignale in MOMP statt – sie sind also sowohl Stresssensoren als auch die Wächter der mitochondrial vermittelten Apoptose.³⁰

Die Verschiedenartigkeit der Funktionen legt nahe, dass die Proteinfamilie eine heterogene Gruppe darstellt. Dementsprechend lässt sie sich nach ihrer Funktion zunächst in zwei Untergruppen aufteilen, eine proapoptotische und eine antiapoptotische.³⁰ Die Untergruppe der proapoptotischen Bcl-2-Proteine lässt sich

nach ihrer Funktion weiter auftrennen in die Gruppe der Bax-Homologen, die direkt an der MOMP beteiligt sind, und die Gruppe der BH3-only-Proteine, die antagonistisch zu den antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen die Aktivität der Bax-Homologen regulieren.³⁰

Interessanterweise korreliert diese funktionelle Unterteilung mit einer strukturellen Unterscheidung verschiedener Gruppen der Bcl-2-Proteinfamilie nach dem Muster von Bcl-2-Homologiedomänen (BH) in der Proteinstruktur. Die BH3-only-Proteine weisen allein die BH3-Domäne auf, im Gegensatz zur Gruppe der Bax-Homologen, in denen die BH-Domänen 1-3 vorhanden sind und die deshalb auch Multidomänen-Proteine genannt werden (s. Abb. 3.3).^{30, 43-45} In klassischen Modellen beinhalten die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine mit Ausnahme der Proteine Mcl-1 und A1 zusätzlich die Domäne BH4.³⁰ Jedoch sind auch in Mcl-1, A1 sowie in Bax und Bak BH4-ähnliche Domänen nachgewiesen, sodass je nach Publikation auch diesen Proteinen eine BH4-Domäne zugesprochen wird.⁴⁶ Für die meisten Proteine der Bcl-2-Familie, insbesondere die Gruppen der Bax-Homologen und der antiapoptotischen Vertreter, sind außerdem Transmembrandomänen beschrieben worden, über die sie in Membranen wie die des Mitochondriums oder des ER inserieren.³⁰

Die Interaktionen zwischen den drei Untergruppen der Bcl-2-Proteine basieren im Wesentlichen auf der Bindung der amphiphatischen α -Helix der BH3-Domäne eines proapoptotischen in die hydrophobe Furche eines antiapoptotischen oder Bax-homologen Vertreters, die durch die BH1-, -2- und -3-Domänen gebildet und die BH4-Domäne stabilisiert wird.^{30, 45, 47, 48} Unterschiedliche Affinitäten zwischen verschiedenen proapoptotischen Proteinen und antiapoptotischen Bindungspartnern ergeben sich wahrscheinlich aus unterschiedlichen Konformationen der BH3-Domänen und hydrophoben Furchen. Die Furchen der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine unterscheiden sich in ihrer Weite und Rigidität.⁴⁹ Für die Differenzierung zwischen der proapoptotischen Funktion der Bax-Homologen und der antiapoptotischen Funktion der Gegenspieler, die beide hydrophobe Furchen ausbilden, sind verschiedenartige α -Helices in der BH1-Domäne entscheidend.⁵⁰

Eine mögliche weitere Akzeptorstelle für die BH3-Domäne von BH3-only-Proteinen bietet eine flachere hydrophobe Furche, die sich (im Vergleich zur durch BH1-3 gebildeten Furche) auf der Gegenseite des Proteins Bax befindet und über die wahrscheinlich eine direkte Aktivierung von Bax erfolgen kann.⁵¹

Über die Apoptose hinaus sind für Proteine der Bcl-2-Familie Funktionen beschrieben worden, die nicht direkt apoptoseassoziiert sind oder auch andere Zellorganellen als

das Mitochondrium betreffen. Hierzu zählen insbesondere die Induktion von Autophagie sowie die Regulierung der mitochondrialen Morphologie und des ER-Calciumhaushalts.^{29, 30, 52}

3.3.3.1 Die Gruppe der Bax-Homologen

Die direkt an der MOMP beteiligte und in ihrer Aktivität durch die gesamte Bcl-2-Proteinfamilie regulierte Untergruppe ist die der proapoptotischen Bax-Homologen. Zu dieser gehören die Proteine Bcl-2-associated X protein (Bax), Bcl-2-homologous antagonist/killer (Bak) und Bcl-2 related ovarian killer (Bok).⁵³⁻⁵⁵ Die Resistenz doppelt *bax*- und *bak*-negativer Zellen gegenüber einer Vielzahl apoptotischer Stimuli zeigt deren Bedeutung in der Aktivierung der Apoptoseexekution.^{56, 57} Aus diesem Grund und da *bok*^{-/-}-Mausmodelle morphologisch weitgehend unauffällig sind, scheint Bok funktionell in Bezug auf die Apoptoseinitiation weniger bedeutend zu sein.⁵⁸

Das im inaktiven Zustand nur zu einem geringen Anteil an Mitochondrien vorliegende Bax transloziert bei der Aktivierung zur OMM, während Bak auch im inaktiven Zustand vor allem in der OMM lokalisiert ist.^{59, 60} Beide gehen während der Aktivierung Konformationsänderungen ein, die zur Bildung von Homodimeren mit den Bindungsstellen BH3-Domäne:Furche und α -Helix: α -Helix führen, welche wiederum Dimer-Dimer-Bindungen zu Proteinaggregaten von bisher unklarer Größe eingehen.⁸ Zellfreie Modelle haben gezeigt, dass in Lipidmembranen nach Bax-Aktivierung eine Pore mit einem geeignet großen Durchmesser ausgebildet wird, um eine Freisetzung Apoptose-assoziiertes Proteinen zu ermöglichen.⁸ Die vorliegenden Daten können die Art des Einflusses von Bax und Bak auf die MOMP bisher nicht im Detail erklären – zweifellos aber zeigen sie einen direkten Zusammenhang zwischen Bax- bzw. Bak-Proteinaktivierung und der Freisetzung der Proteine aus dem IMS.

3.3.3.2 Die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine

Zur Gruppe der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine werden die Proteine Bcl-2, Bcl-2-like protein 1 (Bcl-x_L), Bcl-2-like protein 2 (Bcl-w), Myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1) und Bcl-2-related protein A1 (A1) gezählt.^{30, 41, 61-64} Darüber hinaus wird auch das Protein Apoptosis regulator Bcl-b (Bcl-b) in diese Gruppe eingeordnet, zum Zeitpunkt der Arbeit lagen jedoch nur wenige Daten dazu vor.³⁰

Die antiapoptotischen Proteine antagonisieren die Bax-homologen und die BH3-only-Proteine durch Bindung an diese.^{30, 53} Sie weisen unterschiedliche Affinitäten zu Bax

und Bak und dadurch funktionell verschiedene Spezifitäten bezüglich der Antagonisierung der Multidomänen-Proteine auf – so konnte für Bak gezeigt werden, dass es von Bcl-x_L, Mcl-1 und A1, jedoch nicht von Bcl-2 *in vivo* gebunden wird.^{65, 66}

Für die antiapoptotische Funktion der Proteine ist neben der Bindung anderer Bcl-2-Proteine die subzelluläre Lokalisation entscheidend.^{30, 67} Bcl-2 liegt gebunden an Membranen von Mitochondrium, ER und Kernhülle vor.⁶⁸ Bcl-x_L lässt sich darüber hinaus auch im Zytosol nachweisen, es inaktiviert Bax vermutlich durch Redistribution dessen vom Mitochondrium zum Zytosol.^{69, 70} Bcl-w scheint auf Grund einer fakultativ exponierten Transmembrandomäne im Zytosol und nur nach Konformationsänderung bei Bindung von BH3-Proteinen stabil in der mitochondrialen Membran verankert zu sein.⁷¹ Das Protein A1 ist am Mitochondrium lokalisiert.⁷² Mcl-1 lässt sich hauptsächlich am Mitochondrium, jedoch auch im Zytosol und im Nukleus nachweisen.⁷³ Die Funktion des Proteins ist an die mitochondriale Lokalisation geknüpft. Nach Deletion der N-terminalen Domäne, welche die Einlagerung in mitochondriale Membranen determiniert, verliert Mcl-1 zwar nicht die Fähigkeit, Bak zu binden, jedoch seine antiapoptotische Funktion.⁷⁴

3.3.3.3 Die BH3-only-Proteine

Die Gruppe der BH3-only-Proteine wirkt als Gegenspieler der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine in Bezug auf die Aktivierung von Bax und Bak.³⁰ Zu ihr gehören die Proteine Bid, Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim), p53 up-regulated modulator of apoptosis (Puma), Bcl-2 modifying factor (Bmf), Bcl-2-associated agonist of cell death (Bad), Natural born killer (Nbk), Noxa und das Protein Harakiri (Hrk), das Gegenstand dieser Arbeit ist (s. Abb. 3.3).^{44, 75-81} Mit BNIP3/BNIP3L und Beclin-1 sind weitere Proteine beschrieben worden, die die BH3-Domäne aufweisen und deshalb häufig den BH3-only-Proteinen zugeordnet werden.^{82, 83} Da sie jedoch vorrangig an der Induktion des Autophagie-assoziierten Zelltods beteiligt sind, werden sie hier nicht im Detail besprochen.^{82, 83}

Die BH3-only-Proteine sind an der zellulären Antwort auf unterschiedliche Arten von Stress wie Wachstumsfaktorentzug, Hypoxie, Bestrahlung und diverse Zytostatika beteiligt. Durch diese Stimuli werden sie transkriptionell induziert oder erfahren posttranslationale Modifikationen. Über die Vielfalt hinsichtlich der funktionellen Eigenschaften innerhalb der Subgruppe der BH3-only-Proteine sowie die Unterschiede hinsichtlich der subzellulären Lokalisation wird im Folgenden ein Überblick gegeben:

Eine Aktivierung durch limitierte Proteolyse des vor allem zytosolisch lokalisierten Bid zu tBid kann nicht nur wie oben erwähnt durch Caspase 8, sondern auch durch andere Proteasen wie das von zytotoxischen Zellen sezernierte Granzym B katalysiert werden.²⁸ Darüber hinaus bahnt JNK-mediated cleaved Bid (jBid), ebenfalls Produkt einer limitierten Proteolyse von Bid, durch die Freisetzung von Smac ins Zytosol die durch TNF-Rezeptoren vermittelte, extrinsische Apoptoseinitiation.⁸⁴ Das Protein Puma ist am Mitochondrium lokalisiert.⁷⁷ Es wird durch p53 oder p73 transkriptionell induziert und ist ein essentieller Mediator der p53-abhängigen Antwort auf DNA-Schädigung.^{77, 85, 86} Noxa ist ein mitochondrial lokalisiertes Protein, das neben Puma Teil der p53-abhängigen Antwort auf DNA-Schädigung ist.⁸⁰ Neben der transkriptionellen Induktion wird es insbesondere über den proteasomalen Abbau reguliert.⁸⁷ Interessanterweise übt Noxa seine proapoptotische Wirkung nicht nur durch inhibitorische Bindung an Mcl-1, sondern auch als ein Signal für die Degradierung von Mcl-1 aus.⁸⁸ Das Protein Bim liegt an Mikrotubuli gebunden und dadurch inaktiv vor, nach Phosphorylierung transloziert es zum Mitochondrium, woraufhin Bax und Bak aktiviert werden.^{89, 90} Ähnlich wie Bim liegt Bmf im inaktiven Zustand an das Zytoskelett, jedoch im Gegensatz zu diesem an das Aktin-Zytoskelett gebunden vor.⁷⁸ Es transloziert ebenfalls nach aktivierender Phosphorylierung. Involviert ist Bmf in die Apoptoseinitiation nach Kontaktverlust der Zelle.⁹¹ Bad ist ein in der gesunden Zelle zytosolisches Protein, das in apoptotischen Zellen ans Mitochondrium transloziert.^{92, 93} Durch sequentielle Phosphorylierung unter anderem der BH3-Domäne von Bad und darauf folgende Sequestrierung durch 14-3-3-Proteine wird die Affinität zu antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen gesenkt, das Protein also inaktiviert.^{92, 93} Das Protein Nbk ist am ER lokalisiert.^{94, 95} Es wird sowohl durch Phosphorylierung als auch durch limitierte Proteolyse posttranslational modifiziert.⁹⁶ Dabei verstärkt Phosphorylierung die propapoptotische Funktion und die Abspaltung der Transmembrandomäne stellt offenbar ein Signal für den proteasomalen Abbau dar.⁹⁶

Den BH3-only-Proteinen wird, klassischerweise auf Grund der verschiedenartigen Strukturen der jeweiligen BH3-Domäne, ein unterschiedliches Bindungsverhalten in Bezug auf die antiapoptotischen Homologen zugewiesen: tBid, Bim und Puma binden sämtliche antiapoptotischen Bcl-2-Proteine (Bcl-2, -x_L, -w, Mcl-1 und A1), während Nbk

nur Bcl-2, -x_L, -w und A1, Bmf und Bad nur Bcl-2, -x_L und -w, Noxa ausschließlich Mcl-1 und A1 mit hoher Affinität binden.^{97, a}

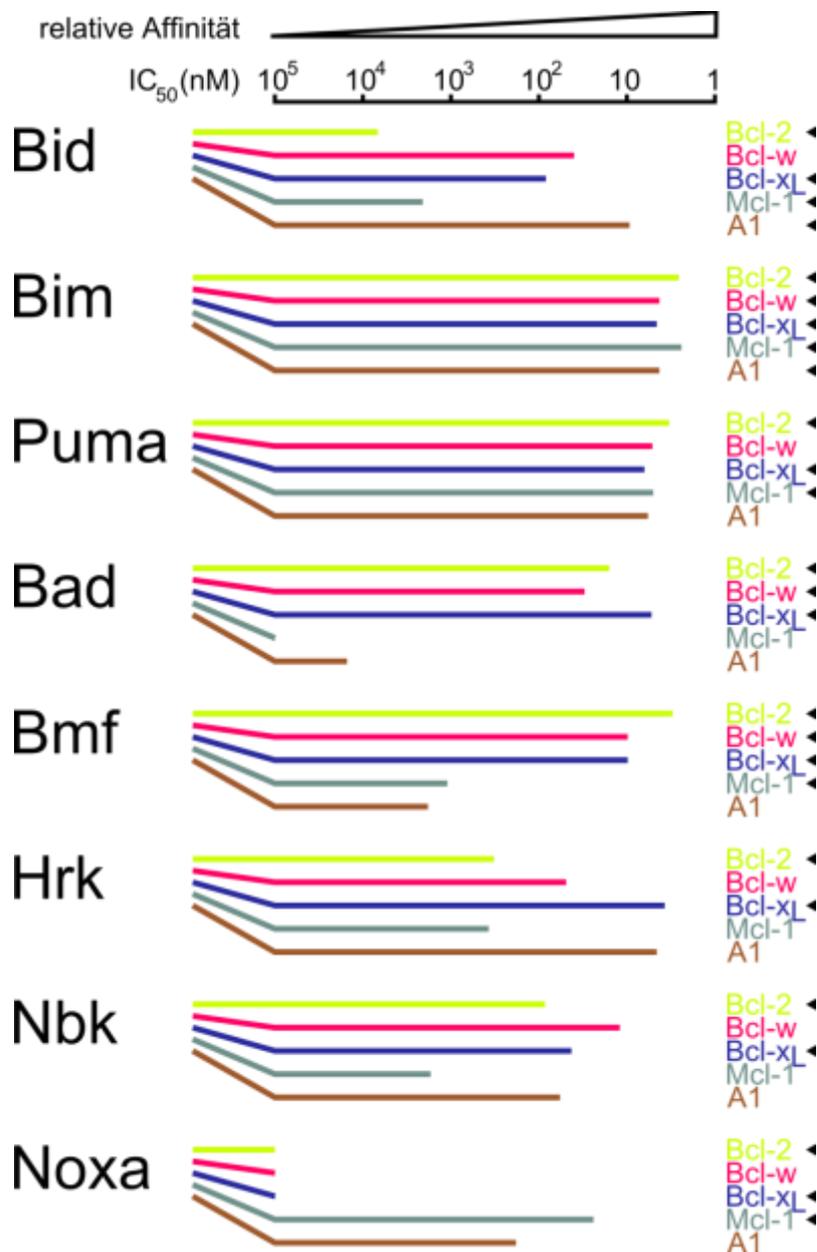


Abb. 3.4: Affinität von BH3-Peptiden zu antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen *in vitro* und Bindung *in vivo*. Die Balken (Bcl-2: gelb; Bcl-w: pink; Bcl-x_L: blau; Mcl-1: grau; A1: braun) geben die Affinität der jeweiligen BH3-Domänen *in vitro* an. Schwarze Dreiecke markieren mittels Coimmunopräzipitation nachgewiesene Protein-Protein-Interaktionen *in vivo*. Man beachte die Inkongruenz zwischen den *in vitro*- und *in vivo*-Daten (insbesondere Bid-Mcl-1 und Bmf-Mcl-1 gegenüber Hrk-Mcl-1; Noxa-Bcl-2; Noxa-Bcl-x_L). IC₅₀: zur Halbierung der Anzahl der Bindungen benötigte Konzentration eines Kompetitor-Peptids. Nach Chen et al. (2005).

^a Das Protein Hrk wird gesondert in Kap. 3.3.4 besprochen.

Diese Einschätzung von Willis und Adams (2005) beruht auf *in vitro*-Daten zu den Affinitäten zwischen den jeweiligen BH3-Peptiden und den antiapoptotischen Proteinen.⁹⁷⁻¹⁰⁰ Die Affinität zwischen BH3-Domäne und hydrophober Furche ist ein entscheidendes Kriterium für die Bindungseigenschaften des Proteins und es wurde beobachtet, dass sich beim Austausch dieser Domäne die Bindungspartner zu den der eingesetzten BH3-Domäne Entsprechenden verändern.¹⁰¹ Über die *in vitro*-Daten hinaus liegen *in vivo*-Daten vor, die allerdings Protein-Protein-Verbindungen nachweisen, welche den geringen Affinitäten mancher Peptide zu den antiapoptotischen Proteinen nicht entsprechen. Einen Überblick dazu bietet Abb. 3.4.^{75-79, 94, 98, 102, 103}

Über die Sequestrierung antiapoptotischer Bcl-2-Proteine hinaus können tBid, Bim und möglicherweise auch Puma direkt an die Proteine Bax und Bak binden, was zur Aktivierung der Multidomänenproteine beiträgt.^{51, 99, 104, 105}

3.3.3.4 Modelle zur funktionellen Interaktion der Bcl-2-Proteine

Es sind verschiedene integrative Modelle zur Regulation der MOMP durch die Bcl-2-Proteinfamilie vorgeschlagen worden (s. Abb. 3.5). Beim *Displacement*-Modell werden die Proteine Bax und Bak als konstitutiv aktiv oder autoaktivierbar angesehen, jedoch als durch antiapoptotische Bcl-2-Proteine inhibiert.⁹⁷ Nach Aufhebung der Hemmung von Bax und Bak mittels Sequestrierung der Inhibitoren durch BH3-only-Proteine wird MOMP ausgelöst. Dabei werden die *starken* BH3-only-Proteine mit hoher Affinität zu allen antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen (tBid, Bim, Puma) von den *schwachen* Proteinen mit selektiv hoher Affinität zu einer Auswahl der antiapoptotischen Proteine (Bad, Bmf, Hrk, Nbk, Noxa) unterschieden (s. Kap. 3.3.3.3).

Daraus, dass die Proteine tBid, Bim und möglicherweise auch Puma nicht nur die antiapoptotischen Proteine mit hoher Affinität, sondern direkt die Proteine Bax oder Bak binden, wird in manchen Publikationen geschlossen, dass diese als sogenannte *Activators* selbst die Multidomänen-Proteine aktivieren. In diesem *Direct Activation*-Modell werden die restlichen BH3-only-Proteine als *Sensitizers* eingeordnet. Die Aktivatoren werden hierbei zunächst selbst durch Sequestrierung der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine durch BH3-only-*Sensitizers* freigesetzt, bevor sie ihrerseits Bax und Bak aktivieren können.^{97, 106}

In einem neueren Ansatz, dem *Embedding Together*-Modell, wird der Tatsache Rechnung getragen, dass sämtliche der Vorgänge an Membranen stattfinden und die

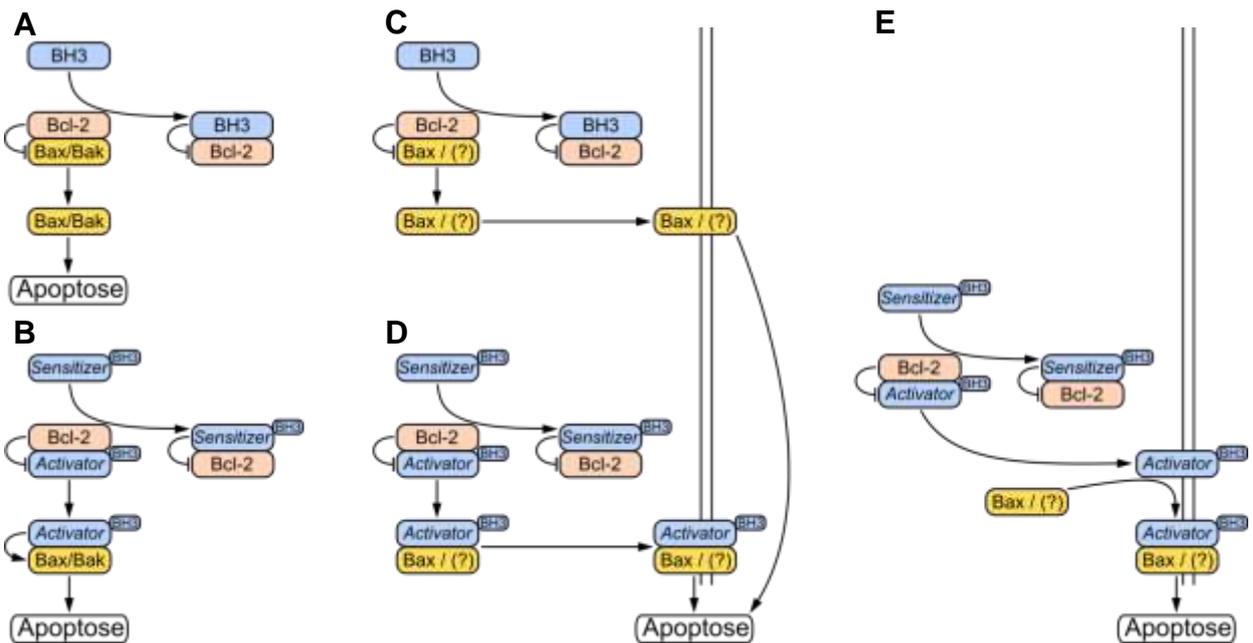


Abb. 3.5: Schemata zu den Modellen zur Regulation der MOMP und konsekutiv Apoptose durch die Bcl-2-Proteinfamilie. A: *Displacement-Modell*; B: *Direct Activation-Modell*; C und D: *Embedding-Together-Modell* als Erweiterung des *Displacement-* und *Direct Activation-Modells*: Einlagerung von Bax in OMM als zusätzlicher Aktivierungsschritt zur MOMP notwendig; E: *Embedding-Together-Modell*: BH3-only-Proteine katalysieren zusätzlich Einlagerung von Bax in OMM. Bcl-2: antiapoptotische Bcl-2-Proteine; vertikale Doppellinien: OMM; (?): Möglichkeit der Einordnung von Bak fraglich.

Lokalisation der Proteine in der Membran deren Konformation und insgesamt die Bax-/Bak-Aktivierung beeinflusst.¹⁰⁷ So wurde für tBid gezeigt, dass es zunächst an Membranen bindet, dann das zytosolische Bax rekrutiert, woraufhin eine Membranpermeabilisation stattfindet.¹⁰⁸ Dabei ist für die Bindung von tBid und Bax die Anwesenheit von Membranen unentbehrlich.¹⁰⁸ Darüber hinaus sind die beiden klassischen Modelle in das *Embedding Together-Modell* integriert.¹⁰⁷ Problematisch ist bei diesem Modell allerdings, dass Bak, im Gegensatz zu Bax, bereits im inaktiven Zustand membrangebunden vorliegt.⁶⁰ Ein der Membraneinlagerung äquivalenter Aktivierungsschritt des Proteins Bak ist nicht beschrieben.

3.3.4 Harakiri und Death Protein 5

Zuerst beschrieben und als Mitglied der BH3-only-Proteine identifiziert wurden das humane Protein Harakiri (Hrk) im Jahr 1997 von Inohara et al. und das murine orthologe Death Protein 5 (DP5) im selben Jahr von Imaizumi et al.^{81, 109}

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Homo sapiens</i>		82%	82%
<i>Mus musculus</i>	72%		>99%
<i>Rattus norvegicus</i>	72%	100%	

Tab. 1: Identitätsgrade der Aminosäuresequenz des Proteins Hrk/DP5 und der Nukleotidsequenz der cDNA *hrk/dp5* zwischen humaner und murinen Spezies. Grüner Hintergrund: Aminosäuresequenzen der Proteine; Blauer Hintergrund: Nukleotidsequenzen der cDNAs.

Das Gen *hrk* ist wie die anderen Gene der Bcl-2-Familie evolutionär konserviert und homologe Gene in den Spezies *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* sind beschrieben worden.¹¹⁰ Die Nukleotidsequenz der cDNA weist eine jeweils 82 %ige Identität mit der entsprechenden cDNA *dp5* der Spezies *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* auf, deren Translationsprodukt, das Death Protein 5 (DP5), in der Peptidsequenz eine 72 %ige Identität mit Hrk zeigt (s. Tab. 1). Das humane Gen ist auf Chromosom 12q24.22 gelegen.

3.3.4.1 Transkriptionelle Regulierung

Murine Gene dp5

Die Transkription der Gene *dp5* der Ratte und der Maus wird insbesondere induziert durch Entzug von Wachstumsfaktoren, Stimulation mit aromatischen Kohlenwasserstoffen, in pankreatischen Inselzellen durch Behandlung mit Zytokinen oder Frataxin-Suppression (entsprechend Friedreich-Ataxie) sowie in neuronalen Zellen durch Stimulation mit β -Amyloid oder nach Hypoxie.¹¹¹⁻¹¹⁶ Obwohl sich diese Stimuli sehr voneinander unterscheiden, sind sie mit ähnlichen Signalwegen zur Transkriptionsinduktion von *dp5* assoziiert. Gemeinsame Folge von Wachstumsfaktorentzug, Zytokinbehandlung, Stimulation mit β -Amyloid und Hypoxie beispielsweise ist die Induktion der Transkription durch Bindung von Transkriptionsfaktoren der Activation Protein-1 (AP-1)-Familie an ein im Promotor des *dp5*-Gens der Ratte lokalisiertes Activating transcription factor (ATF)-Bindungsmotiv. Aus der AP-1-Familie untersucht wurden Heterodimere von phosphoryliertem c-Jun, Substrat der Jun N-terminal kinase (JNK), mit ATF2 oder dem FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (Fos).^{111, 117} Darüber hinaus bindet auch ein

ATF2-Homodimer an ein im Promotor des *dp5*-Gens lokalisiertes ATF-Bindungsmotiv und induziert so die Transkription des Gens.¹¹¹ Weiter funktioniert das Protein Downstream regulatory element antagonist modulator (DREAM) der Maus über Bindung an die in 3'-Richtung des Offenen Leserahmens (*open reading frame*; ORF) lokalisierte Silencersequenz DRE als Transkriptionssuppressor von *dp5*.¹¹⁸ Als Transkriptionsaktivator des Gens *dp5* der Maus wirkt hingegen der Transkriptionsfaktor E2F-1.¹¹⁹ Nach Behandlung von β -Zellen der Ratte mit Zytokinen ist außerdem die Aktivierung der *dp5*-Transkription durch die von Nuclear factor- κ B (NF- κ B) transkriptionell induzierte inducible NO-Synthase (iNOS) beschrieben worden.¹¹² Hinweise gibt es außerdem auf die Transkriptionsaktivierung des Gens *dp5* durch den Transkriptionsfaktor Signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1).¹²⁰ Für primäre Mäuse-Ovarien konnte gezeigt werden, dass polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe über Bindung an den Aryl hydrocarbon receptor (AhR) die Transkription des Gens *dp5* induzieren.¹¹⁴

Humanes Gen hrk

Stimuli, die zur Induktion von *hrk* führen, sind insbesondere Entzug von Wachstumsfaktoren, Behandlung mit Zytostatika wie Etoposid und Doxorubicin sowie Edelfosin, Behandlung von β -Zellen mit Zytokinen und Infektion mit Bakterien.¹²¹⁻¹²⁴

Die transkriptionelle Induktion über einen JNK-vermittelten Signalweg konnte auch für das humane Gen gezeigt werden, sodass die oben für *dp5* genannten auf diesen Signalweg bezogenen Mechanismen wahrscheinlich auf *hrk* übertragbar sind.¹²⁵ Auch die DREAM-vermittelte Suppression der Transkription gilt neben *dp5* auch für *hrk*. Mittels Spaltung von DREAM durch die aktivierte Caspase 3 wird in Zellmodellen hämatopoietischer Neoplasien nach Fas-Aktivierung und Breakpoint cluster region/Abelson tyrosine-protein kinase 1 (Bcr/Abl)-Inhibition die Transkription des Gens *hrk* gebahnt.¹²⁶ So trägt Hrk zur Verstärkung des Apoptosesignals nach bereits erfolgter Apoptoseinitiation bei. Zuletzt ist auch der Transkriptionsfaktor E2F-1 zu nennen, der außer *dp5* auch die Transkription des humanen Gens *hrk* induziert.¹²⁷

3.3.4.2 Proteinstruktur und Interaktion mit anderen Proteinen und Membranen

Die 91 Aminosäuren große Primärstruktur des Proteins lässt sich in eine N-terminale zytosolische Domäne (Aminosäuren 1-60), welche die BH3-Domäne (Aminosäuren 33-47) enthält, und eine C-terminale Transmembrandomäne (Aminosäuren 61-91)

aufgliedern.^{109, 128-130} In der Sekundärstruktur besteht die zytosolische Domäne aus einem funktionell α -helikalen, amphiphilen Bereich, der die BH3-Domäne umgibt und einbezieht (Aminosäuren 29-53), jedoch wahrscheinlich bei fehlendem Bindungspartner nur eine geringe Strukturiertheit aufweist (s. Abb. 3.6).^{128, 130} Auf Grund dieser geringen Strukturiertheit in der Sekundärstruktur ist vermutlich im Vergleich zum Modell einer primären zytosolischen α -Helix ein erweiterter Funktionsradius möglich.¹³⁰ Die Transmembrandomäne bildet eine α -Helix aus.¹³¹ Das Protein Hrk/DP5 ist subzellulär wahrscheinlich als Monomer in der OMM lokalisiert.^{128, 131, 132}

Aus der Reihe der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine ist bislang insbesondere für die Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L *in vivo* gezeigt worden, dass Hrk sie bindet.⁸¹ *In vitro* ergab sich für die BH3-Domäne des Proteins (HrkBH3) die stärkste Interaktion mit Bcl-x_L aller BH3-Peptide (s. Abb. 3.4).⁹⁸ Im Vergleich zeigte sich eine schwächere Affinität zu Bcl-2.⁹⁸

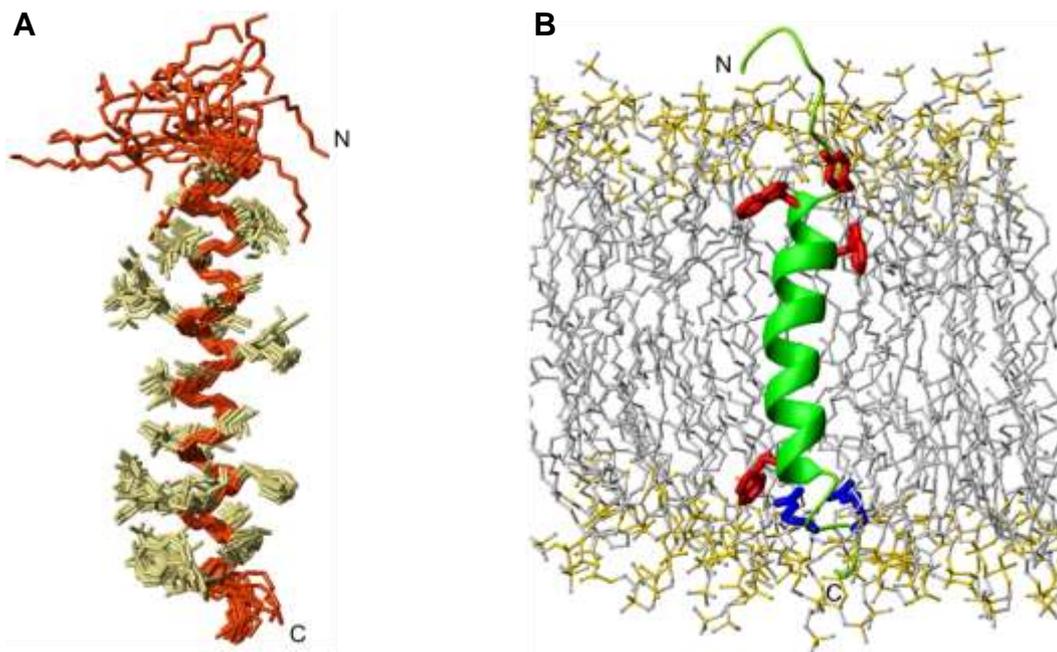


Abb. 3.6: Schemata zur Struktur des Proteins Hrk. N- und C-Termini oder -terminale Fragmentenden von Hrk sind gekennzeichnet. **A:** Modell der 20 Konformere der zytosolischen Domäne (AS 22-53) mit der niedrigsten Energie (Kernspinresonanzspektroskopie mit Trifluoroethanol). Rot: Rückgrat; beige: Seitenketten. Man beachte die geringe Strukturiertheit des N-terminalen Teils. **B:** Modell der Transmembrandomäne (AS 61-91) in Doppellipidschicht. Grün: Rückgrat; rot: Tryptophan-Seitenketten; dunkelblau: Arginin-Seitenketten; gelb und hellblau: Phospholipide. Aus Barrera-Vilarmau et al. (2011).

Die Schlüsselaminosäuren der BH3-Domäne von Hrk sind bei Bindung von Bcl-x_L Lys-38, Asp-42 und Glu-43 und bei Bindung von Bcl-2 zusätzlich Arg-36.¹²⁹ Außerdem gibt

es *in vitro* Hinweise auf eine Interaktion von Hrk mit A1, Bcl-w und Mcl-1 sowie mit Bcl-b, dessen homologes murines Protein von humanem Hrk gebunden wird.^{98, 130} Die Affinität von HrkBH3 zum vorrangigen Bak-Inhibitor Mcl-1 ist geringer als die zu Bcl-2, diejenige zu Bcl-w und A1 höher (s. Abb. 3.4).

Ein Bindungspartner von Hrk, der nicht zur Bcl-2-Familie gehört, ist möglicherweise das Protein p32, das zwar als membranständiges Homotrimer am Mitochondrium lokalisiert scheint, dessen Funktion und Einordnung in Apoptosesignalwege jedoch unklar sind.¹³²

3.3.4.3 Funktion

Hrk ist als BH3-only-Protein in den mitochondrialen Apoptoseinitiationsweg involviert, in dem es eine Rolle als Antagonist antiapoptotischer Proteine spielt.⁹⁷ So führt die ektope Expression von Hrk in verschiedenen Zellmodellen zum Zelltod bzw. zur Apoptose.^{81, 132} Auch ist für *hrk* oder *dp5* induzierende und Zelltod verursachende Stimuli wie Wachstumsfaktorentzug oder Zytokinbehandlung gezeigt worden, dass die Apoptoseraten der damit behandelten Zellen erniedrigt ist, wenn zuvor ein Knockdown von *hrk* bzw. *dp5* durchgeführt wurde.^{113, 123, 133} Dies bedeutet eine direkte Beteiligung der Proteine Hrk bzw. DP5 bei der Apoptoseinduktion durch diese Stimuli.^{113, 123, 133}

Zum Signalweg der Apoptoseinitiation stromabwärts von Hrk liegen außer den Bindungsanalysen zur BH3-Domäne keine Daten vor. Einzig für das Maus-Protein DP5 ist gezeigt worden, dass ein Verlust von Bax cerebelläre Körnerzellen der Maus vor DP5-induziertem Zelltod schützt.¹³⁴

3.3.5 Bedeutung der Bcl-2-Proteine und des Proteins Hrk für Tumorentstehung und -überleben

Welche Bedeutung haben die hier diskutierten Proteine für die Klinik? Neben genetischen Aberrationen sind auch epigenetische Fehlregulationen der Gene der Bcl-2-Familie in Neoplasien beschrieben.¹³⁵ Verringerte (bei proapoptotischen Proteinen) oder erhöhte (bei antiapoptotischen Proteinen) Expression der Bcl-2-Proteine werden sowohl in hämatologischen als auch in soliden Neoplasien vorgefunden, jeweils mit signifikantem Unterschied zu nicht-tumoralem Gewebe.¹³⁵ Klassischerweise mit dem Follikulären Lymphom assoziiert ist die vermehrte Expression des antiapoptotischen Bcl-2 auf Grund der Translokation t14;18.⁴¹ Aber auch die verringerte Expression proapoptotischer Proteine ist mit bestimmten Tumorentitäten

assoziiert wie Expressionsverluste der BH3-only-Proteine Nbk und Bim mit dem Nierenzellcarcinom.^{2, 3}

Bei Magen- und Colorectal-Karzinomen findet man zu 17 % bzw. 24 % Hypermethylierungen um den Transkriptions-Startpunkt des *hrk*-Gens (im Vergleich zu 2 % bei colorectalen Adenomata und 0% bei nichtdysplastischer Schleimhaut).¹³⁶ Auch in Prostata-Karzinomen steigt die Methylierungsrate des *hrk*-Promotors mit erhöhtem Gleason-Score an, sie korreliert mit Expressionsverlust und erniedrigtem Apoptotischem Index.¹³⁷ Beim sekundären Glioblastom wurde ebenfalls auf Grund von Promotorhypermethylierung oder Heterozygotieverlust (LOH) eine reduzierte *hrk*-Genexpression nachgewiesen, die mit einem erniedrigten Apoptotischen Index einhergeht.¹³⁸ Ebenso findet man in primären Lymphomen des Zentralen Nervensystems in 32 % der Fälle eine Hypermethylierung des Promotors, die auch hier mit einem *hrk*-Expressionsverlust korreliert.¹³⁹ Mit dem Malignen Melanom ist darüber hinaus auch für eine kutane Neoplasie gezeigt worden, dass der *hrk*-Promotor häufig hypermethyliert ist und im Melanom eine verringerte Expression des Gens im Vergleich zum Naevuszellnaevus vorliegt.¹⁴⁰

Untersuchungen haben gezeigt, dass die Fehlregulierung der Expression allein eines Bcl-2-Proteins nicht zur Tumorentstehung ausreicht – nichts desto trotz kann eine solche Fehlregulierung in Verbindung mit anderen Onkogenen eine essentielle Rolle bei der Tumorigenese einnehmen.^{135, 141} Das Tumorüberleben hingegen kann schon durch die Expression eines einzigen antiapoptotischen Proteins der Bcl-2-Familie begünstigt werden.¹⁴¹

Die entscheidende Frage, ob diese Veränderungen auch eine klinisch-prognostische Bedeutung haben, lässt sich klar bejahen: Sowohl in hämatologischen als auch in soliden Neoplasien sind die erniedrigte Expression pro- als auch die erhöhte Expression antiapoptotischer Bcl-2-Proteine verbunden mit erhöhter Resistenz gegenüber Chemotherapie, verringertem Rezidiv-freiem Überleben und verkürztem Gesamtüberleben.¹⁴²⁻¹⁴⁶ Dies konnte auch für Hrk gezeigt werden. Die Hypermethylierung des *hrk*-Gens korrelierte bei den oben genannten Untersuchungen an primären ZNS-Lymphomen mit einem kürzeren Rezidiv-freien Intervall.¹³⁹ In Untersuchungen bei Patienten mit Diffus-großzelligem B-Zell-Lymphom gehörte *hrk* zu den apoptoserelevanten Genen, deren verringerte Transkription mit einer deutlich geringeren 4-Jahres-Überlebensrate einher ging.¹⁴⁷ Folglich sind Proteine der Bcl-2-

Familie und insbesondere auch Hrk ein vielversprechender Angriffspunkt neuer Tumortheraeutika.

3.3.6 An der Bcl-2-Proteinfamilie angreifende spezifische Therapien

Die Proteine der Bcl-2-Familie nehmen eine zentrale Rolle in der Initiation von Apoptose ein. Die Fehlregulierung der Expression dieser Proteine stellt einen wichtigen Baustein bei der Tumorigenese dar und verschlechtert die Prognose des Patienten. Deshalb ist anzunehmen, dass die Therapie von Neoplasien, bei der eine solche Fehlregulierung der Expression durch spezifische Pharmaka ausgeglichen wird, durch die Induktion von Apoptose in neoplastischen Zellen zur Tumorregression führt. Die Forschung zu derartigen Pharmakotherapeutika hat bereits Substanzen hervorgebracht, die sich in verschiedenen Phasen der Entwicklung und Prüfung befinden.

Das Pharmakon ABT-737 oder in der oral applizierbaren Form ABT-263 (Navitoclax) ist mittels eines Kernspinresonanzspektroskopie-basierten Screenings und struktureller Anpassung entwickelt worden und bindet spezifisch an die hydrophobe Furche der Proteine Bcl-2, Bcl-x_L, und Bcl-w, jedoch nicht Mcl-1 oder A1.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ Der zytotoxische Effekt von ABT-737 ist abhängig von der Expression der Multidomänenproteine Bax und Bak. In Zellmodellen verschiedener Leukämien und Lymphome sowie in Tiermodellen häufig mit schlechter Prognose assoziierter Neoplasien wie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms verursacht das Pharmakon eine Tumorregression bzw. Zytoreduktion.^{148, 151} Auf Grund der fehlenden Inhibition von Mcl-1 und A1 wird der zytotoxische Effekt von ABT-737 durch *mcl-1*-RNAi gebahnt.¹⁴⁹ Dies erklärt die Beobachtung, dass eine Kombinationstherapie insbesondere mit Therapeutika, die Bim, Puma oder Noxa als Antagonisten dieser antiapoptotischen Bcl-2-Proteine aktivieren oder induzieren, der Monotherapie mit ABT-737 überlegen ist.¹⁴⁹ Aktuell befindet sich die Entwicklung des Pharmakons ABT-263 in Phase II (Stand: 01.05.2015).

Die Substanz GX 15-070 (Obatoclax) bindet Bcl-2, Bcl-x_L und Bcl-w mit geringerer Affinität als ABT-737.^{152, 153} Vorteilhaft gegenüber ABT-737 ist jedoch die Eigenschaft, Mcl-1 von Bak zu verdrängen.¹⁵³ Obatoclax löst Apoptose über einen Bax-/Bak-vermittelten Signalweg aus, ist jedoch wahrscheinlich kein reines BH3-Mimetikum, da die Zytotoxizität dieser Substanz in doppelt Bax-/Bak-defizienten Zellen ähnlich hoch ist wie in -profizienten Zellen.¹⁵⁰ In Bax-/Bak-defizienten Zellen löst Obatoclax allerdings keine Aktivierung der Caspase 3 aus, sondern scheint einen Autophagie-assoziierten

Zelltod zu induzieren.^{153, 154} Die Entwicklung des Pharmakons befindet sich aktuell in Phase III (Stand: 01.05.2015).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass zwar schon Substanzen mit BH3-mimetischen Effekten gefunden worden sind, aber noch kein derartiges Pharmakon den Einzug in die Klinik geschafft hat. Es bleibt abzuwarten, wann das erste BH3-Mimetikum zur Therapie zugelassen wird, um eine direkte Verbindung zwischen der Grundlagenforschung zu den Bcl-2-Proteinen und der Klinik zu schaffen.

3.4 Fragestellung

Die Expression des Gens *hrk* ist, wie oben beschrieben, in verschiedenen Neoplasien unterdrückt, was die Prognose verschlechtert (s. Kap. 3.3.5). Ein möglicher Ansatz für eine Therapie entsprechender Neoplasien ist die funktionelle Substitution von Hrk durch Pharmaka (s. Kap. 3.3.6). Um entsprechende klinische Studien sinnvoll zu gestalten, muss vorher allerdings eine Reihe von Fragen beantwortet werden.

Zunächst ist hier der Signalweg stromabwärts von Hrk zu untersuchen: Über welche der Multidomänenproteine Bax bzw. Bak führt der von Hrk ausgelöste Signalweg zur Exekution von Apoptose? Die Antwort gäbe einen Hinweis darauf, welche funktionellen Charakteristika BH3-Mimetika in Bezug auf die Interaktion mit Bax und Bak aufweisen müssen, um für eine Substitution der Funktion von Hrk in Frage zu kommen.

Das Protein Hrk geht Protein-Protein-Interaktionen mit den Hauptinhibitoren von Bax ein (s. Kap. 3.3.4). Übereinstimmend damit wurde gezeigt, dass das orthologe murine Protein DP5 einen Bax-abhängigen Zelltod induziert.¹³⁴ Hier soll untersucht werden: Ist diese Eigenschaft auf das humane Protein Hrk übertragbar, läuft also auch der durch Hrk induzierte Apoptosesignalweg Bax-abhängig ab?

Die vorrangigen Inhibitoren des Proteins Bak sind Mcl-1, Bcl-x_L und A1. Zur Interaktion von Hrk mit Mcl-1 und A1 sind von Chen et al. (2005) *in vitro* Untersuchungen durchgeführt worden.⁹⁸ Diese haben eine ähnlich hohe Affinität der BH3-Domäne von Hrk zu Mcl-1 wie zu Bcl-2 gezeigt und eine höhere Affinität zu A1 (s. Abb. 3.4). Darüber hinaus wird Bcl-x_L von Hrk *in vivo* gebunden.⁸¹ Trotz dieser Datenlage hat bisher keine Publikation einen möglichen funktionellen Zusammenhang zwischen Hrk bzw. DP5 und Bak adressiert. Hier soll die Frage beantwortet werden: Kann die durch Hrk induzierte Apoptose Bak-vermittelt ablaufen?

Untersuchungen zur Beziehung zwischen Hrk und den Proteinen Bax und Bak können möglicherweise ebenfalls die Frage klären: Welche Expressionsmuster von Bax und Bak müssen Neoplasien aufweisen, um sensibel gegenüber Hrk substituierenden Pharmaka zu sein? Mögliche Resistenzen sollen aufgedeckt werden, da deren Kenntnis Voraussetzung für die Auswahl geeigneter Probanden bei einer entsprechenden klinischen Studie ist.

Bedeutsam für die Zusammensetzung der Therapie in derartigen Studien ist schließlich, zu analysieren: Welche sind die Hauptfaktoren, die zu einer möglichen Resistenz von Zellen gegenüber Hrk und somit auch gegenüber Hrk substituierenden Pharmaka führen können? Wie könnten derartige Resistenzen aufgehoben werden?

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Gerätetyp	Name	Hersteller
Agarosegel-Imager	Gel Doc 2000	Bio-Rad, München
Agarosegelelektrophorese-System	Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad, München
Analysenwaage	BP 210 S	Sartorius, Göttingen
Blotkammer	Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Durchflusszytometer	FACScan	Becton Dickinson, Heidelberg
Heizblock	QBT2	Grant Instruments, Shepreth, UK
Inkubator	B6	Heraeus, Hanau
Inkubator	Steri-Cult 200	Labotect, Göttingen
Inkubator/Schüttler	Certomat H/R	B. Braun Biotech, Göttingen
Inkubator/Schüttler	3032	GFL, Burgwedel
Magnetrührer	RET basic	IKA, Staufen
Mikroskop	CK-2-TR	Olympus, Hamburg
Mikroskop	IMT-2	Olympus, Hamburg
Mikrotiterplattenphotometer	Spectra	TECAN, Crailsheim
Mikrozentrifuge	5415 C	Eppendorf, Hamburg
Mikrozentrifuge	GMC-160	Daihan Labtech, Kyonggi-Do, Korea
pH-Meter	CG 825	Schott, Mainz
Photometer	DU 640	Beckman, Krefeld
Photometer	GeneQuant II	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Polyacrylamidgelapparatur	Mini-Protean 3	Bio-Rad, München
Präzisionswaage	BP 3100	Sartorius, Göttingen
Schüttler	Mini-Wipptisch WT16	Biometra, Göttingen
Schüttler	Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Schüttler	Polymax 2040	Heidolph, Schwabach

Sequencer	ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
Sicherheitswerkbank	UVF 6.12 S	BDK, Sonnenbühl
Sicherheitswerkbank	LaminAir HB 2448	Heraeus, Hanau
Stromversorgung	Power Pac 300	Bio-Rad, München
Supply-System für Durchflusszytometer	FACSFlow Supply System	Becton Dickinson, Heidelberg
Thermocycler	GeneAmp PCR System 2400	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge	Optima LE-80K	Beckman Coulter, Krefeld
Vortex	Vibrofix VF1	IKA, Staufen im Breisgau
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zentrifuge	Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech, Hanau
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Scientific, Langenselbold

4.1.2 Software

Name/Version	Entwickler
ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Data Collection Software	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
BLAST 2 Sequences (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi ; Datum: 01.08..2014)	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
CellQuest Pro	Becton Dickinson, Heidelberg
EMBOSS Matcher (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_matcher/ ; Datum: 01.08.2014;)	EMBL-European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK
EndNote X5	Thomson Reuters, New York, USA
Inkscape v0.48	Inkscape Community, New York, USA
IrfanView v4.30	Irfan Skiljan, Jajce, Bosnien und Herzegowina

Lilliefors-Test Online (http://in-silico.net/tools/statistics/lillieforst ; Datum: 01.08.2014)	In-silico.net, Hamburg
MacVector v8.0	Accelrys, San Diego, USA
Office Word Professional Plus 2010	Microsoft, Redmond, USA
Prism v5.03	GraphPad Software, La Jolla, USA
Quantity One v4.02	Bio-Rad, München
USCS Genome BLAT (http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start ; Datum: 01.08.2014)	UCSC Center for Biomolecular Science & Engineering, Santa Cruz, USA

4.1.3 Chemikalien und Enzyme

Name	Anbieter
1kb Plus DNA Ladder	Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (40%)	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Bovines Serum-Albumin (10mg/ml)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Cäsiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
3-(Cyclohexylamino) Propan-1- Sulphonsäure (CAPS)	Sigma, Taufkirchen
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablet	Roche Applied Science, Mannheim
Desoxyribotrinukleotide (je 12,5mM)	Invitrogen/Stratagene Molecular, Berlin
DharmaFECT 1 Transfection Reagent	Thermo Scientific, Langenselbold
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Carl Roth, Karlsruhe
Doxyzyklin/Hydrochlorid	Sigma, Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle Medium/ High Glucose (4,5g/l)/L-Glutamin (4mM)	Gibco/Life Technologies, Darmstadt

Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Fetal Calf Serum	Gibco/Life Technologies, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Gel Loading Solution	Sigma, Taufkirchen
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol	J.T.Baker/Avantor, Griesheim
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Taufkirchen
Hexamincobalt(III)chlorid	Sigma, Taufkirchen
Hi-Di-Formamid	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
InviTAQ DNA-Polymerase (5U/μl)	Invitek/Stratec Molecular, Berlin
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid (JC-1)	Molecular Probes/Life Technologies, Darmstadt
Kaliumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Mangan(II)chlorid	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
MgCl ₂ (50mM)	Finnzymes/Thermo Scientific, Langenselbold
NAP-25 Gelchromatographiesäule	Amersham/GE Healthcare, Freiburg
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe

Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
NH ₄ Reaction Buffer (10x)	Invitex/Strattec Molecular, Berlin
Penicillin (10 ⁴ U/ml)/Streptomycin (10 ⁴ µg/ml)	Biochrom, Berlin
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1	Carl Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	Carl Roth, Karlsruhe
PROTRAN Nitrocellulosemembran Transfer Membrane (0,2µm)	Whatman/GE Healthcare, Freiburg
Restriktionsendonukleasen ClaI, EcoRI, PacI, PvuI, XbaI	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Restriktionsendonukleasepuffer 1-4	New England Biolabs, Frankfurt am Main
RNAse A	QIAGEN, Hilden
RPN800E Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker	Amersham/GE Healthcare, Freiburg
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure (37%)	Carl Roth, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka/Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS/Acetat	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS/Hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypsin (0,5%)/EDTA (10x)	Gibco/Life Technologies, Darmstadt
Trypton	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Western Blocking Reagent Solution (10x)	Roche Applied Science, Mannheim

4.1.4 Primer

Name	Sequenz (5'-3')
E1A forward	GAGACATATTATCTGCCACGGAGG

E1A reverse	TTGGCATAGAAACCGGACCCAAGG
E4 forward	GTAGAGTCATAATCGTGCATCAGG
E4 reverse	TTTATATGGTACCGGGAGGTGGTG
<i>hrk</i> forward	AAGGATCCATGTGCCCGTGCCCCCTGCA
<i>hrk</i> reverse	ACTCTAGACTACAAGTTCCGCCTGCCGA
CMV-mini SIN sense forward	ACACCGGGACCGATCCAGCCT
SP6 reverse	ATTTAGGTGACACTATAGAA

4.1.5 Ribonukleinsäuren

Name	Hersteller
ON-TARGETplus Human Mcl-1 siRNA	Thermo Scientific, Langenselbold
ON-TARGETplus Non-targeting Pool	Thermo Scientific, Langenselbold

4.1.6 Plasmidvektoren

Name	Bezug
pAd2-TrePro	Gillissen et al. 2003 ⁹⁴
pAd1- Δ 1 Δ 3+tTA	Gillissen et al. 2003 ⁹⁴

4.1.7 Antikörper

4.1.7.1 Primäre Antikörper

Antigen	Art	Spezies	Verdünnung (v/v)	Anbieter
β -Actin	polyklonal	Kaninchen	1:1000	Sigma, Taufkirchen
Bak	polyklonal	Kaninchen	1:2.000	Sigma, Taufkirchen
Bax	monoklonal	Maus	1:1.000	Trevigen, Gaithersburg, USA
Caspase 3	polyklonal	Ziege	1:1.000	R&D Systems, Wiesbaden
GAPDH	polyklonal	Kaninchen	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Hrk	polyklonal	Ziege	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

4.1.7.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung (v/v)	Anbieter
Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP	1:10.000	Southern Biotech,

Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP	1:10.000	Birmingham, USA Southern Biotech, Birmingham, USA
Rabbit Anti-Goat IgG (H+L)-HRP	1:10.000	Southern Biotech, Birmingham, USA

4.1.8 Kits

Name	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Langenselbold
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
Invisorb Plasmid Max-Kit	Invitek/Stratec Molecular, Berlin
QIAEX II Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Langenselbold

4.1.9 Bakterien

Bakterienstamm (Name)	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> BJ5183	<i>endA sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR (Str^r)</i>
<i>Escherichia coli</i> DH5	F- <i>deoR recA1 endA1 hsdR17(rk⁻, mk⁻) supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>

4.1.10 Humane Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwandten Zelllinien wurden vom Leibnitz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig) oder von B. Vogelstein (Johns Hopkins Cancer Center, Baltimore, USA) bezogen.

Zelllinie	Beschreibung
HCT-116 (Wildtyp)	Brattain et al., 1981 ¹⁵⁵
HCT-116 <i>bax</i> ^{-/-}	Zhang et al., 2000 ¹⁵⁶
HCT-116 <i>bak-KD</i>	Subramanian und Chinnadurai, 2003 ¹⁵⁷ ; Gillissen et al., 2007 ⁵⁷
HCT-116 <i>bax</i> ^{-/-} <i>bak-KD</i>	Subramanian und Chinnadurai, 2003 ¹⁵⁷ ; Gillissen et al., 2007 ⁵⁷

HEK-293

Graham et al., 1977¹⁵⁸

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

1 µg des zu amplifizierenden DNA-Templates wurde, zusammen mit den entsprechenden forward- und reverse-Primern (Endkonzentration je 0,25 µM) und 5 U Taq-Polymerase der Firma Invitek, in 1x entsprechendem Taq-Polymerase-Puffer mit MgCl₂ (Enkonzentration 2,5 mM) und Desoxytrinukleotiden (Endkonzentration je 250 µM) mit einem Gesamtvolumen von 50 µl gelöst.

Die fertigen DNA-Templates wurden im Thermocycler mit folgendem PCR-Programm amplifiziert:

<u>5 min</u>	<u>94 °C</u>	} 35-40 Zyklen
t ₁	94 °C	
t ₂	T _H	
<u>t₃</u>	<u>72 °C</u>	
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

t₁₋₃ und T_H: je nach Eigenschaften von Template und Primern.

Anschließend wurde die amplifizierte DNA aus den Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

4.2.1.2 Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarosegelelektrophorese

Die aufzutrennenden Gemische aus Nukleinsäuren wurden mit Gel Loading Solution der Firma Sigma vermischt. Ein Agarosegel aus TAE-Puffer mit 0,01 g/ml Agarose (1 %) und Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) versetzt, wurde mit den Proben und 1 kb Plus DNA Ladder der Firma Invitek als Größenstandard beladen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung für 30 min bei einer Spannung von 120 V wurde das Agarosegel und die aufgetrennten, mit Ethidiumbromid gefärbten Nukleinsäuren mittels des Agarosegel-Imagers und der Software Quantity One der Firma Bio-Rad analysiert.

TAE-Puffer (1x)

40 mM TRIS/Acetat (pH 8,5)

1 mM EDTA

4.2.1.3 Isolierung von DNA

4.2.1.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

DNA gelöst in einem Volumen bis 200 µl wurde mit 300 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol pH 8,0 (Volumenverhältnis 25/24/1) vermischt. Nach Zentrifugation wurde die obere, DNA enthaltende Phase in 1ml Ethanol/Natriumacetat (Volumenverhältnis 9/1) überführt und die Temperatur des Gemisches auf 0 °C gesenkt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die obere, flüssige Phase entfernt. Die übrig gebliebene DNA wurde anschließend in 20 µl ddH₂O gelöst.

4.2.1.3.2 Isolierung von DNA mittels QIAquick PCR Purification Kit

Das PCR-Produkt wurde nach Herstellerangaben mittels des QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen gereinigt.

4.2.1.3.3 Isolierung von DNA aus einem Agarosegel

Die DNA wurde zunächst mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, dann wurden einzelne Bahnen des Agarosegels mit dem Agarosegel-Imager analysiert. Anschließend wurde nach dem analysierten Verteilungsmuster die die DNA-Segmente von gesuchtem Molekulargewicht enthaltenden Fragmente des Agarosegels abgetrennt. Aus diesen wurde schließlich nach Herstellerangaben mittels des QIAEX II Gel Extraction Kit der Firma Qiagen die gesuchte DNA isoliert.

4.2.1.4 Restriktionsverdau von DNA

Die amplifizierte komplementäre DNA (cDNA) oder Plasmide wurden zunächst mittels der Software MacVector hinsichtlich Restriktionsschnittstellen analysiert. Dann wurde die aufgereinigte und in Aqua dem. gelöste DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (10 U pro 1-2 µg DNA) und je nach Vorgabe des Herstellers mit Bovinem Serum-Antigen (BSA) in der Konzentration 100 µg/ml für 2 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert, wobei der zur Restriktionsendonuklease passende Puffer der Firma New England Biolabs in vorgegebener Konzentration eingesetzt wurde.

Anschließend wurde der Erfolg des Restriktionsverdaus mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

4.2.1.5 Ligation von DNA

Die entsprechenden, zuvor durch Restriktionsverdau bearbeiteten und gereinigten DNA-Segmente wurden mit T4 DNA-Ligase der Firma New England Biolabs (400 U bei einer DNA-Konzentration von 40 μ M) in dazu passendem T4 DNA-Ligase-Puffer der Firma New England Biolabs in vorgegebener Konzentration über Nacht bei 19 °C inkubiert.

Anschließend wurde der Erfolg der Ligation mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

4.2.1.6 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien (Hanahan-Methode)

200ml modifiziertes Luria-Bertani (LB)-Medium (mit 20 mM $MgSO_4$) wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur *E. coli*-Bakterien (DH5 α oder BJ5183) in modifiziertem LB-Medium (mit 20 mM $MgSO_4$) beimpft und bei 37 °C und 200 rpm im Bakterienschüttler inkubiert. Bei einer optischen Dichte OD_{600} von 0,6 bis 0,8 wurde die Kultur auf 0 °C gekühlt und anschließend pelletiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem Frozen Storage Buffer (FSB) resuspendiert, 10 min lang auf Eis gelagert und anschließend erneut pelletiert. Das nun erhaltene Pellet wurde ebenfalls mit eiskaltem FSB resuspendiert. Zuletzt wurden 50 μ l-Aliquots der Bakterien in FSB bei -80 °C gelagert.

Modifiziertes LB-Medium

10 g Trypton	5 g NaCl
5 g Hefeextrakt	2,4 g $MgSO_4$
ad 1 l Aqua dest.; pH 7,0	
autoklaviert	

Frozen Storage Buffer

10 mM K/Acetat	10 mM KCl
45 mM $MnCl_2$	100 mM $[Co(NH_3)_6]Cl_3$
10 mM $CaCl_2$	100 ml/l Glycerol
in Aqua dest.; pH 6,4	
sterilfiltriert	

4.2.1.7 Hitzeschocktransformation kompetenter Bakterien

50 μ l kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit 50 ng DNA zunächst für 30 min auf Eis, danach für 105 s bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz unverzüglich für 4min auf Eis gekühlt, bevor 300 μ l LB-Medium (ohne Antibiotikum) dazugegeben und

das Gemisch für 30 min bei 37 °C inkubiert wurde. Schließlich wurde mit dem Ansatz eine LB-Agar-Platte mit 100 µg/ml Ampicillin beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.2.1.8 Amplifikation von Plasmiden

Zur Amplifikation von Plasmiden wurden DH5α-Zellen mit den kompletten Plasmiden, die ein Ampicillin-Resistenzgen beinhalten, transformiert.

4.2.1.9 Homologe Rekombination von DNA

Zur homologen Rekombination des Shuttlevektors pAd-TrePro_Hrk und des adenoviralen Plasmids pAd1-Δ1Δ3+tTA wurden BJ5183-Zellen mit den linearisierten Plasmiden, deren korrelierende Basensequenzen sich überschneiden (5'-Endsegment von pAd-TrePro_Hrk entspricht 3'-Endsegment von pAd1-Δ1Δ3+tTA und 5'-Endsegment von pAd1-Δ1Δ3+tTA entspricht 3'-Endsegment von pAd-TrePro_Hrk). Nur das linearisierte adenovirale Plasmid enthielt ein Ampicillin-Resistenzgen.

LB-Medium

10 g/l Trypton 5 g/l NaCl
5 g/l Hefeextrakt
in Aqua dest.; pH 7,0
autoklaviert

4.2.1.10 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde UV-spektroskopisch gegen ddAqua in einer Quarzküvette mit dem Photometer GeneQuant II der Firma Pharmacia Biotech ermittelt: $c(\text{DNA}) = E_{260} \cdot 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$

4.2.1.11 Sequenzierung von DNA

1 µg des zu amplifizierenden Plasmids wurde mit den entsprechenden forward- und reverse-Primern nach Herstellerangaben mittels BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits der Firma Applied Biosystems zur Sequenzierung nach Sanger vorbereitet und mit dem Thermocycler Zyklen nach folgendem Schema unterzogen:

<u>10 min</u>	<u>96 °C</u>	} 35 Zyklen
10 s	96 °C	
5 s	50 °C	
<u>4 min</u>	<u>60 °C</u>	
∞	8 °C	

Anschließend wurde das Reaktionsprodukt mit 250 µl Ethanol (100%), 90 µl ddH₂O, 10 µl Natriumacetat (3 M) und 2 µl Dextranblau (50 mg/ml), gelöst in EDTA (25 mM; pH 8,0). Nach 10 min wurde das Gemisch zentrifugiert und das Pellet in 20 µl Hi-Di-Formamid gelöst. Nach Denaturierung der Nukleinsäuren durch Inkubation für 2 min bei 90 °C und sofortiger Kühlung auf Eis für 10 min wurden die Proben mittels des Sequencers ABI PRISM 310 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems und der Software MacVector hinsichtlich der Basensequenz analysiert.

4.2.1.12 Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkolonien

4.2.1.12.1 Minipräparation mittels alkalischer Lyse und Phenol-Chloroform-Extraktion

2 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37 °C und 200 rpm wurden pelletiert und mit 100 µl GTER-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Lysepuffer zur Zelllyse und Denaturierung chromosomaler DNA für 5 min bei Raumtemperatur (RT) wurde die chromosomale DNA mit 100 µl Natriumacetat (3 M; pH 5,2) renaturiert, wodurch sie ausfiel. Nach weiteren 5 min bei RT wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt.

GTER-Puffer

50 mM Glucose	10 mM EDTA
25 mM TRIS/Acetat	100 µg/ml RNase A

Lysepuffer

200 mM NaOH	1 % (m/v) Sodiumdodecylsulfat (SDS)
-------------	-------------------------------------

4.2.1.12.2 Maxipräparation

Aus einer 200 ml-Übernachtskultur in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37° C und 200 rpm wurden die Plasmide mittels des Invisorb Plasmid Max-Kit der Firma Invitex isoliert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration bestimmt.

4.2.1.13 Amplifikation, Isolierung und Analyse von Adenoviren

4.2.1.13.1 Amplifikation von Adenoviren

HEK-293-Zellen wurden in 12 Tripel-175 cm²-Kulturflaschen kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70 % wurde ein zuvor gewonnenes Crude Virus Lysate (CVL) auf die Zellkulturen verteilt sowie Doxyzyklin (Endkonzentration: 1 µg/ml) dazugegeben, um zu verhindern, dass das proapoptotische Gen Apoptose auslöst. Als sich bei 90 % der

Zellen zytopathische Effekte zeigten, wurden die Zellen abgeklopft und bei 2000 rpm und 4 °C pelletiert. Das Zellreste und Viren enthaltende Pellet wurde in PBS resuspendiert und anschließend mehrfach auf Trockeneis eingefroren und wieder aufgetaut, wobei nach jedem Auftauvorgang gevortext wurde. So wurden die Viren in den Überstand überführt.

4.2.1.13.2 Isolierung von Viren mittels CsCl-Dichtegradienten

Um die Viren von Proteinen und anderen Zellresten zu isolieren, wurde der Überstand mit einem CsCl-Dichtegradienten ultrazentrifugiert. Dazu wurden je 2 ml CsCl ($1,25 \text{ g/cm}^3$) in 2 Ultra-Clear Zentrifugentubes der Firma Beckman mit je 2 ml CsCl ($1,35 \text{ g/cm}^3$) und danach mit je 1 ml CsCl ($1,5 \text{ g/cm}^3$) unterschichtet. Nach Überschichtung mit je 6 ml des Virusüberstandes wurden die Tubes für 2 h bei 30.000 rpm und 21,0 °C in der Zentrifuge Optima LE-80K der Firma Beckman Coulter ultrazentrifugiert. Zu den durch Anstechen der Tubes und selektive Entnahme mittels einer Kanüle und 1 ml-Spritze der Firma B. Braun gewonnenen Virusbanden wurde CsCl ($1,35 \text{ g/cm}^3$) ad 3 ml hinzugefügt und das Gemisch erneut in ein Ultra-Clear Zentrifugentube der Firma Beckman gegeben, wo es mit 3 ml CsCl ($1,5 \text{ g/cm}^3$) vermischt und anschließend mit 2 ml CsCl ($1,25 \text{ g/cm}^3$) überschichtet wurde.

Nach 20 h Ultrazentrifugation bei 30.000 rpm und 21,0 °C wurde erneut durch Anstechen des Tubes mit einer Kanüle und 1 ml-Spritze selektiv die Virusbande entnommen.

4.2.1.13.3 Reinigung von Viren mittels Gelchromatographie

Um das Virus von CsCl zu befreien, wurde die Methode der Gelchromatographie angewandt. Dazu wurde eine NAP25-Säule der Firma Amersham zunächst mit 15 ml Adenosuspensionspuffer äquilibriert und anschließend die entnommene Virus/CsCl-Probe auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde nun mit 1,5 ml Adenosuspensionspuffer gewaschen und das im Anschluss daran eluierte Volumen von 2 ml aufgefangen, das nun das gereinigte Virus in Adenosuspensionspuffer enthielt. Aliquots von je 50 µl wurden unverzüglich bei -80 °C gelagert.

Adenosuspensionspuffer

135 mM NaCl	10 mM TRIS/HCl
3 mM KCl	10 % (v/v) Glycerol
1 mM MgCl ₂	

in Aqua dest.
sterilfiltriert

4.2.1.13.4 Test der Viren auf Replikationskompetenz

Bei der Arbeit mit humanpathogenen, jedoch replikationsdefizienten Viren musste gewährleistet sein, dass diese nicht durch eine Rekombination mit Teilen des Wirtsgenoms während der Amplifikation in HEK-293-Zellen die Fähigkeit zur Replikation erlangt hatten.

Um die virale DNA analysieren zu können, wurden die viralen Proteine inklusive Virushülle zunächst durch Inkubation von 10 µl Viruslösung mit 35 µl Proteinase K-Lösung für 90 min bei 55 °C proteolysiert und im Anschluss daran per Phenol-Chloroform-Extraktion die DNA isoliert.

Danach wurde die virale DNA mittels PCR mit geeigneten Primern auf Defizienz der für die virale Replikation nötigen Region E1A geprüft. Neben der E1A-Region wurde die E4-Region des viralen Genoms als interne Positivkontrolle mit geeigneten Primern untersucht. Außerdem wurden neben der viralen DNA das Ausgangsplasmid als sowohl die Sequenz der E1A- als die der E4-Region beinhaltende externe Positivkontrolle und ddH₂O als externe Negativkontrolle genutzt.

Proteinase K-Lösung

43 µM EDTA	170 mM TRIS
1,7 % (m/v) SDS	8,9 g/l Proteinase K
in ddH ₂ O	

PCR-Ansatz

2 µl PCR-Puffer (10x)	0,2 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
1,2 µl MgCl ₂ (50 mM)	0,8 µl virale DNA/Ausgangsplasmid/H ₂ O
0,4 µl Desoxytrinukleotide (je 12,5 mM)	15,2 µl ddH ₂ O

Für E1A-Nachweis: Je 0,1 µl E1A-forward/-reverse Primer (50 µM)

Für E4-Nachweis: Je 0,1 µl E4-forward/-reverse Primer (50 µM)

PCR-Programm

<u>5 min</u>	<u>94 °C</u>	} 35 Zyklen
30 s	94 °C	
30 s	58 °C	
<u>30 s</u>	<u>72 °C</u>	

7 min 72 °C

∞ 4 °C

Schließlich wurden die PCR-Produkte mittels einer Agarosegelelektrophorese analysiert.

4.2.2 Zellbiologische Methoden

4.2.2.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden in Kulturflaschen mit Ventildeckel in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/High Glucose (4,5 g/l)/L-Glutamin (4 mM)-Medium, komplementiert mit 10 % inaktiviertem Fetal Calf Serum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, im Brutschrank bei 37 °C und einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden sie mit Phosphate-Buffered Saline 0,9 % (PBS) gewaschen und anschließend mit 10 ml Trypsin (0,5 g/l)/EDTA in PBS für 5-10 min bei 37 °C behandelt.

Bei allen Experimenten wurden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase eingesetzt.

PBS

136 mM NaCl

10,1 mM Na₂HPO₄

2,7 mM KCl

1,8 mM KH₂PO₄

in Aqua dest.; pH 7,4

autoklaviert

4.2.2.2 Einfrieren humaner Zellen

Die Zellen wurden für 5 min bei 4 °C pelletiert, mit PBS gewaschen und das nun erhaltene Pellet in DMEM/High Glucose (4,5 g/l)/L-Glutamin (4 mM)-Medium ohne weitere Zusätze (1 ml/1x10⁷ Zellen) resuspendiert und auf Einfrierröhrchen verteilt (500 µl/Röhrchen). Anschließend wurde auf die Suspensionen langsam Einfriermedium im Volumenverhältnis 1:1 gegeben und die verschlossenen Einfrierröhrchen dann zunächst für 2 h bei -20 °C, im Anschluss daran für 2 d bei -80 °C und danach in Flüssigstickstoff gelagert.

Einfriermedium

80 % (v/v) FCS

20 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)

4.2.2.3 Auftauen humaner Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden aus dem Einfrierröhrchen in ein konisches Röhrchen überführt, langsam mit Kulturmedium (37 °C; 10 ml/Einfrierröhrchen) vermischt, bei 1.400 rpm für 5 min pelletiert, mit Kulturmedium gewaschen und erneut pelletiert. Das nun ebenfalls in Kulturmedium resuspendierte Pellet wurde in eine Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank kultiviert.

4.2.2.4 Gentransfer in humane Zellen

4.2.2.4.1 Calciumphosphat-Transfektion mit viraler DNA und Gewinnung des Crude Virus Lysate

Zur Transfektion von HEK-Zellen mit der linearisierten viralen DNA, um mit Hilfe dieser Verpackungszelllinie die Assemblierung von Viren zu ermöglichen, wurde die Methode der $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitation gewählt. Hierbei bilden sich Präzipitate von Calcium, Phosphat und DNA, die von den Zellen phagozytiert werden. Ein Teil der phagozytierten DNA gelangt dann aus dem Phagosom in den Nukleus, wo die DNA transkribiert wird.

Das virale Plasmid pAd1- $\Delta 1\Delta 3$ +tTA-TrePro_Hrk wurde mittels Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease PacI linearisiert und somit die für die bakterielle Replikation notwendigen Sequenzen entfernt. Anschließend wurden 10 μg der linearisierten viralen DNA mit 25 μl sterilen CaCl_2 (2,5 M) vermischt und mit ddH₂O auf 250 μl aufgefüllt. Dann wurden 250 μl Transformationspuffer langsam dazu gegeben und die Suspension für 30 min bei RT stehen gelassen, damit sich die Präzipitate bilden konnten. Zu zuvor in 6-Loch-Platten kultivierten HEK-293-Zellen wurden bei 70 % Konfluenz 50 μl , 75 μl , 100 μl , 125 μl bzw. 150 μl der Präzipitat-Suspension gegeben, eine Kultur wurde als Negativkontrolle benutzt.

Die Zellen wurden nun im Brutschrank inkubiert und nach 24 h das Medium ausgetauscht sowie Doxyzyklin (Endkonzentration je 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dazugegeben, um einen möglichen Einfluss des Genprodukts Hrk auf die Virusamplifikation auszuschalten.

Sobald sich lichtmikroskopisch zytopathische Effekte zeigten, wurde der Teil der jeweiligen Kultur vorsichtig in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei -20 °C eingefroren. Mit dem nach erneutem Auftauen und Vortexen erhaltenen CVL wurden nun HEK-293-Zellen in einer 75 cm^2 -Kulturflasche bei 70 % Konfluenz transfiziert, außerdem wurde Doxyzyklin (Endkonzentration 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dazugegeben, wiederum um

einen möglichen Einfluss des Genprodukts Hrk auf die Virusamplifikation auszuschalten. Als sich bei 90 % der Zellen zytopathische Effekte zeigten, wurden die Zellen abgeklopft und die gesamte Suspension bei -20 °C eingefroren. Das nach Auftauen und Vortexen entstandene neue CVL wurde nun für die weitere Virusamplifikation benutzt.

Transformationspuffer

275 mM NaCl	3 mM Na ₂ HPO ₄
1 mM KCl	40 mM HEPES

in ddH₂O; pH 6,75
sterilfiltriert

4.2.2.4.2 Transfektion humaner Zellkulturen mit Adenoviren

Zu den Zellen wurde bei 70 % Konfluenz zunächst DMEM/High Glucose (4,5 g/l)/L-Glutamin (4 mM)-Medium (ohne weitere Zusätze) und Ad-Hrk in Adenosuspensionspuffer je nach gewünschter viraler Konzentration (Multiplicity of infection; MOI) gegeben, bei den Mediumkontrollen ($\frac{1}{3}$ der Zellkulturen) wurde das Virus weggelassen. Nach 90 min Inkubation im Brutschrank wurde die gleiche Menge an DMEM/High Glucose (4,5 g/l)/L-Glutamin (4 mM)-Medium, komplementiert mit 20 % inaktiviertem Fetal Calf Serum (FCS), 200 U/ml Penicillin und 200 µg/ml Streptomycin, dazugegeben. Außerdem wurde bei den Vektorkontrollen ($\frac{1}{2}$ der mit Virus transfizierten Kulturen) Doxyzyklin zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugefügt. Die Zellen wurden dann weiter im Brutschrank inkubiert.

4.2.2.5 Bestimmung der Konzentration von Viren (PFU)

HEK-293-Zellen, 5×10^4 Zellen/Well auf einer 24-Loch-Platte ausplattiert, wurden nach 24h Kultivierung im Brutschrank mit dem gereinigten Ad-Hrk in DMEM/High Glucose (4,5 g/l)/L-Glutamin (4 mM)-Medium ohne weitere Zusätze transfiziert. Dabei wurden die Kulturen der Platte n von 1 bis 24 nummeriert und zur Transfektion jeder Kultur eine Virusmenge von 2^{1-n} µl verwandt wurde. Nach 90 min wurde die gleiche Menge an DMEM/High Glucose (4,5 g/l)/L-Glutamin (4 mM)-Medium, komplementiert mit 20 % inaktiviertem Fetal Calf Serum (FCS), 200 U/ml Penicillin und 200 µg/ml Streptomycin, sowie Doxyzyklin mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml dazugegeben.

Nun wurden die Zellen nach 2-14 d nach Transfektion lichtmikroskopisch auf zytopathisches Aussehen (Plauebildung) analysiert und die Konzentration der Viren c

Mikrotiterplatte 2 µl Proteinextrakt mit 200 µl BCA-Lösung für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die Extinktion bei $\lambda = 620$ nm gemessen. Als Standard diente eine BSA-Konzentrationsreihe.

4.2.3.3 Western Blot-Analyse

4.2.3.3.1 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Zur Detektion von Proteinen mittels Western Blot müssen diese zunächst aufgetrennt werden. Bei der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteinproben auf Grund des Disulfidbrücken-reduzierenden Dithiothreitol und des negativ geladenen, an die aliphatischen Aminosäurereste bindenden SDS ausschließlich ihrem unterschiedlichen Molekulargewicht nach aufgetrennt. Die im Vergleich langsamere Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen mit höherem Molekulargewicht resultiert aus der Gelmatrix, die aus durch Bisacrylamid vernetzten Acrylamid-Polymeren besteht.

Nach Laemmli wurde zur SDS-PAGE ein diskontinuierliches System aus Trenn- und Sammelgel mit unterschiedlichem pH-Wert sowie Acrylamidkonzentration und Pufferzusammensetzung genutzt, um die Trennschärfe zu maximieren. Mit der Polyacrylamidgelapparatur Mini-Protean 3 der Firma Bio-Rad wurden 0,75 cm breiten Sammelgelen und ca. 5,5 cm breiten 16 %igen Trenngelen gegossen, die anschließend in die Vertikallaufkammer eingespannt wurden.

Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und nach Füllung der Laufkammer mit Laufpuffer neben den RPN800E Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker der Firma Amersham aufgetragen (25 µg Protein/Tasche).

Die Auftrennung erfolgte für 10 min bei einer Spannung von 120 V und für ca. 60 min bei 180 V.

Sammelgel (5 %)

0,25 ml Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (40 %)	20 µl SDS (10 %)
0,25 ml TRIS/HCl (0,5 M; pH 6,8)	20 µl APS (10 %)
1,46 ml Aqua dem.	2 µl TEMED

Trenngel (16 %)

2 ml Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (40 %)	50 µl SDS (10 %)
1,25 ml TRIS/HCl (1,5 M; pH 8,8)	50 µl APS (10 %)
1,65 ml Aqua dem.	4 µl TEMED

Probenpuffer (5 x)

260 mM TRIS/HCl (pH 6,8)	0,004 % (v/v) Bromphenolblau
400 mM Dithiothreitol	2 % (v/v) SDS
40 % (v/v) Glycerin	
in Aqua dest.	

Laufpuffer

25 mM TRIS	0,1 % (v/v) SDS
200 mM Glycin	
in Aqua dest.; pH 8,3	

4.2.3.3.2 Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran

Als eine geeignete, immobilisierende Matrix für die Immundetektion wurden im Anschluss an die SDS-PAGE die Gele in die Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell-Blotkammer der Firma Bio-Rad ebenfalls mittels eines elektrischen Feldes senkrecht zur vorherigen Laufrichtung auf eine 0,2 µm-Nitrocellulosemembran überführt. Der Proteintransfer wurde nach Äquilibration mit Blotpuffer für 1 h bei einem Stromfluss von 60 mA durchgeführt. Anschließend wurde der Transfer durch reversible Proteinfärbung mit Ponceau S-Färbelösung kontrolliert.

Blotpuffer

10 mM CAPS (pH 11)	15 % (v/v) Methanol
--------------------	---------------------

Ponceau S-Färbelösung

5 % (v/v) Essigsäure	0,1 % (m/v) Ponceau S
----------------------	-----------------------

4.2.3.3.3 Immundetektion von Proteinen

Unspezifische Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran wurden anschließend für 1 h in Blockpuffer bei RT abgesättigt, um unspezifische Signale durch nachträgliche Bindung unerwünschter Substanzen zu vermeiden. Danach wurde die Membran auf einem Schüttler über Nacht bei 4 °C mit einer primären Antikörperlösung je nach Angaben des Herstellers des Antikörpers inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde anschließend durch dreimaliges Waschen auf einem Schüttler für 5 min in PBST-Lösung entfernt. Zur Detektion des nun spezifisch an das untersuchte Protein gebundenen Antikörpers wurde ein gegen die Schwereketten der entsprechenden Spezies gerichteter sekundärer Antikörper eingesetzt, der mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert ist. Nach Inkubation mit sekundärer Antikörperlösung auf einem Schüttler für

1,5 h bei RT und erneutem dreimaligem Waschen auf einem Schüttler für 5 min in PBST zur Entfernung überschüssigen Antikörpers wurde für ca. 3 min mittels Zugabe von Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate der Firma Thermo Scientific nach Herstellerangaben eine Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Reaktion durchgeführt, bei der unter Anwesenheit von H_2O_2 eine durch HRP katalysierte Oxidation von Luminol stattfindet. Oxidiertes Luminol emittiert Photonen, die mit einem Chemilumineszenzfilm detektiert wurden.

PBST

0,5 % (v/v) Tween 20

in PBS

Blockpuffer

10 % (v/v) Western Blocking Reagent Solution

in PBST

Primäre Antikörperlösung

Primärer Antikörper in Verdünnung nach Herstellerangaben

ad 10 ml Blockpuffer

Sekundäre Antikörperlösung

0,01 % (v/v) Sekundärer Antikörper

ad 10 ml PBST

4.2.4 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen in einem laminaren Flüssigkeitsstrom auf Einzelzellniveau in einer Pufferflüssigkeit an einem Laserstrahl (Argon-Laser; $\lambda = 488 \text{ nm}$) vorbeigeleitet. Detektoren messen das Vorwärts- (Forward scatter) bzw. Seitwärtsstreulicht (Sideward scatter), die Indikatoren für die Zellgröße bzw. -granularität sind. Außerdem werden durch den Laserstrahl bei entsprechend vorbehandelten Zellen Fluoreszenzfarbstoffe angeregt, deren emittierte Strahlung charakteristischer Wellenlänge durch 3 verschiedene Detektoren (FL-1: $\lambda = 537 \text{ nm}$; FL-2: $\lambda = 597 \text{ nm}$; FL-3: $\lambda = 650 \text{ nm}$) quantitativ ermittelt wird und proportional zur gebundenen Fluorochrommenge ist.

Zur Auswertung werden die Messdaten mittels der Software CellQuest Pro analysiert.

4.2.4.1 Bestimmung des DNA-Gehaltes von Zellen

Zur durchflusszytometrischen Messung des DNA-Gehaltes von Zellen wurde die Methode der Propidiumiodid (PI)-Interkalation gewählt. Jedes Experiment wurde vorher parallel in dreifacher Ausführung vorbereitet und durchgeführt. Nach Fixierung der Zellen, Permeabilisierung der Plasma- und Kernmembran und Verdau ebenfalls mit PI interagierender RNA wird hierbei PI zu den Zellen gegeben, das sequenzunabhängig in die DNA interkaliert. Dieses besitzt fluoreszierende Eigenschaften und dessen Fluoreszenzemissionsmaximum verschiebt sich nach Interkalation in DNA zu einer Wellenlänge von $\lambda = 617 \text{ nm}$, wodurch eine durchflusszytometrische Messung des relativen DNA-Gehaltes von Zellen ermöglicht wird.

Das Medium der zu untersuchenden Zellkulturen und je 1 ml PBS nach Waschvorgang wurden in für jede Zellkultur separate konische Röhren überführt und auf Eis gelagert. Nach Ablösung der Zellen mit je 1ml Trypsin (0,5 g/l)/EDTA in PBS für 5 min bei 37 °C wurde die Zellsuspension ebenfalls in die entsprechenden Röhren überführt und auf Eis gelagert. Die Zellen und Zellreste wurden für 5 min bei 1.400 rpm und 4 °C pelletiert, die Pellets zur Fixierung in je 200 µl Formaldehyd-Lösung resuspendiert, auf eine Mikrotiterplatte überführt und für 30 min wieder auf Eis gelagert. Nach erneuter Pelletierung unter den gleichen Bedingungen wurden die Pellets mit je 50 µl PBS resuspendiert und 100 µl Ethanol (100 %) dazugegeben, um die Plasma- und Kernmembran zu permeabilisieren. Im Anschluss an 15 min auf Eis und erneute Pelletierung unter den gleichen Bedingungen wurden die Pellets zum Verdau der RNA mit je 50 µl RNase A-Lösung resuspendiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneuter Pelletierung unter den gleichen Bedingungen wurden die Pellets nun mit je 200 µl PI-Lösung resuspendiert, in Durchflusszytometrieröhren überführt und bis zur durchflusszytometrischen Messung bei 4 °C gelagert.

Die durchflusszytometrische Messung erfolgte unter Nutzung des FL-2-Kanals.

Formaldehyd-Lösung

5 % (v/v) Formaldehyd

in PBS

RNase A-Lösung

40 µg/ml RNase A

in PBS

PI-Lösung

50 µg/ml Propidiumiodid

in PBS

4.2.4.2 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials von Zellen

Zur durchflusszytometrischen Messung des mitochondrialen Membranpotentials von Zellen wurde die Methode des JC-1-Assays gewählt. 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid (JC-1) ist ein membranpermeierender kationischer Farbstoff, der in Zellen mit physiologischem mitochondrialem Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) in den Mitochondrien akkumuliert und dort J-Aggregate ausbildet. Bei Zellen mit zusammengebrochenem $\Delta\Psi_m$ dagegen verbleibt JC-1 im Zytosol, wo es als Monomer vorliegt.

Sowohl in monomerer als auch in aggregierter Form hat JC-1 fluoreszierende Eigenschaften, jedoch liegt bei der monomeren Form in Zellen mit zusammengebrochenem $\Delta\Psi_m$ das Fluoreszenzemissionsmaximum bei $\lambda = 529$ nm anstatt bei $\lambda = 590$ nm wie bei der aggregierten Form in Zellen mit physiologischem $\Delta\Psi_m$. Daher kann mittels durchflusszytometrischer Messung zwischen verschiedenen Zuständen des $\Delta\Psi_m$ unterschieden werden.

Jedes Experiment wurde vorher parallel in dreifacher Ausführung vorbereitet und durchgeführt. Zu den zu untersuchenden Zellkulturen wurde zunächst JC-1-Lösung (Endkonzentration von JC-1: 2 $\mu\text{g/ml}$) gegeben und die Zellen für 30 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden das abgenommene Medium und je 1 ml PBS nach Waschen in für jede Zellkultur separate konische Röhrrchen überführt, auf Eis gelagert und die Zellkulturen mit je 1 ml Trypsin (0,5 g/l)/EDTA in PBS für 5 min bei 37 °C behandelt. Nach Ablösung der Zellen wurde die Zellsuspension ebenfalls in die entsprechenden Röhrrchen überführt, woraufhin die Proben für 5 min bei 1.400 rpm und 4 °C pelletiert wurden. Die Pellets wurde mit je 1,5 ml PBS resuspendiert und erneut unter den gleichen Bedingungen pelletiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt, bevor die Pellets zuletzt in 200 μl PBS resuspendiert wurden.

Nun erfolgte unverzüglich die durchflusszytometrische Messung unter Nutzung der FL-1- und FL-2-Kanäle, wobei zur Minimierung des Störsignals der zytosolischen JC-1-Monomere FL-2 gegen FL-1 kompensiert wurde.

JC-1-Lösung

1 % (v/v) JC-1 (2 mg/ml) in DMSO

in DMEM/High Glucose (4,5 g/l)/L-Glutamin (4 mM)-Medium

4.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte nach den Richtlinien gemäß Herkner und Müller, 2011¹⁵⁹ in allen Fällen mittels Mann-Whitney U-Test mit der Software Prism v5.03 sowie Lilliefors-Test Online.

5 Ergebnisse

5.1 Herstellung des rekombinanten Adenovirus Ad-Hrk

Um die Schritte der Apoptoseinitiation stromabwärts des Proteins Hrk zu analysieren, sollte Hrk in Zellen ektop exprimiert werden. Zur regulierbaren Expression eines c-Myc-getagten Hrk wurde ein adenoviraler Vektor konstruiert.

Zur Generierung des rekombinanten adenoviralen Genoms wurde der ORF von *hrk* zunächst in ein Shuttle-Plasmid kloniert. Im Anschluss daran wurde dieser durch homologe Rekombination in ein Plasmid mit rekombinantem adenoviralem Genom und einem regulierbaren Transkriptionsaktivierungssystem transferiert. Mittels Regulierbarkeit der Transkription sollte der gleiche Vektor bei inaktiver Transkription als Vektorkontrolle genutzt werden.

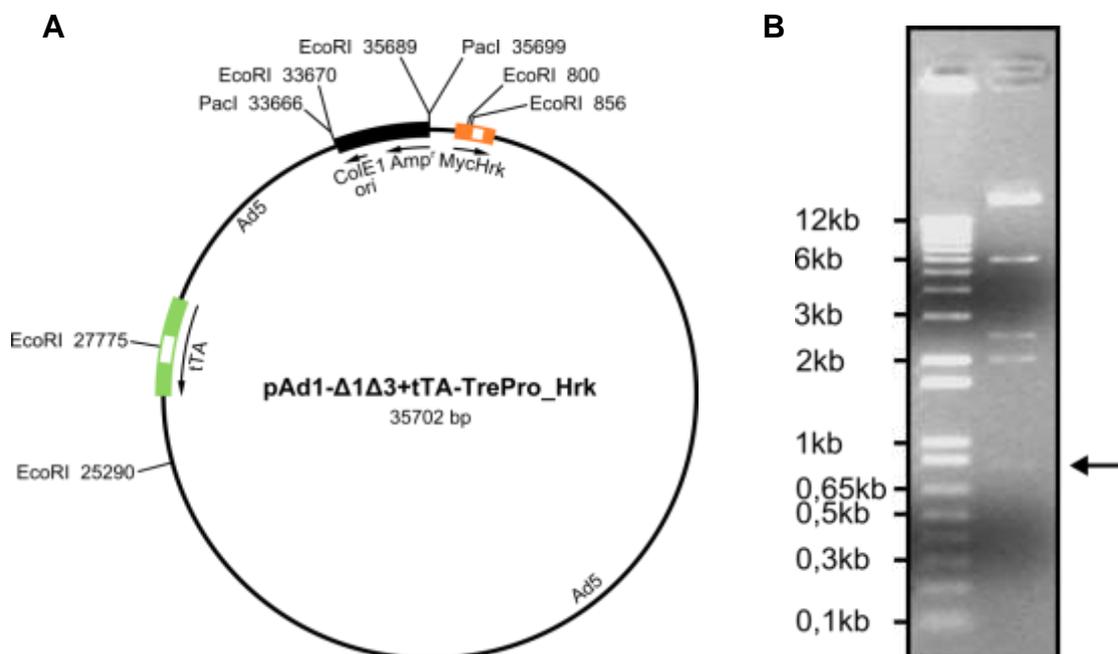


Abb. 5.1: Restriktionsfragmentanalyse zur Verifizierung des Vektorkonstrukts pAd1-Δ1Δ3+tTA-TrePro_Hrk. **A:** Plasmidkarte von pAd1-Δ1Δ3+tTA-TrePro_Hrk mit Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* und *PacI*. **B:** Agarosegelelektrophorese des Restriktionsverdaus mit *EcoRI*. Links: Größenstandard (1 kb Plus DNA Ladder); rechts: pAd1-Δ1Δ3+tTA-TrePro_Hrk nach Restriktionsverdaus mit *EcoRI*. Nach korrekter Rekombination und Verdaus entstehen Fragmente folgender Größe: 24,4 kb; 5,9 kb; 2,5 kb; 2,0 kb; 813 bp und 56 bp. Das 813 bp große Fragment (Pfeil) tritt nur nach Rekombination auf. Das kürzeste Fragment (56 bp) ist nicht sichtbar.

Herstellung des Shuttle-Plasmids

Zunächst wurde die *hrk*-cDNA, freundlicherweise bereitgestellt von Andreas Villunger, mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden über die Primer am 5'-Ende und am 3'-Ende Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI bzw. *Xba*I eingefügt. Die amplifizierte und mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaute DNA wurde dann in das zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaute Shuttle-Plasmid pAd2-TrePro ligiert, sodass sich in 5'-Richtung des c-Myc-Tags der aus einem Tetracycline-responsive element (TRE) und einem minimalen Cytomegalievirus (CMV)-Promotor bestehende regulierbare Promotor P_{hCMV*} befindet. In 3'-Richtung des *hrk*-ORF befindet sich ein Bovine growth hormone (BGH)-Polyadenylierungssignal. Diese *hrk*-Expressionskassette wird flankiert von adenoviralen Sequenzen, die später für die homologe Rekombination benötigt werden. Restriktionsverdaus und Sequenzierung des Plasmids zeigten die korrekte Amplifikation der cDNA und die korrekte Klonierung des *hrk*-ORF in das Shuttle-Plasmid (Daten nicht gezeigt).

Herstellung des rekombinanten adenoviralen Genoms mittels homologer Rekombination

Zur Herstellung des Plasmids, welches das rekombinante adenovirale Genom enthält, wurde die Fähigkeit des *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stammes BJ5183 zur homologen Rekombination genutzt. Dazu wurde zunächst mittels Restriktionsendonukleasen das das adenovirale Genom enthaltende Plasmid (pAd1- Δ 1 Δ 3+tTA) linearisiert und die von adenoviralen Sequenzen flankierte Expressionskassette aus dem Shuttle-Plasmid (pAd2-TrePro_Hrk) ausgeschnitten. Anschließend wurden *E. coli* mit beiden kotransformiert. In *E. coli* erfolgt durch homologe Rekombination die Integration der Expressionskassette in das Plasmid pAd1- Δ 1 Δ 3+tTA. Dadurch geschieht gleichzeitig ein Ringschluss des Plasmids, was dem Bakterienstamm eine Ampicillin-Resistenz verleiht. Überprüft wurde das aufgereinigte Plasmid mittels eines Restriktionsverdaus. Die Auftrennung nach Restriktionsverdau mit *Eco*RI zeigt Fragmente der Größen 24,4 kb; 5,9 kb; 2,5 kb und 2,0 kb und das spezifische Fragment der Größe 813 bp (s. Abb. 5.1). Somit ist die homologe Rekombination erfolgt.

Das rekombinante adenovirale Genom des entstandenen Plasmids pAd1- Δ 1 Δ 3+tTA-TrePro_Hrk ist in der E1- und E3-Region deletiert. Durch die Deletion der E1-Region ist das resultierende Virus replikationsdefizient und so humanapathogen. An Stelle dieser beinhaltet das Plasmid die Expressionskassette für Hrk und an Stelle der für die

Funktion des Adenovirus als Vektor entbehren E3-Region das Gen für das Tetrazyklin-kontrollierte Transaktivatorprotein (tTA) unter Kontrolle eines konstitutiven CMV-Promotors und eines SV40-Polyadenylierungssignals.

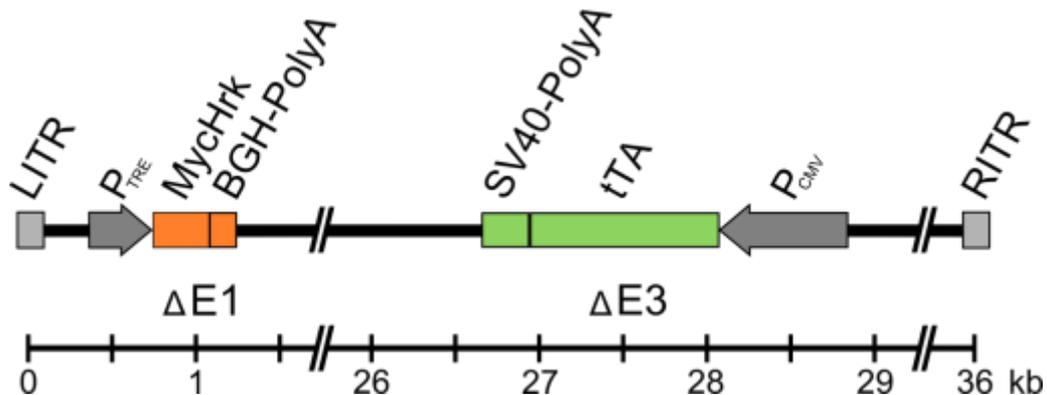


Abb. 5.2: Schema des rekombinanten viralen Genomes (Ad-Hrk). Die adenoviralen Genregionen E1 und E3 sind substituiert durch die Expressionskassette für Hrk und diejenige für tTA. LITR: Left inverted terminal repeat; P_{TRE}: minimaler CMV-Promotor mit Bindungsmotiv für Transaktivator; BGH-PolyA: Bovine growth hormone-Polyadenylierungssignal; SV40-PolyA: Simian virus 40-Polyadenylierungssignal; tTA: Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator; P_{CMV}: CMV-Promotor; RITR: Right inverted terminal repeat.

Herstellung des Adenovirus Ad-Hrk

Zunächst wurde mittels eines Restriktionsverdau das rekombinante virale Genom, dessen Aufbau in Abb. 5.2 dargestellt ist, aus dem Plasmid pAd1-Δ1Δ3+tTA-TrePro_Hrk mittels *PacI* (s. Abb. 5.1) ausgeschnitten. Anschließend wurden mit der DNA mittels $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitation HEK-293-Zellkulturen transfiziert. Diese Verpackungszelllinie beinhaltet die adenovirale E1-Genregion, welche die virale Replikation E1-defizienter Adenoviren ermöglicht.¹⁵⁸

Bei der Amplifikation der Viren kann es zu einer homologen Rekombination mit der ins zelluläre Genom integrierten E1A-Region kommen, was zu E1A-positiven und dadurch replikationsfähigen Viren führt. Deshalb wurde das Virus nach der Gewinnung und Aufreinigung bezüglich einer solchen homologen Rekombination überprüft. Dazu wurde die virale DNA isoliert und eine PCR durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde ein E1A- und E4-positives Plasmid verwandt, als Negativkontrolle destilliertes Wasser. Dabei wurde mit entsprechenden Primern ein Abschnitt der E4-Region sowohl in der Positivkontrolle als auch in der aus Ad-Hrk isolierten DNA nachgewiesen (s. Abb. 5.3). Das zeigt, dass die DNA-Isolierung aus dem Virus funktioniert hat. Die PCR für das

Kontrollplasmid ist auch positiv für die E1A-Region, was die Funktionalität der PCR mit diesen Primern beweist. Hingegen ist die PCR hinsichtlich der E1A-Genregion für die aus Ad-Hrk isolierte DNA negativ. Das bedeutet, dass keine Rekombination stattgefunden hat.

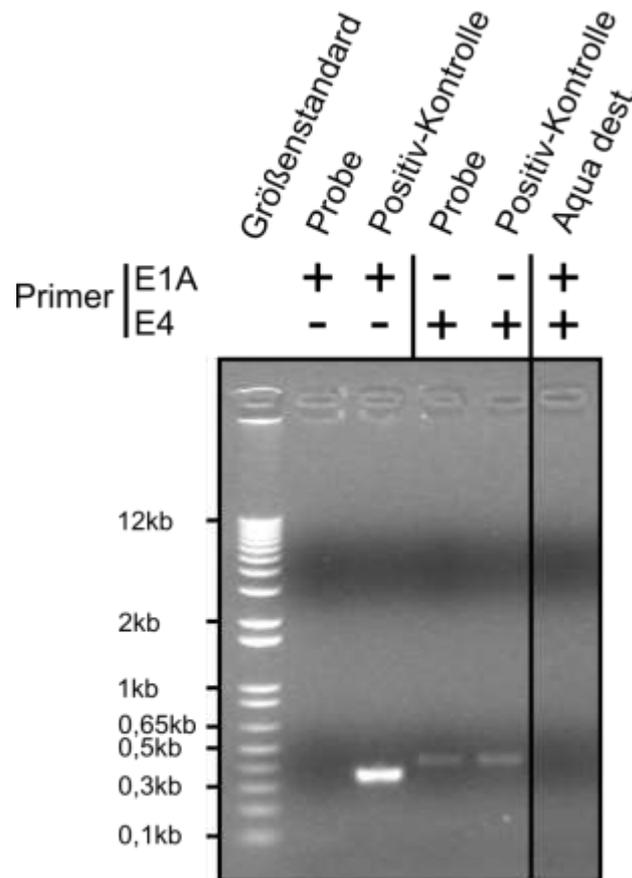


Abb. 5.3: Agarosegelelektrophorese der PCR auf E1A und E4. Probe: virale DNA (Ad-Hrk) als Template; Positiv-Kontrolle: Plasmid mit E1A- und E4-Regionen als Template; Negativ-Kontrolle: Aqua dest. PCR wurde jeweils mit angegebenen Primern durchgeführt und die Samples aufgetragen. Die virale DNA zeigt eine Deletion der E1A-Region.

Zur Bestimmung der viralen Konzentration (PFU/ μ l) wurden HEK-293-Zellkulturen mit titrierter Ad-Hrk-Suspension infiziert und auf Plaquebildung getestet. Es ergab sich eine Virenkonzentration von 2×10^6 PFU/ μ l.

5.2 Expression des Proteins Hrk und Transkriptionsregulation mittels Tet-Off-System

Über den CMV-Promotor wird in mit Ad-Hrk transfizierten Zellen konstitutiv das Transkriptionsaktivatorprotein tTA exprimiert. Dieses bindet bei Abwesenheit von

Tetrazyklinen wie Doxzyklyn an das TRE-Bindungsmotiv im $P_{hCMV^{**}}$ -Promotor und induziert die Transkription von *hrk*.¹⁶⁰ Dieser Status wird als *Tet-On* bezeichnet. In Gegenwart von Doxzyklyn dagegen bindet dieses an tTA, sodass das Transaktivatorprotein nicht an den Promotor bindet und keine Transkription von *hrk* stattfindet (*Tet-Off-Status*).¹⁶⁰

Um das Virus hinsichtlich der Regulierbarkeit der Expression von Hrk zu testen, wurden Bax (Knockout)- und Bak (Knockdown)-defiziente HCT-116-Zellen mit Ad-Hrk mit einer Multiplicity of infection (MOI) von 2; 3; 6; 13; 25 bzw. 50 transfiziert, wobei MOI der jeweils eingesetzten Anzahl an PFU pro Zelle entspricht.⁵⁶ Als Kontrolle wurden entsprechende HCT-116-Zellen mit einer MOI von 50 transfiziert und mit Doxzyklyn inkubiert, um zu überprüfen, inwieweit die Expression über das Tet-Off-Transkriptionsregulierungssystem abschaltbar ist. Der Western Blot nach Proteinextraktion 24 h nach Transfektion (s. Abb. 5.4) zeigt sowohl eine deutliche Expression von Hrk schon bei geringer Viruskonzentration als auch eine erfolgreiche Hemmung der Expression bei Inkubation mit Doxzyklyn. Da bei MOI 25 eine deutliche Proteinexpression sichtbar ist, wurde in allen folgenden Experimenten jeweils eine MOI von 25 verwendet.

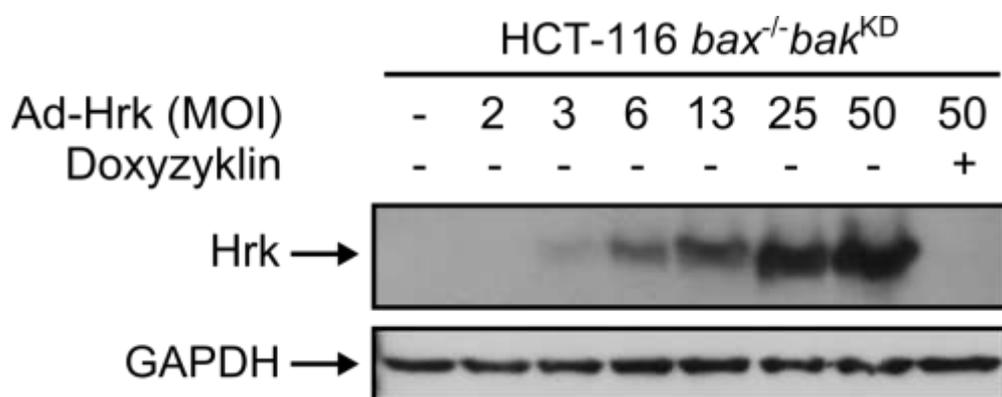


Abb. 5.4: Western Blot zur regulierbaren MOI-abhängigen Expression von Hrk. 24 h nach Transfektion mit Ad-Hrk zeigt sich eine MOI-korrelierte Expression von Hrk. Bei Zugabe von Doxzyklyn (1 µg/ml) ist keine Expression von Hrk erkennbar. Als Ladekontrolle wurde die Expression eines Housekeeping-Gens (GAPDH) verwendet. GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

5.3 Hrk induziert DNA-Fragmentierung in HCT-116-Zellen

Für die Analyse der Bax- und Bak-abhängigen mitochondrialen Signaltransduktion stromabwärts des Proteins Hrk wurde die Zelllinie HCT-116 eines humanen

Colonkarzinoms ausgewählt, da der Verlust der *hrk*-Genexpression auf Grund von Methylierung ein häufiges Ereignis beim Colorektalen Karzinom ist und Hrk deshalb auch klinisch für diese Tumorentität wichtig sein könnte.^{136, 155}

Neben dem HCT-116-Wildtyp (im Folgenden HCT-Wt genannt) stehen zum einen eine isogene Zelllinie mit Knockout des Gens *bax* (HCT-*bax*^{-/-}), zum anderen eine mit Knockdown von *bak* mittels short hairpin RNA (HCT-*bak*^{KD}) und Zellen mit sowohl Knockout von *bax* als auch Knockdown von *bak* (HCT-*bax*^{-/-}*bak*^{KD}) zur Verfügung.

Ektoper Expression von Hrk folgt DNA-Fragmentierung

Zunächst wurde untersucht, ob die Transfektion von HCT-Wt-Zellen mit Ad-Hrk und konsekutiver ektopter Expression von Hrk Apoptose auslöst. Dazu wurde als Merkmal für Apoptose die DNA-Fragmentierung herangezogen. HCT-Wt-Zellen wurden mit Ad-Hrk transfiziert, unter Tet-On- und Tet-Off-Kondition als Vektorkontrolle kultiviert und eine Mediumkontrolle eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Zellen zur fluoreszenzaktivierten durchflusszytometrischen Messung mit Propidiumiodid (PI)

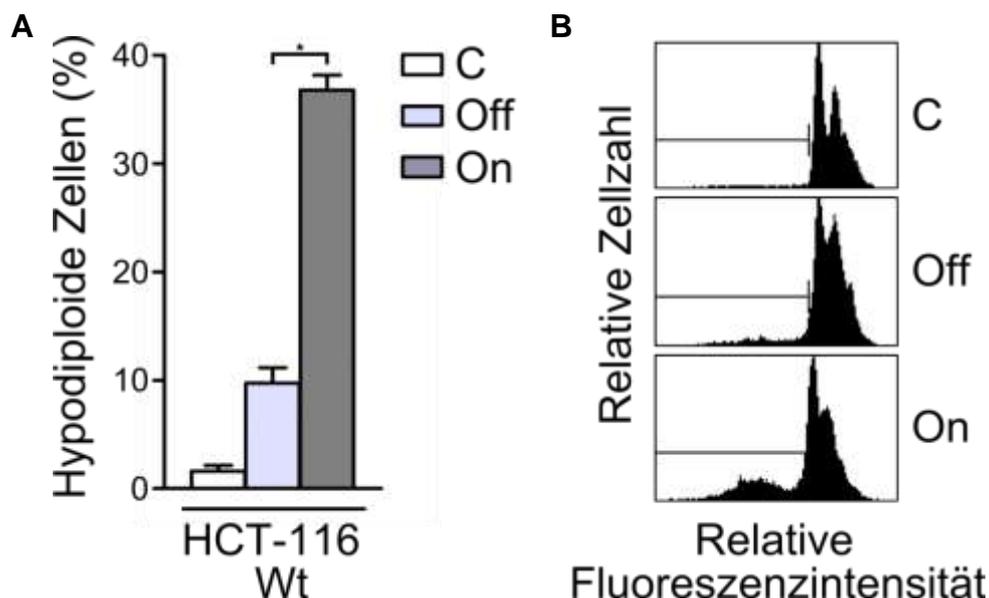


Abb. 5.5: Durchflusszytometrische Messung der Rate an hypodiploiden Zellen nach Transfektion mit Ad-Hrk. Messung wurde 24 h nach Transfektion durchgeführt. **A:** Nach ektopter Hrk-Expression zeigt sich eine erhöhte Rate an hypodiploiden Zellen. Arithmetische Mittel und Standardfehler aus je 3 parallelen Experimenten. **B:** Durchflusszytometrische Messung des zellulären DNA-Gehaltes. Der Anteil an hypodiploiden Zellen (mit geringerer Fluoreszenzintensität) ist links der Markierung dargestellt. Repräsentatives Experiment. C: Mediumkontrolle; Off: Vektorkontrolle; On: Ektoper Hrk-Expression nach viraler Transfektion; *: $p < 0,05$ (Mann-Whitney U-Test).

gefärbt. PI interkaliert in die DNA, woraufhin per Durchflusszytometrie der DNA-Gehalt auf Einzelzellniveau untersucht werden kann. Apoptotische Zellen zeichnen sich dabei in Folge der DNA-Fragmentierung als hypodiploid aus.

Es zeigte sich, dass in HCT-Wt-Zellen die ektope Expression von Hrk im Gegensatz zur Vektor- und Mediumkontrolle zu Hypodiploidie führt. Es wurde hier bei 37 % der Zellen ein hypodiploider DNA-Gehalt gemessen, gegenüber 10 % der Vektorkontrolle und 2 % der Mediumkontrolle (s. Abb. 5.5).

5.4 Hrk-induzierte DNA-Fragmentierung ist Bax-abhängig und Bak-unabhängig

Um die Beteiligung der Proteine Bax und Bak bei der Hrk-induzierten DNA-Fragmentierung in Colonkarzinomzellen zu untersuchen, wurden Zellkulturen von HCT-Wt, HCT-*bax*^{-/-}, HCT-*bak*^{KD} und HCT-*bax*^{-/-}*bak*^{KD} verwandt. Zunächst wurde der Expressionsstatus der Proteine Bax und Bak in diesen Zellen mittels SDS-PAGE und

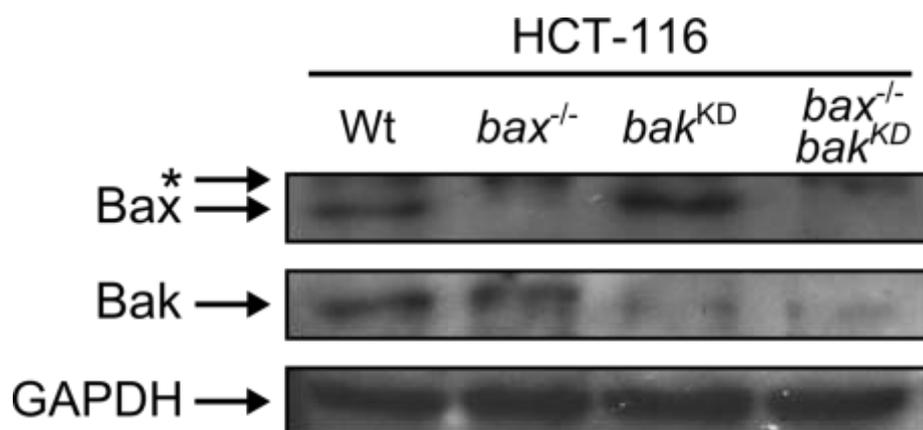


Abb. 5.6: Western Blot auf Expression von Bax und Bak. In isogenen Zellen mit Frameshift-Mutation im *bax*-Gen ist keine Bax-Expression nachweisbar, in solchen mit Knockdown des *bak*-Gens keine Bak-Expression. Als Ladekontrolle wurde die Expression eines Housekeeping-Gens (GAPDH) verwendet. GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; *: unspezifische Bande.

Western Blot überprüft. In den Lysaten der Wildtyp-Zellen lässt sich sowohl Bax als auch Bak detektieren, während bei den HCT-*bax*^{-/-}-Zellen nur Bak, bei den HCT-*bak*^{KD}-Zellen nur Bax und bei den HCT-*bax*^{-/-}*bak*^{KD}-Zellen keins der beiden Proteine detektierbar ist (s. Abb. 5.6). Anschließend wurden die Zellen mit Ad-Hrk transfiziert und unter Tet-On- und Tet-Off-Kondition kultiviert, außerdem Mediumkontrollen durchgeführt. Nach 24 h wurde die Fluoreszenzintensität als Maß für den DNA-Gehalt mit dem Durchflusszytometer gemessen.

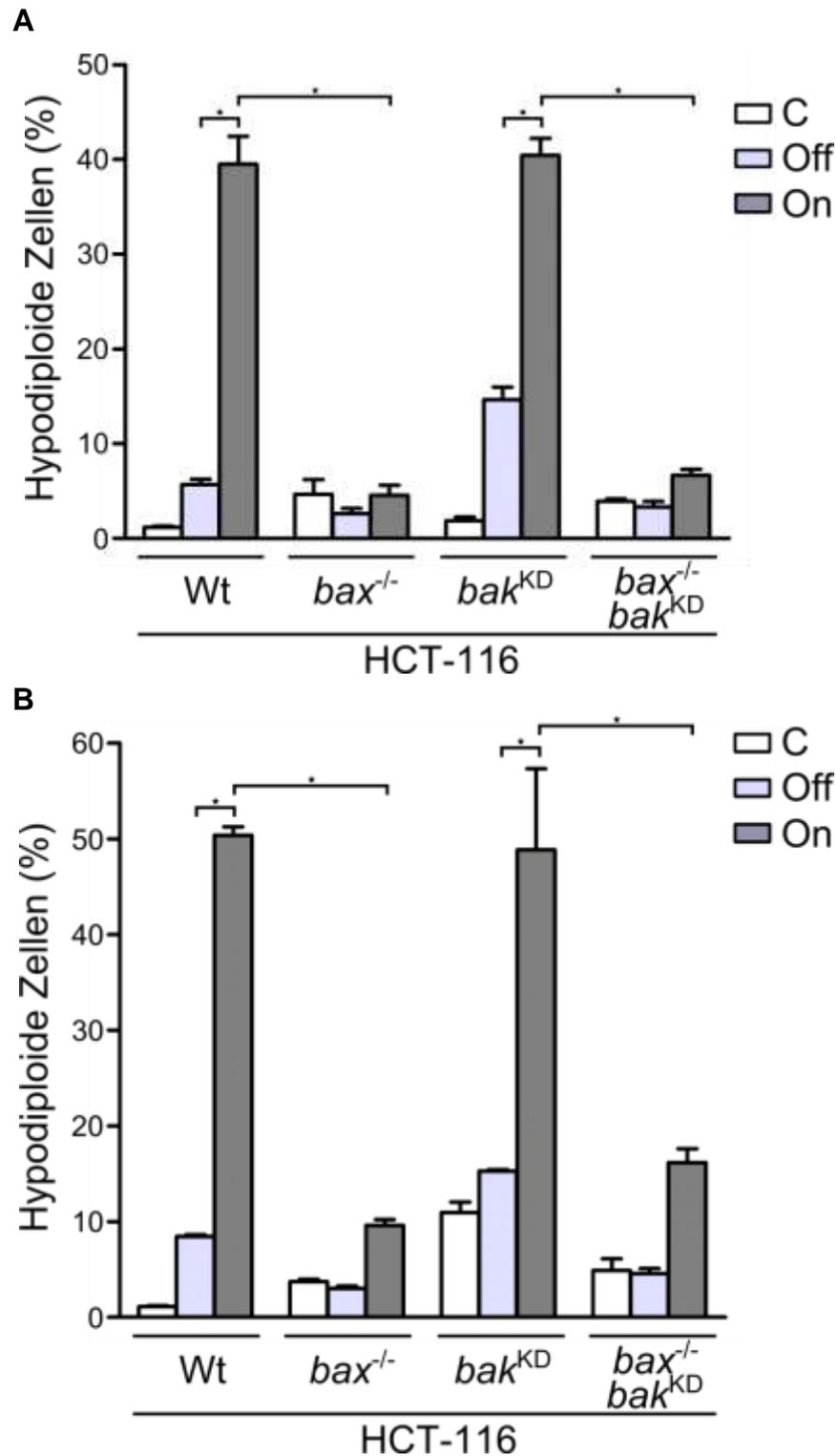


Abb. 5.7: Durchflusszytometrische Messung der Rate an hypodiploiden Zellen nach Transfektion mit Ad-Hrk nach 24 h und 48 h. A: Messung wurde 24h nach Transfektion mit Ad-Hrk durchgeführt; **B:** Messung wurde 48h nach Transfektion mit Ad-Hrk durchgeführt. Ektope Hrk-Expression führt zu erhöhter Rate an Hypodiploidie nur in Bax-profizienten Zellen, unabhängig von Bak-Expression, sowohl bei Messung nach 24 h als auch nach 48 h. C: Mediumkontrolle; Off: Vektorkontrolle; On: Ektope Hrk-Expression nach viraler Transfektion; *: $p < 0,05$ (Mann-Whitney U-Test). Arithmetische Mittel und Standardfehler aus je 3 parallelen Experimenten.

Bei den HCT-Wt-Zellen wurde eine erhöhte Rate an Zellen mit DNA-Fragmentierung von 40 % im Vergleich zu 6% in den Vektor- und 1% in den Mediumkontrollen gemessen (s. Abb. 5.7 A). Ebenso erhöht im Vergleich zu den Vektor- (15%) und Mediumkontrollen (2%) ist nach ektopter Hrk-Expression die Rate der HCT-*bak*^{KD}-Zellen mit 40%. Bei den Bax-defizienten Zellen hingegen ist nach Hrk-Expression keine erhöhte Rate an Zellen mit DNA-Fragmentierung zu beobachten. Dies trifft sowohl für die HCT-*bax*^{-/-}-Zellen zu mit 5% nach Hrk-Expression bei 3% in der Vektor- und 5% in der Mediumkontrolle als auch für die HCT-*bax*^{-/-}*bak*^{KD}-Zellen mit 7% nach Hrk-Expression bei 3% in der Vektor- und 4% in der Mediumkontrolle. Es konnte also eine Bax-Abhängigkeit der Hrk-induzierten DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte sich die DNA-Fragmentierung nach ektopter Hrk-Expression gänzlich unabhängig von der Expression des Proteins Bak.

5.5 Bax-Expression bleibt auch im zeitlichen Verlauf entscheidend für Apoptoseinduktion

Ogleich sich die Funktionen von Bak und Bax überschneiden, wird die sich im Hrk-vermittelten apoptotischen Signalweg durch Bax-Verlust ergebende Resistenz also zunächst nicht durch das vorhandene Bak überwunden. Um eine mögliche verzögerte, später als 24 h auftretende Hrk-induzierte Bak-vermittelte Apoptose zu untersuchen, wurden Zellkulturen von HCT-Wt, HCT-*bax*^{-/-}, HCT-*bak*^{KD} und HCT-*bax*^{-/-}*bak*^{KD} neben entsprechenden Mediumkontrollen mit Ad-Hrk transfiziert und unter Tet-On und Tet-Off als Vektorkontrolle für 48 h inkubiert. Nach 48 h wurde der DNA-Gehalt durchflusszytometrisch mittels Fluoreszenzintensität gemessen.

Nach ektopter Hrk-Expression wurde jeweils nur in den Bax-profizienten Zellen (HCT-Wt: 50% und HCT-*bak*^{KD}: 49%) eine deutlich erhöhte Rate an Zellen hypodiploiden DNA-Gehalts im Vergleich zu den Vektor- (8% bzw. 15%) und Mediumkontrollen (1% bzw. 11%) gemessen (s. Abb. 5.7 B). Im Vergleich dazu zeigt die Rate an hypodiploiden Bax-defizienten Zellen nach Hrk-Expression (HCT-*bax*^{-/-}: 10% und HCT-*bax*^{-/-}*bak*^{KD}: 16%) nur einen geringeren Anstieg, bezogen auf die Raten der Vektor- (3% bzw. 5%) und Mediumkontrollen (4% bzw. 5%). Die Ergebnisse zeigen, dass die Hrk-induzierte Apoptose auch 48 h nach Transfektion noch weitgehend Bax-abhängig und Bak-unabhängig bleibt.

5.6 Hrk-induzierter Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ist Bax-abhängig und Bak-unabhängig

Mit der DNA-Fragmentierung ist ein Vorgang innerhalb der Exekution der Apoptose untersucht worden. Um die Apoptoseinitiation zu analysieren, wurde als Merkmal einer mitochondrialen Beteiligung der im zeitlichen Ablauf der Apoptose früh auftretende Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) analysiert. Dieser kann durchflusszytometrisch mit dem kationischen Fluoreszenzfarbstoff JC-1 nachgewiesen werden. Der Farbstoff lagert sich in Abhängigkeit vom mitochondrialen Membranpotential in Mitochondrien ein, in denen er als rote sogenannte J-Aggregate akkumuliert. In Zellen mit zusammengebrochenem mitochondrialen Membranpotential hingegen verbleibt er als grünes Monomer im Zytosol.

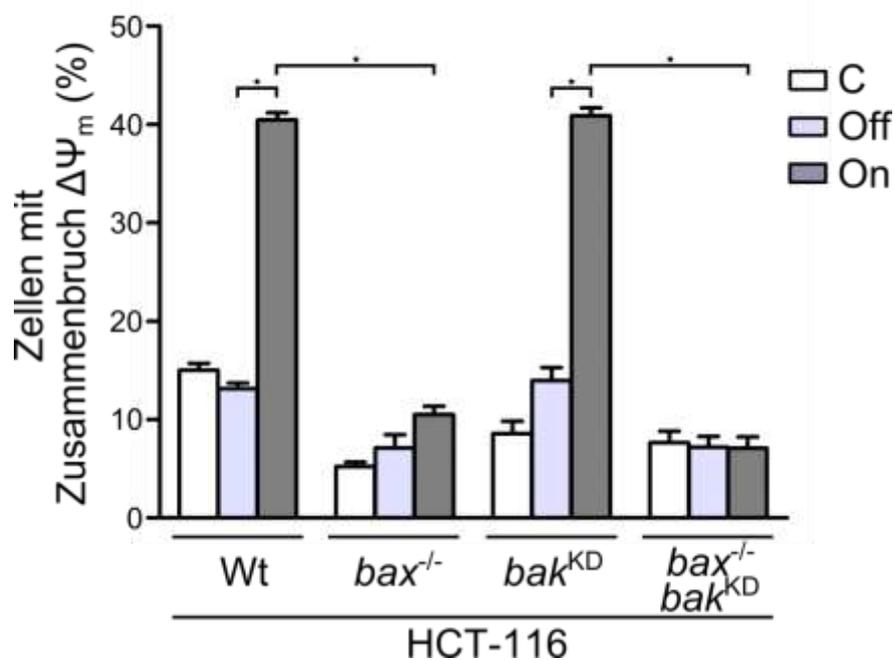


Abb. 5.8: Durchflusszytometrische Messung der Rate an Zellen mit reduziertem $\Delta\Psi_m$ nach Transfektion mit Ad-Hrk. Messung wurde 24 h nach Transfektion mit Ad-Hrk durchgeführt. Ektope Hrk-Expression führt zu erhöhter Rate an Zellen mit reduziertem $\Delta\Psi_m$ nur in Bax-profizienten Zellen, unabhängig von Bak-Expression. C: Mediumkontrolle; Off: Vektorkontrolle; On: Ektope Hrk-Expression nach viraler Transfektion; *: $p < 0,05$ (Mann-Whitney U-Test). Arithmetische Mittel und Standardfehler aus je 3 parallelen Experimenten.

Erneut wurden HCT-Wt, HCT-*bax*^{-/-}, HCT-*bak*^{KD} und HCT-*bax*^{-/-}*bak*^{KD}-Zellkulturen mit Ad-Hrk transfiziert, unter Tet-On- oder Tet-Off-Bedingungen inkubiert sowie

Mediumkontrollen durchgeführt. Nach 24 h wurden alle Zellen durchflusszytometrisch hinsichtlich Zusammenbruchs des $\Delta\Psi_m$ analysiert.

Die Rate an Zellen mit zusammengebrochenem $\Delta\Psi_m$ nach ektopter Hrk-Expression folgte den Mustern, die bei der DNA-Fragmentierung zu erkennen waren: HCT-Wt-Zellen zeigten im Vergleich zur Vektor- (13%) und Mediumkontrolle (15%) jeweils nach Hrk-Expression eine erhöhte Rate an Zellen mit reduziertem $\Delta\Psi_m$ (40 %; s. Abb. 5.8). Ähnlich verhielten sich HCT-*bak*^{KD}-Zellen (41 % Zellen mit reduziertem $\Delta\Psi_m$ nach Hrk-Expression gegenüber 14% der Vektor- und 9% der Mediumkontrollen). HCT-*bax*^{-/-}-Zellen mit 10% Zellen mit reduziertem $\Delta\Psi_m$ gegenüber 7% der Vektor- und 5% der Mediumkontrollen hingegen zeigten sich resistent gegenüber ektopter Hrk-Expression. Ebenso zeigten die HCT-*bax*^{-/-}*bak*^{KD}-Zellen nach Hrk-Expression (7%) keine erhöhte Rate an Zellen mit reduziertem $\Delta\Psi_m$ als in den Vektor- (7%) und den Mediumkontrollen (8%).

5.7 Hrk-induzierte Procaspase 3-Spaltung ist Bax-abhängig und Bak-unabhängig

Die Schnittstelle zwischen der bereits untersuchten Initiation und der Exekution der Hrk-induzierten Apoptose ist die Aktivierung der Caspase 3. Um die Aktivierung und eine

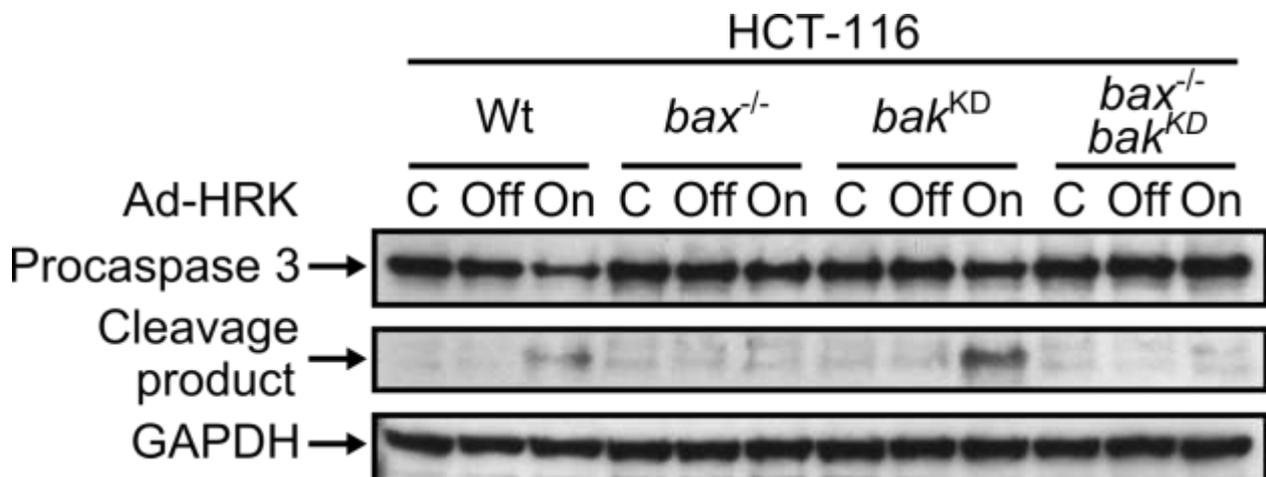


Abb. 5.9: Western Blot auf Caspase 3-Spaltprodukt nach Transfektion mit Ad-Hrk. Analyse wurde 18 h nach Transfektion durchgeführt. Nach ektopter Hrk-Expression sind Caspase 3-Spaltprodukte (als Nachweis für die Aktivierung von Caspase 3, gezeigt ist hier das p17-Spaltprodukt) nur in Bax-profizienten Zellen nachweisbar, unabhängig von der Expression von Bak. Als Ladekontrolle wurde die Expression eines Housekeeping-Gens (GAPDH) verwendet. C: Mediumkontrolle; Off: Vektorkontrolle; On: Ektoper Hrk-Expression nach Transfektion; Cleavage product: Caspase 3-Spaltprodukt; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

Abhängigkeit dieser von verschiedenen Expressionsmustern der Multidomänenproteine nachzuweisen, wurden Zellen hinsichtlich der limitierten Proteolyse der Procaspase 3 untersucht.

Dazu wurden neben Mediumkontrollen HCT-Wt, HCT-*bax*^{-/-}, HCT-*bak*^{KD} und HCT-*bax*^{-/-}*bak*^{KD}-Zellen mit Ad-Hrk transfiziert und unter Tet-On sowie Tet-Off-Bedingungen inkubiert. Nach 18 h wurden die zellulären Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Durchführung des Western Blot mit einem gegen (Pro-)Caspase 3 gerichteten Antikörper ergab sich folgendes Schema: Die Medium- und Vektorkontrollen zeigten in keinem Fall Procaspase 3-Spaltung. Nach Hrk-Expression war diese allein in Bax-profizienten (HCT-Wt und HCT-*bak*^{KD}), nicht jedoch in Bax-defizienten Zellen (HCT-*bax*^{-/-} und HCT-*bax*^{-/-}*bak*^{KD}) nachweisbar (s. Abb. 5.9). Bak-Defizienz korrelierte dagegen nicht mit einem Ausbleiben der Spaltung der Procaspase 3 bei Expression von Hrk.

5.8 Knockdown von *mcl-1* sensitiviert Bax-defiziente Zellen gegenüber Hrk-induzierter DNA-Fragmentierung

Als Mechanismus der Resistenz Bax-defizienter Zellen gegenüber der Hrk-induzierten Apoptose ist vorstellbar, dass eine Aktivierung des Proteins Bak ausbleibt auf Grund einer insgesamt unzureichenden Bindung von Bak inhibierenden Proteinen durch Hrk. Die BH3-Domäne von Hrk zeigt *in vitro* eine starke Affinität zu den Bak-inhibierenden Proteinen Bcl-x_L und A1, jedoch eine im Vergleich geringere zu Mcl-1, dem Hauptinhibitor von Bak.^{65, 98}

Um die Bedeutung des Proteins Mcl-1 bei der Resistenz Bax-defizienter Zellen zu untersuchen, wurde die Hrk-induzierte DNA-Fragmentierung nach Knockdown von *mcl-1* mittels small inhibitory RNA (siRNA) gemessen. Dazu wurden HCT-Wt, HCT-*bax*^{-/-}, HCT-*bak*^{KD} und HCT-*bax*^{-/-}*bak*^{KD}-Zellkulturen zunächst mit siRNA gegen *mcl-1* sowie mit Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen zusätzlich mit Ad-Hrk transfiziert und unter Tet-On oder Tet-Off-Bedingungen sowie als Mediumkontrollen inkubiert. Nach weiteren 24 h wurde der DNA-Gehalt der Zellen durchflusszytometrisch gemessen.

Im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen ohne siRNA-vermittelten Knockdown von *mcl-1* zeigen die HCT-*bax*^{-/-}-Zellen bei *mcl-1*-Knockdown nach Expression von Hrk eine erhöhte Rate an hypodiploiden Zellen (28 % im Vergleich zu 8 % bei Kontroll-siRNA) (s. Abb. 5.10). Im Gegensatz dazu konnte die Resistenz der neben Bax-

zusätzlich Bak-defizienten Zellen (HCT-*bax*^{-/-}*bak*^{KD}) nicht durch den Knockdown von *mcl-1* durchbrochen werden. Die Rate an hypodiploiden Zellen nach Hrk-Expression

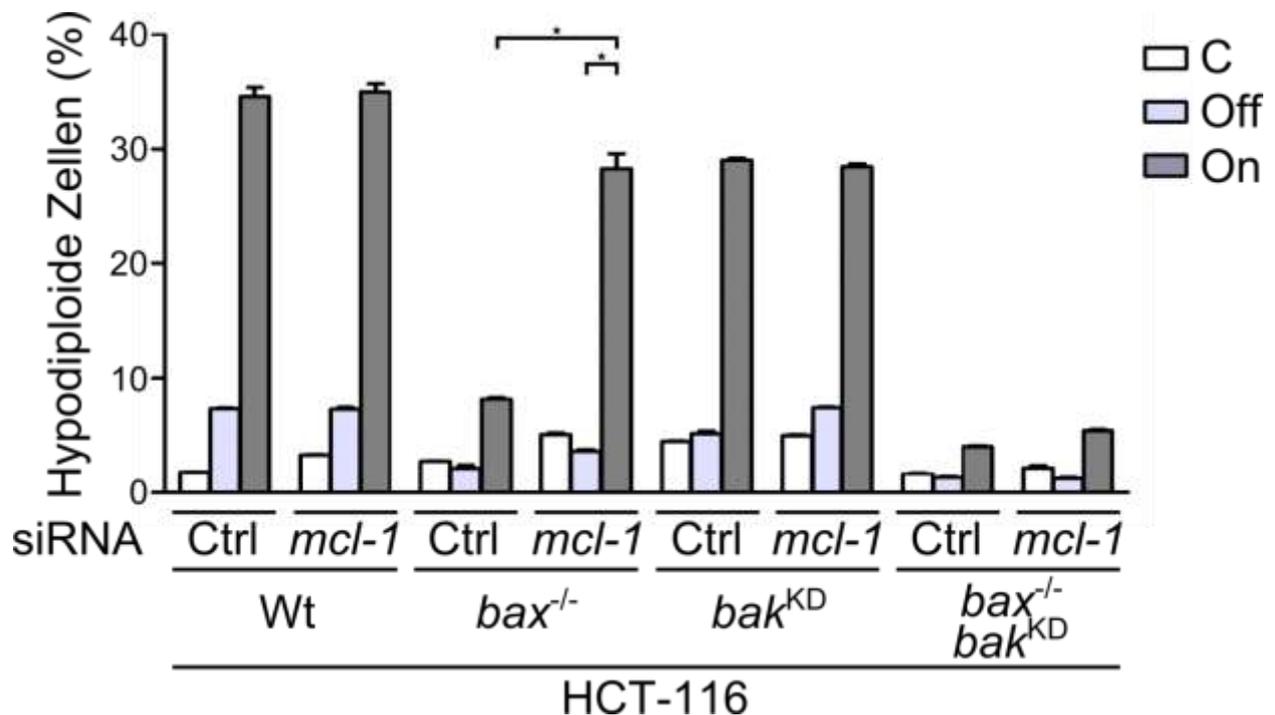


Abb. 5.10: Durchflusszytometrische Messung der Rate an hypodiploiden Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen *mcl-1* und mit Ad-Hrk. Transfektion mit siRNA wurde 24 h vor Transfektion mit Ad-Hrk durchgeführt, Messung 24 h danach. Nach Knockdown von *mcl-1* und ektope Hrk-Expression zeigt sich in Bax-defizienten und Bak-profizienten Zellen eine erhöhte Rate an hypodiploiden Zellen als ohne *mcl-1*-Knockdown. Ctrl: Kontroll-siRNA; *mcl-1*: siRNA gegen *mcl-1*; C: Mediumkontrolle; Off: Vektorkontrolle; On: Ektope Hrk-Expression nach Transfektion; *: $p < 0,05$ (Mann-Whitney U-Test). Arithmetische Mittel und Standardfehler aus je 3 parallelen Experimenten.

liegt mit 5 % ähnlich niedrig wie die Rate bei Verwendung von Kontroll-siRNA (4%). Außerdem hat der Knockdown von *mcl-1* keinen Einfluss auf die Rate von Zellen mit DNA-Fragmentierung bei Hrk-Expression in den HCT-Wt-Zellen (35 % im Vergleich zu 35 % bei Kontroll-siRNA) oder in den HCT-*bak*^{KD}-Zellen (28 % im Vergleich zu 29 % bei Kontroll-siRNA).

5.9 Knockdown von *mcl-1* sensitiviert Bax-defiziente Zellen gegenüber

Hrk-induziertem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials

Um zu untersuchen, inwieweit die Expression von *mcl-1* den Hrk-induzierten Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials unter verschiedenen Expressionsmustern von Bax und Bak beeinflusst, wurden HCT-Wt, HCT-*bax*^{-/-}, HCT-*bak*^{KD} und HCT-116 *Bax*^{-/-}*bak*^{KD}-Zellen erneut zunächst mit siRNA gegen *mcl-1*

oder Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Ad-Hrk transfiziert und unter Tet-On- oder Tet-Off-Bedingungen sowie als Mediumkontrollen inkubiert. Nach

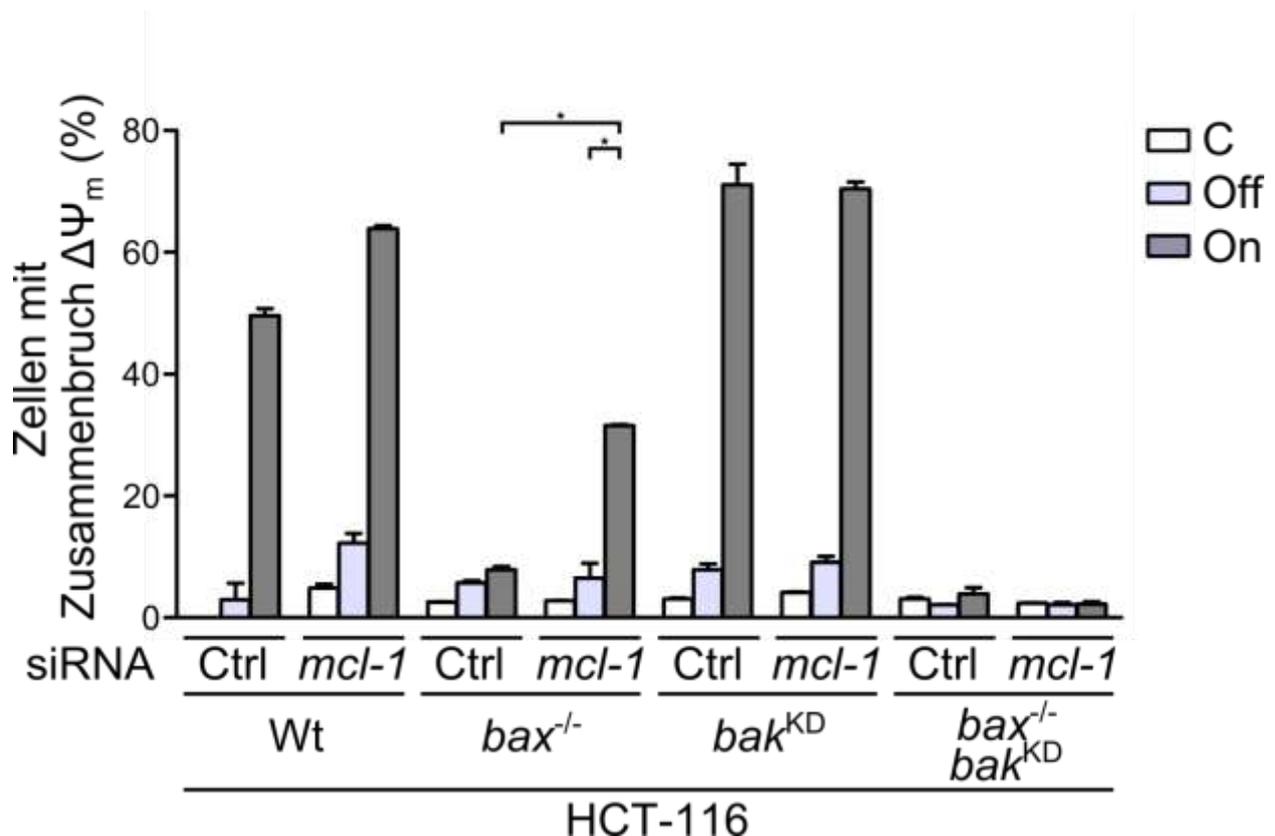


Abb. 5.11: Durchflusszytometrische Messung der Rate an Zellen mit reduziertem $\Delta\Psi_m$ nach Transfektion mit siRNA gegen *mcl-1* und mit Ad-Hrk. Transfektion mit siRNA wurde 24 h vor Transfektion mit Ad-Hrk durchgeführt, Messung 24 h danach. Nach Knockdown von *mcl-1* und ektopter Hrk-Expression zeigt sich in Bax-defizienten und Bak-profizienten Zellen eine erhöhte Rate an Zellen mit reduziertem $\Delta\Psi_m$ als ohne *mcl-1*-Knockdown. Ctrl: Kontroll-siRNA; *mcl-1*: siRNA gegen *mcl-1*; C: Mediumkontrolle; Off: Vektorkontrolle; On: Ektoper Hrk-Expression nach viraler Transfektion; *: $p < 0,05$ (Mann-Whitney U-Test). Arithmetische Mittel und Standardfehler aus je 3 parallelen Experimenten.

24 h wurden alle Zellen im Durchflusszytometer hinsichtlich Zusammenbruchs des $\Delta\Psi_m$ analysiert.

Auch hier konnte nach Hrk-Expression in HCT-*bax*^{-/-}-Zellen und *mcl-1*-Knockdown mit 32 % eine erhöhte Rate an Zellen mit reduziertem $\Delta\Psi_m$ gegenüber den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen (8 %) gemessen werden (s. Abb. 5.11). Im Gegensatz dazu zeigten sich nach ektopter Expression von Hrk erhöhte Raten an $\Delta\Psi_m$ weder in kombiniert Bax-/Bak-defizienten Zellen (HCT-*bax*^{-/-}*bak*^{KD}: 2 % im Vergleich zu 4 % der Kontrolle) noch in Bak-defizienten Zellen (HCT-*bak*^{KD}: 70 % im Vergleich zu 71 % der Kontrolle). In den Wildtyp-Zellen ist unter Hrk-Expression eine leicht höhere Rate der

Zellen mit zusammengebrochenem $\Delta\Psi_m$ nach *mcl-1*-Knockdown messbar (HCT-Wt: 64 % im Vergleich zu 50 % der Kontrolle).

5.10 Knockdown von *mcl-1* sensitiviert Bax-defiziente Zellen gegenüber

Hrk-induzierter Procaspase 3-Spaltung

Um den Einfluss der Expression von *mcl-1* auf die Hrk-induzierte Procaspase 3-Spaltung bei verschiedenen Expressionsmustern der Proteine Bax und Bak zu

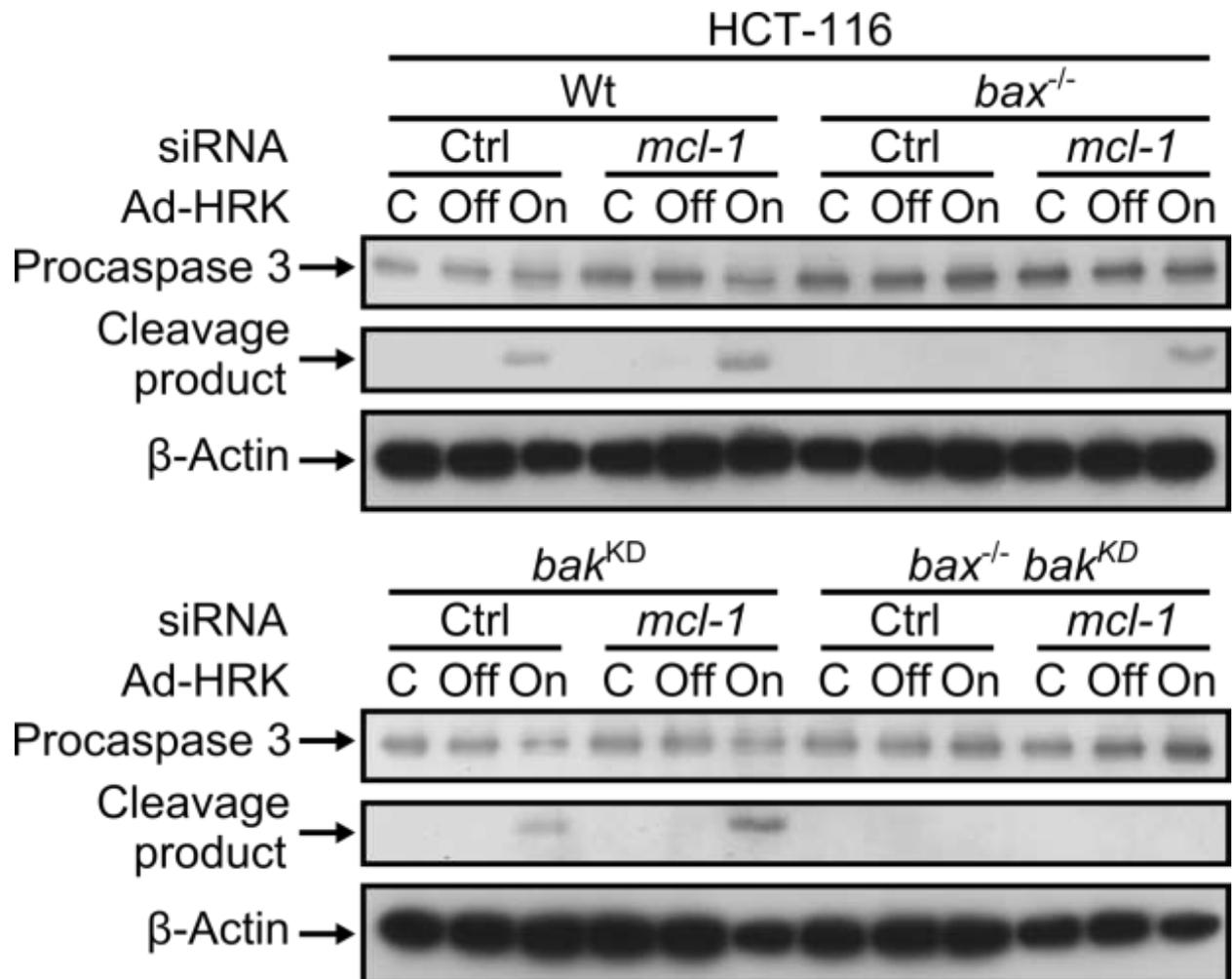


Abb. 5.12: Western Blot auf Caspase 3-Spaltprodukt nach Transfektion mit siRNA gegen *mcl-1* und mit Ad-Hrk. Transfektion mit siRNA wurde 24 h vor Transfektion mit Ad-Hrk durchgeführt, Analyse 18 h danach. Nach Knockdown von *mcl-1* und ektopter Hrk-Expression sind Caspase 3-Spaltprodukte (als Nachweis der Aktivierung von Caspase 3, gezeigt ist hier das p12-Spaltprodukt) in Bax-defizienten und Bak-profizienten Zellen nachweisbar. Als Ladekontrolle wurde die Expression eines Housekeeping-Gens (β -Actin) verwendet. Ctrl: Kontroll-siRNA-Pool; *mcl-1*: siRNA gegen *mcl-1*; C: Mediumkontrolle; Off: Vektorkontrolle; On: Ektope Hrk-Expression nach viraler Transfektion; Cleavage product: Caspase 3-Spaltprodukt.

untersuchen, wurden nach bereits beschriebenem Muster HCT-Wt, HCT-*bax*^{-/-}, HCT-*bak*^{KD} und HCT-*bax*^{-/-}*bak*^{KD}-Zellen zunächst neben den jeweiligen siRNA-Kontrollen mit siRNA gegen *mcl-1* transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Ad-Hrk transfiziert und unter Tet-On- oder Tet-Off-Bedingungen sowie als Mediumkontrollen inkubiert. Weitere 18 h später, entsprechend dem im vorherigen Experiment (s. Kap. 5.7) gewählten Intervall, wurde ein Western Blot mit Antikörper gegen (Pro-)Caspase 3 durchgeführt. Es zeigte sich folgendes Schema: Spaltprodukte der Procaspase 3 können nach *mcl-1*-Knockdown und Hrk-Expression nicht nur in Bax-profizienten (HCT-Wt und HCT-*bak*^{KD}), sondern insbesondere auch in Bax-defizienten, aber Bak-profizienten Zellen (HCT-*bax*^{-/-}) nachgewiesen werden (s. Abb. 5.12). Im Vergleich dazu sind die Spaltprodukte bei Hrk-Expression und fehlendem *mcl-1*-Knockdown in HCT-*bax*^{-/-}-Zellen nicht nachweisbar. Die kombiniert Bax-/Bak-defizienten HCT-*bax*^{-/-}*bak*^{KD}-Zellen zeigen in keinem Fall Procaspasespaltung.

6 Diskussion

6.1 Hrk induziert Apoptose in HCT-116-Zellen

Da die Proteine der Bcl-2-Familie in neoplastischen Zellen häufig in ihrer Expression dereguliert sind und dies zum Tumorüberleben beiträgt, bietet die Proteinfamilie einen Angriffspunkt moderner, spezifischer Tumorthérapien. Insbesondere die erniedrigte Expression proapoptotischer BH3-only-Proteine wird bei verschiedenen Tumorentitäten vorgefunden (s. Kap. 3.3.5). Das Gen *hrk* unterliegt beispielweise beim Colorectalen Carcinom in vielen Fällen einer supprimierenden Hypermethylierung. Allerdings sind der genaue Signalweg der Apoptoseinitiation stromabwärts von Hrk und vor allem die Rolle der Multidomänenproteine bei der Hrk-induzierten Apoptose, beide Grundvoraussetzungen für die Auswahl einer spezifischen Therapie, noch weitgehend unbekannt. Um die Signalwege stromabwärts des Proteins Harakiri mittels ektopter Hrk-Expression in Zellkulturen untersuchen zu können, wurde ein rekombinantes, Tet-Off-reguliert Hrk exprimierendes Adenovirus (Ad-Hrk) hergestellt (s. Kap. 5.1). Im Western Blot nach Transfektion ist eine MOI-abhängige Expression des Proteins festzustellen, die bei Inkubation mit Doxyzyklin (Tet-Off-Bedingung) nicht nachweisbar ist (s. Abb. 5.4). Bei ektopter Hrk-Expression in Bax- und Bak-profizienten HCT-Wt-Zellen nach Transfektion mit Ad-Hrk zeigt sich durchflusszytometrisch mittels PI-Färbung eine erhöhte Rate an hypodiploiden Zellen (s. Kap. 5.3). Dies ist ein Merkmal für die Exekution von Apoptose. Neben der DNA-Fragmentierung sind nach Expression von Hrk auch der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials sowie die Aktivierung der Caspase 3 nachweisbar (s. Abb. 5.8 und Abb. 5.9). Folglich aktiviert Hrk in HCT-116-Zellen einen mitochondrial vermittelten Signalweg, der zu Apoptose führt.

Zum Zeitpunkt der Arbeit waren bereits Daten veröffentlicht, die belegen, dass in Zellen nach ektopter Expression von Hrk oder des homologen murinen DP5 Apoptose induziert wird – dies bezieht sich auf humane embryonale Zellen mesodermalen Ursprungs sowie auf humane maligne und murine benigne Zellen ektodermalen Ursprungs.^{81, 109,}

^{132, 134} Zu Zellen entodermalen Ursprungs und im Speziellen Colonkarzinomzellen hatte es bisher keine Daten gegeben. Die Eigenschaft des Proteins, Apoptose auszulösen, wird mit den vorliegenden Daten dahingehend erweitert, dass sie auch für entodermale und im Speziellen Colonkarzinomzellen zutrifft.

Obwohl die Transfektion mit Ad-Hrk in Tet-Off-Kondition auf Grund nicht nachweisbarer Proteinexpression im Western Blot (s. Abb. 5.4) als geeignete Vektorkontrolle erscheint,

zeigt sich eine leicht erhöhte Apoptoserate der Vektorkontrolle im Vergleich zur Mediumkontrolle (s. Abb. 5.5, Abb. 5.7 und Abb. 5.8). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Aktivierung proapoptotischer Signalwege allein durch das zum Gentransfer benutzte Virus.¹⁶¹ Brand et al. konnten zeigen, dass hohe Viruslasten an Adenoviren zu Apoptose führen.¹⁶¹ Die in der genannten Arbeit untersuchten toxischen Viruslasten (MOI>100) übertreffen die in dieser Arbeit benutzte MOI von 25 um ein Vielfaches, sodass ein bedeutender Einfluss auf die Versuchsergebnisse hier unwahrscheinlich ist.¹⁶¹ Geringfügig höhere Raten an hypodiploiden Zellen der Vektorkontrollen im Vergleich zu den Mediumkontrollen sind dadurch jedoch erklärbar. Dies gilt auch für leichtgradig höhere Raten an Zellen mit Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$. Denn das in HCT-116-Zellen exprimierte p53 als ein Mediatorprotein der zellulären Antwort auf adenovirale Transfektion induziert über Puma bzw. Noxa mitochondrial vermittelt Apoptose (s. Kap. 3.3.3.3).^{161, 162} Eine zweite mögliche Erklärung für die erhöhte Apoptoserate der Vektorkontrollen im Vergleich zu den Mediumkontrollen ist, dass das Tet-Off-System zur Transkriptionskontrolle wahrscheinlich nur eine unvollständige Unterdrückung der Transkription bietet und eine nicht im Western Blot detektierbare (s. Kap 5.2) residuale Expression von Hrk zu einem leichten Anstieg der Apoptoserate führt. Darüber hinaus übt, als dritte mögliche Erklärung, der konstitutiv exprimierte Transkriptionsaktivator tTA eine toxische Wirkung auf die transfizierte Zelle aus.¹⁶³ Mit dem Einsatz eines den *lacZ* (Gen der β -Galaktosidase von *E. coli*)-ORF statt des *hrk*-ORF beinhaltenden adenoviralen Vektors als Vektorkontrolle könnte man diese Möglichkeit prüfen.¹⁶² Auf Grund der geringen Unterschiede zwischen dem Verhalten der Vektor- und der Mediumkontrolle war dies jedoch nicht notwendig.

Auch als Erklärung für eine erhöhte Apoptoserate nach Transfektion von Ad-Hrk und Inkubation in Tet-On-Kondition im Vergleich zu den Kontrollen ist neben der Aktivierung eines apoptotischen Signalwegs allein durch Hrk ein versuchsbedingter Grund möglich. Vorstellbar ist hier eine über die reine Addition hinausgehende Potenzierung der proapoptotischen Wirkung von Hrk durch andere Faktoren wie die adenovirale Transfektion oder den Transaktivator tTA. Jedoch sind, wie oben beschrieben, Daten zu Experimenten publiziert, in denen Hrk mit nichtviralen Vektoren ektop exprimiert wurde und bei denen ebenfalls erhöhte Apoptoseraten im Vergleich zu den Vektorkontrollen nachgewiesen wurden.^{81, 132, 134} Folglich ist diese Möglichkeit einer versuchsbedingten Beeinflussung der Apoptoserate, die speziell unter Tet-On-Kondition aufträte, zu vernachlässigen.

6.2 Hrk-induzierte Apoptose ist abhängig von Bax und unabhängig von Bak

Die Aktivierung der Multidomänenproteine stellt einen kritischen Abschnitt des Signalwegs stromabwärts von BH3-only-Proteinen dar. Um den noch weitgehend unklaren Signalweg stromabwärts von Hrk zu untersuchen, wurde Harakiri daher neben HCT-116-Wildtyp-Zellen in isogenen Zelllinien mit spezifischem Verlust von Bax, Bak oder beiden Multidomänenproteinen ekto exprimiert. Unterschiedliche Abschnitte der Apoptose wurden untersucht: Erstens wurde der mitochondriale Signalweg der Initiation mittels Nachweises eines Zusammenbruchs des mitochondrialen Membranpotentials analysiert. Zweitens wurde per Western Blot die Verbindungsstelle zwischen Initiation und Exekution untersucht, die aktivierende Spaltung der Caspase 3. Drittens wurde die Exekution durchflusszytometrisch mittels Nachweises erniedrigten zellulären DNA-Gehalts analysiert.

Bei diesen Untersuchungen weisen die Zellkulturen nach ektopter Expression von Hrk ein durch den Expressionsstatus von Bax diskriminiertes Verhalten auf. In Bax-profizienten Zellen lassen sich alle drei Abschnitte der Apoptose nachweisen, in Bax-defizienten Zellen dagegen ist bei keiner Untersuchung Apoptose feststellbar (s. Kap. 5.4, 5.5, 5.6 und 5.7). Da die Ergebnisse ohne Ausnahme konsistent sind, zeigen sie in ihrer Gesamtheit eine Bax-abhängige und Bak-unabhängige Initiation von Apoptose nach ektopter Hrk-Expression in HCT-116-Zellen. Es lässt sich schlussfolgern: In den durch Hrk aktivierten und zu Apoptose führenden Signalweg ist Bax als essentielles Mediatorprotein involviert und wird dabei aktiviert. Ob Bak exprimiert wird oder nicht, hat hingegen keine entscheidende Bedeutung für die Hrk-induzierte Apoptose.

Die Expression des Proteins Bax war bereits in cerebellären Körnerzellen der Maus als Bedingung für die DP5-induzierte Apoptose beschrieben worden: Bei Knockout des Gens *bax* findet in diesen Zellen nur marginal Apoptose nach ektopter Expression von DP5 statt.¹³⁴ Mit den hier gewonnenen Daten konnte gezeigt werden, dass diese Abhängigkeit auch für das humane Protein Hrk und in humanen Zellen zutrifft.

Zum Zusammenhang zwischen Hrk bzw. DP5 und dem Protein Bak oder dessen Expressionslevel hatte es bisher keine Daten gegeben. Dass Bak eine ähnliche Bedeutung im Signalweg stromabwärts von Hrk haben könnte wie das homologe Bax, ließ sich auf Grund funktioneller Daten zu Hrk annehmen. So ist die Affinität der BH3-Domäne von Hrk zu den vorwiegend Bak inhibierenden antiapoptotischen Proteinen vergleichbar mit denen zu den vorwiegend Bax inhibierenden. Die Affinität zum Bak-Inhibitor Mcl-1 ist, wenngleich geringer als zu allen anderen antiapoptotischen

Proteinen, ähnlich hoch wie diejenige zum Bax-Inhibitor Bcl-2 (s. Abb. 3.4). Entgegen der Annahme zeigt sich allerdings, dass der Verlust von Bak, im Gegensatz zu Bax, keinen Effekt hat auf die Hrk-induzierte Apoptose.

Eine Erklärung für die fehlende Weiterleitung des proapoptotischen Signals bei Abwesenheit von Bax wäre, dass Bak als spätes Ereignis, also zu einem späteren Zeitpunkt als 24 h nach Transfektion aktiviert würde. Dass jedoch auch nach dem doppelten Zeitintervall keine gesteigerte Apoptoserate in Bax-defizienten Zellen nachzuweisen ist, macht dies unwahrscheinlich (s. Abb. 5.7).

Eine mögliche die Interaktionen innerhalb der Bcl-2-Proteinfamilie betreffende Erklärung für die Abhängigkeit der Hrk-induzierten Apoptose von der Bax- und Unabhängigkeit von der Bak-Expression wäre eine fehlende direkte Aktivierung des Proteins Bak durch Hrk, im Gegensatz zu Bax. Jedoch wurde beschrieben, dass Hrk und Bax keine direkte Protein-Protein-Interaktion miteinander eingehen, sodass auch Bax nicht direkt durch Hrk aktiviert wird.^{81, 99} Als weitere Erklärungsmöglichkeit böte sich ein Modell an, in dem Hrk direkt ein oder mehrere proapoptotische Proteine aktiviert, die selbst Bax aktivieren, aber nicht Bak. Gegen diese Theorie spricht allerdings, dass als Bindungspartner von Hrk bisher lediglich antiapoptotisch wirksame Proteine identifiziert worden sind (s. Kap. 3.3.4.2). Zuletzt bleibt die Möglichkeit, dass Hrk entsprechend dem *Displacement*-Modell mit ausreichend hoher Affinität die Bax hemmenden, jedoch mit insgesamt ungenügender Affinität die Bak hemmenden Proteine bindet, sodass nur Bax, nicht Bak durch Hrk von dessen Inhibitoren befreit und dadurch aktiviert wird. Hierfür spricht, dass antiapoptotische Bcl-2-Proteine identifiziert worden sind, die sowohl an die Multidomänenproteine binden als auch mit Hrk Protein-Protein-Interaktionen eingehen und die darüber hinaus unterschiedliche Spezifitäten hinsichtlich der Bindung von Bax oder Bak aufweisen (s. Kap. 3.3.3).

Die Abhängigkeit der durch ektope Hrk-Expression induzierten Apoptose von Bax lässt schlussfolgern, dass Hrk in Bax-profizienten Zellen die Bax-hemmenden Proteine bindet und dadurch suffizient Bax enthemmt wird, welches dann die Diffusion apoptotischer Faktoren aus dem IMS ermöglicht (s. Abb. 6.1). Da die Hrk-induzierte Apoptose von der Bak-Expression unabhängig ist, scheint eine solche Inaktivierung von Bak-bindenden antiapoptotischen Proteinen durch Hrk nicht oder nur insuffizient zu erfolgen.

Welche der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine kämen als ursächlich für die fehlende Weiterleitung des Apoptosesignals durch Bak in Frage? Hier sind vor allem die drei Proteine zu nennen, für die beschrieben worden ist, dass sie an Bak binden und dieses

inhibieren: A1, Bcl-x_L und Mcl-1. Den größten Einfluss auf das Ausbleiben einer Aktivierung von Bak sollte nach dem oben beschriebenen Modell das Protein haben, das die geringste Affinität zu Hrk und die größte Affinität zu Bak besitzt. Dieses Protein ist Mcl-1.^{65, 98}

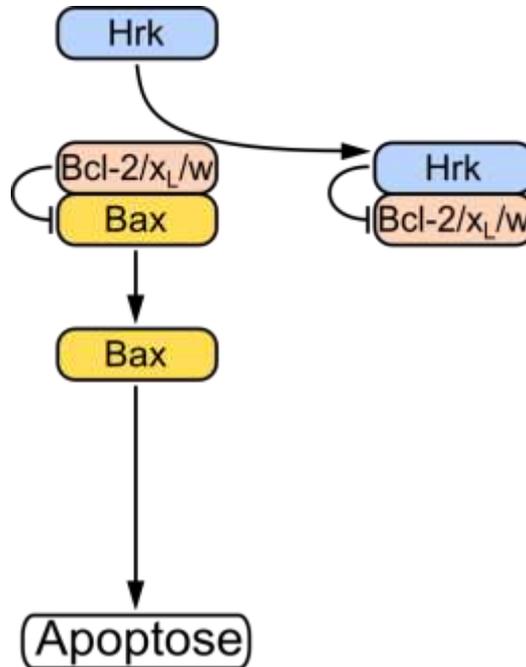


Abb. 6.1: Modell zur Induktion von Apoptose durch das Protein Hrk (I). Hrk befreit Bax von Bcl-2, Bcl-x_L und Bcl-w, woraufhin ungebundenes Bax Apoptose auslöst.

6.3 Knockdown von *mcl-1* sensitiviert Bax-defiziente Zellen gegenüber Hrk-induzierter Apoptose

In Abwesenheit von Bax ist also Mcl-1 wahrscheinlich ein entscheidendes Protein bei der Verhinderung der Weiterleitung des durch Hrk-Expression gegebenen proapoptotischen Signals über Bak. Daraus ergibt sich die Frage, ob bei Abwesenheit von Mcl-1 eine Hrk-induzierte und gleichzeitig Bak-vermittelte Apoptose stattfinden kann. Um dies zu überprüfen, wurde *mcl-1* in HCT-116-Zellen und isogenen Zellen mit spezifischem Verlust von Bax, Bak oder beiden Multidomänenproteinen vor der Transfektion mit Ad-Hrk mittels siRNA herunterreguliert.

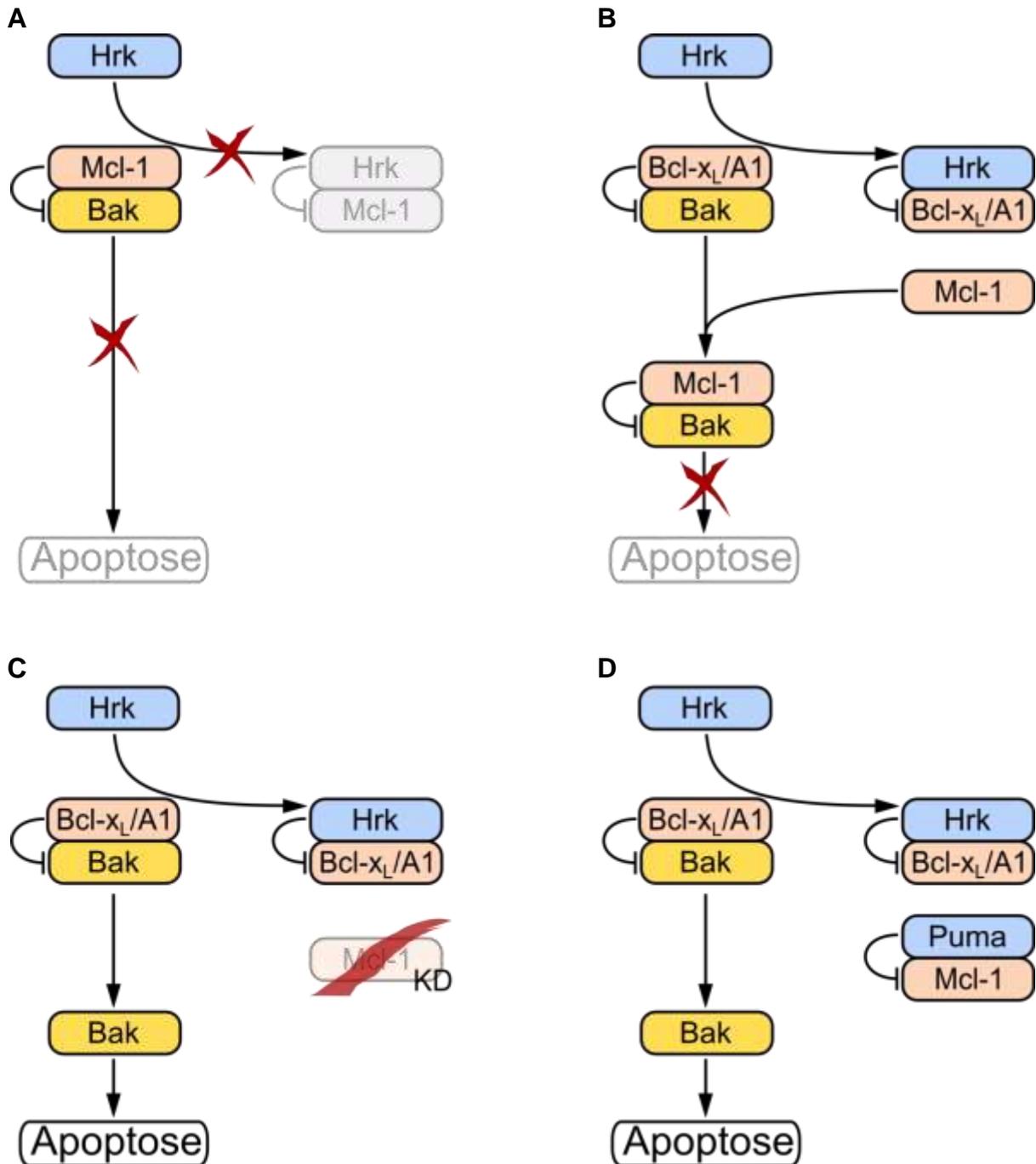


Abb. 6.2: Modelle zur Induktion von Apoptose durch das Protein Hrk (II). **A:** Hrk bindet Mcl-1 nicht suffizient, Bak bleibt an Mcl-1 gebunden und inaktiv. Apoptose findet nicht statt. **B:** An Bcl-x_L/A1 gebundenes Bak wird durch Bindung von Hrk an Bcl-x_L/A1 befreit. Bak wird daraufhin von nicht suffizient durch Hrk gebundenem Mcl-1 inaktiviert. Apoptose findet nicht statt. **C:** Bei Knockdown von *mcl-1* wird an Bcl-x_L/A1 gebundenes Bak durch Bindung von Hrk an Bcl-x_L/A1 befreit. Daraufhin findet Apoptose statt. **D:** Bei gleichzeitiger Sequestrierung von Mcl-1 durch BH3-only-Proteine wie hier als Beispiel Puma wird an Bcl-x_L/A1 gebundenes Bak durch Bindung von Hrk an Bcl-x_L/A1 befreit. Daraufhin findet Apoptose statt.

In Bax-profizienten Zellen finden dabei nach Hrk-Expression entsprechend den vorherigen Ergebnissen ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials statt sowie Spaltung der (Pro-)Caspase 3 und DNA-Fragmentierung (s. Kap. 5.8, 5.9, 5.10). Durch den Knockdown von *mcl-1* wird dies nicht beeinflusst.

Ebenfalls entsprechend den vorherigen Ergebnissen zeigen Bak-profiziente und Bax-defiziente Zellen ohne Knockdown von *mcl-1* keine Apoptose nach Hrk-Expression. Nach Knockdown von *mcl-1* allerdings lassen sich in diesen Zellen unter Expression von Hrk sowohl ein Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ als auch Procaspase 3-Spaltung und Zellen mit hypodiploidem DNA-Gehalt nachweisen. Dass der Knockdown mittels der hier verwandten siRNA und Methodik spezifisch für *mcl-1* ist, konnten Gillissen et al. (2010 und 2013) bereits zeigen.^{38, 39} Weiter wird die Wahrscheinlichkeit eines unspezifischen Effekts der Transfektion mit siRNA auf die Apoptoserate durch die Versuche mit Kontroll-siRNA minimiert. Folglich findet in Bax-defizienten Zellen in Abwesenheit von Mcl-1 und Anwesenheit von Bak nach ektopter Hrk-Expression eine über den mitochondrialen Signalweg initiierte Apoptose statt. Lediglich in sowohl Bax- als auch Bak-defizienten Zellen ist unabhängig von der Mcl-1-Expression keine Erhöhung der Apoptoserate nach Hrk-Expression feststellbar.

Die Hrk-induzierte Apoptose erweist sich nach Knockdown von *mcl-1* nicht abhängig allein von Bax, sondern davon, ob zumindest eines der Proteine Bax oder Bak exprimiert wird. Dies lässt entgegen den vorherigen Beobachtungen auf eine funktionelle Redundanz der Proteine Bak und Bax, also eine Beteiligung des Proteins Bak bei der Hrk-induzierten Apoptose schließen – Bak kann durch Hrk aktiviert werden. Allerdings fungiert das Protein Mcl-1 als Faktor, der hierbei eine Aktivierung von Bak verhindert: Offensichtlich ist die Affinität von Hrk zu Mcl-1 nicht ausreichend, um die Inhibition von Bak aufzuheben. Durch die Beseitigung des Faktors Mcl-1 mittels Knockdown jedoch wird die Resistenz durchbrochen. Die Inaktivierung der Bak-inhibierenden Proteine Bcl-x_L und A1 durch Hrk ist offenbar suffizient für die Aktivierung von Bak. Daraufhin löst Bak die Freisetzung apoptotischer Faktoren aus dem IMS aus, wodurch das Caspasesystem aktiviert und Apoptose, unter anderem mittels DNA-Fragmentierung, exekutiert wird (s. Abb. 6.2).

Bei gesteigerter Expression von Hrk konkurrieren die BH3-Domänen der Proteine Bak und Hrk um die Bindungsstelle an Mcl-1, wobei ein Gleichgewicht zwischen freiem Hrk mit an Mcl-1 gebundenem Bak und freiem und somit (auto-)aktivierbarem und Apoptose einleitendem Bak mit an Mcl-1 gebundenem Hrk existiert (s. Abb. 6.3). Bei Erhöhung

der Konzentration von Hrk wird das Gleichgewicht zu Gunsten von freiem Bak mit an Mcl-1 gebundenem Hrk verschoben. Die ektope Expression von Hrk mittels



Abb. 6.3: Gleichgewicht zwischen an Mcl-1 gebundenem und ungebundenem Bak. Hrk konkurriert mit Bak um die Bindungsstelle an Mcl-1. Bei Bindung von Mcl-1 durch Hrk wird Bak frei und ist (auto-)aktivierbar (doppelte Umrandung). Das Gleichgewicht wird durch Erhöhung der Konzentration von Hrk zu Gunsten von ungebundenem Bak beeinflusst.

eines viralen Vektors, wie er in dieser Arbeit genutzt wurde, stellt eine Situation dar, in der eine erhöhte intrazelluläre Konzentration an Hrk vorliegt. Beachtlich ist, dass selbst bei dieser erhöhten Hrk-Konzentration ungebundenes Bak in zu geringer Konzentration vorliegt, um Apoptose zu initiieren. Unter Bedingungen wie im Tumorzellverband *in vivo* ist daher eine Aktivierung von Bak mittels Sequestrierung der inhibitorischen Proteine allein durch Hrk kaum vorstellbar.

Über die obige, grundsätzliche Interpretation der Daten zur Hrk-induzierten Apoptose hinaus zeigen sich Besonderheiten der Ergebnisse: Erstens ist bei den kombiniert Bax-/Bak-profizienten HCT-Wt-Zellen nach *mcl-1*-Knockdown und ektopter Hrk-Expression eine leichte Erhöhung der Rate an Zellen mit Reduktion des $\Delta\Psi_m$ nachweisbar (s. Abb. 5.11). Dieser Erhöhung liegt möglicherweise eine auf Grund des Verlusts von Mcl-1 erniedrigte Schwelle der für die Aktivierung der Multidomänenproteine nötigen Konzentration von Hrk zu Grunde. Andererseits könnte das Phänomen bedeuten, dass die Aktivierung von Bak, die nach Knockdown von *mcl-1* in HCT-Wt-Zellen zusätzlich möglich ist, schneller abläuft oder ein stärkeres Apoptosesignal darstellt als die alleinige Aktivierung von Bax. Für die Aktivierung von Bak als schnelleres oder stärkeres Apoptosesignal spricht die Tatsache, dass beim Vergleich der Raten an hypodiploiden HCT-*bax*^{-/-}-Zellen und HCT-*bax*^{-/-}-Zellen mit reduziertem $\Delta\Psi_m$ bei Knockdown von *mcl-1* und Hrk-Expression eine gleichbleibende Rate von etwa 30% auffällt (s. Abb. 5.10 und Abb. 5.11). Dies steht im Gegensatz zu den Bak-defizienten HCT-*bak*^{KD}-Zellen, bei denen sich zum selben Messzeitpunkt noch ein Unterschied zwischen den Raten an hypodiploiden Zellen und Zellen mit reduziertem $\Delta\Psi_m$ zeigt (s. Abb. 5.10 und Abb. 5.11). Die Reduktion des $\Delta\Psi_m$ tritt früher auf als die DNA-Fragmentierung, welche der Exekution der Apoptose zuzuordnen ist.

Wenn beide Merkmale in gleichen Anteilen innerhalb derselben Zellpopulation nachgewiesen werden, spricht das für eine bereits vollzogene Apoptoseexekution in allen Zellen, in denen eine Apoptoseinitiation erfolgt ist. Diese Situation ist hier möglicherweise bei den HCT-*bax*^{-/-}-Zellen bereits erreicht, bei den HCT-*bak*^{KD}-Zellen dagegen noch nicht.

Dass zu diesem Zeitpunkt nur bei ca. 30% der HCT-*bax*^{-/-}-Zellen Apoptose nachgewiesen wird, ist am ehesten durch eine Transfektionseffizienz <100 % sowohl der Transfektion mit Ad-Hrk als auch der Transfektion mit siRNA zu erklären (vgl. Abb. 5.10). Auf Grund dieser begrenzten Effizienz der Transfektion mit siRNA gegen *mcl-1* ist der Anteil an HCT-*bax*^{-/-}-Zellen mit durch Hrk aktivierbarem Multidomänenprotein (hier: Bak) ebenfalls begrenzt. Die Rate an hypodiploiden Zellen ist allerdings ebenso hoch wie bei den HCT-*bak*^{KD}-Zellen, in denen durch Hrk aktivierbares Multidomänenprotein (hier: Bax) in >90% der Zellen vorliegt (<10% der HCT-Zellen weisen im Wildtyp eine homozygote Frameshift-Mutation für *bax* auf) (s. Abb. 5.10).¹⁵⁶ Dies spricht zusätzlich zu dem bereits Genannten für aktiviertes Bak als schnelleres oder stärkeres Apoptosesignal als aktiviertes Bax.

Die vermutete schnellere bzw. stärkere Aktivierung von Bak kann in der durch Knockdown von *mcl-1* verursachten Verringerung der Gesamtkonzentration an Bak inhibierenden Proteinen begründet sein. Möglicherweise weist sie jedoch auf eine generelle funktionelle Differenz zwischen Bax und Bak hin.

6.4 Bedeutung der Ergebnisse für die translationale Forschung

Ziel einer personalisierten antineoplastischen Therapie ist es, spezifisch an den durch Über- oder Inaktivierung zur Tumorigenese bzw. Therapieresistenz führenden zellulären Signalwegen der einzelnen Neoplasien anzugreifen. Einen vielversprechenden Angriffspunkt bietet die Bcl-2-Proteinfamilie und insbesondere die proapoptotische Gruppe der BH3-only-Proteine. Nach Analyse des Genoms der einzelnen Neoplasie und der jeweiligen Expressionsmuster der BH3-only-Proteine sollen auf Grund von Genmutation oder epigenetischer Geninaktivierung in ihrer Expression supprimierte BH3-only-Proteine durch neuartige, spezifische Tumortheraeutika substituiert werden. Dadurch könnten gegenüber der traditionellen zytostatischen Therapie resistente neoplastische Zellen wieder der Apoptose und damit Neoplasien der Remission zugeführt werden.¹ Entsprechend dieser Vorstellung wurde hier Hrk in Zellen der Colocarzinom-Zelllinie HCT-116 exprimiert und dadurch Apoptose induziert: Das Gen

harakiri ist in etwa einem Viertel der colorectalen Adenocarcinome um den Transkriptionsstartpunkt hypermethyliert, im Gegensatz zu colorectalen Adenomen.¹³⁶ Vermutlich besteht also in Zellen des Colocarcinoms ein Selektionsdruck hin zur Genhypermethylierung und damit zur Unterdrückung der Expression von *hrk*. Es ist anzunehmen, dass die erniedrigte Expression des proapoptotischen Proteins Hrk das Tumorüberleben fördert.^{136, 139, 147} Dies bedeutet wiederum, dass die Reexpression oder pharmakologische Substitution von Hrk ein denkbarer therapeutischer Ansatz bei Patienten mit colorectalen Carcinomen ist. Mit den hier beschriebenen Daten kann Hrk als Protein eingeordnet werden, das für eine Substitution durch ein Pharmakon wie ABT-263 in Frage kommt. Hrk und ABT-263 besitzen ein ähnliches Verhalten in Bezug auf die Aktivierung nicht nur von Bax, sondern auch Bak: Auch durch ABT-263 wird insbesondere Bcl-x_L suffizient, hingegen Mcl-1 nur insuffizient inhibiert, sodass Bax-vermittelt Apoptose initiiert wird, Bak-vermittelt hingegen nicht (s. Kap. 3.3.6).

Problematisch wäre eine in der Substitution von Hrk bestehende Therapie entsprechend den Erkenntnissen aus dieser Arbeit allerdings in Neoplasien, in denen die Expression des Proteins Bax durch Mutationen oder epigenetische Phänomene unterdrückt ist. Dies gilt beispielsweise für Colocarcinom-Zellen des Mikrosatelliten-Mutator-Phänotyps, der mit dem hereditären nichtpolypösen Colocarcinom-Syndrom (HNPCC) assoziiert ist und auf Grund von Defekten in der DNA-Mismatch-Reparatur zu Frameshift-Mutationen führt.^{164, 165} Für das *bax*-Gen wurden solche Frameshift-Mutationen in mehr als 50% der HNPCC-assoziierten Colocarcinome gefunden.¹⁶⁴ In den hier verwandten HCT-116-Wildtyp-Zellen selbst konnte gezeigt werden, dass die Expression von Bax auf Grund von Frameshift-Mutationen erniedrigt ist.¹⁶⁵ Dabei sind mehr als 90% der Zellen heterozygot – mit einem intakten und einem mutierten *bax*-Allel.¹⁵⁶ Die Expression eines intakten *bax*-Allels ist hier immer noch ausreichend für die Hrk-induzierte Apoptose. In Tumorzellen mit homozygoter Mutation von *bax* allerdings fehlt das Protein Bax, sodass sie resistent gegenüber der Reexpression und daher wahrscheinlich auch der Substitution von Hrk sind.

Doch auch in nicht den Mikrosatelliten-Mutator-Phänotyp aufweisenden Colocarcinomen wird in vielen Fällen eine eingeschränkte Bax-Expression vorgefunden.¹⁶⁶ Interessanterweise sind bei Patienten mit Colocarcinom und singulärer R0-resezierter Lebermetastase Mutationen im *bax*-Gen mit einer schlechten Prognose assoziiert.¹⁶⁶ Auch eine verringerte *bax*-Expression selbst, unabhängig vom

Nachweis einer Genmutation, bedeutet eine schlechtere Prognose der Patienten mit Colorectalem Carcinom.¹⁶⁷

In einer weiteren Tumorentität des Gastrointestinaltrakts, dem Magencarcinom, wurde in 17% der Tumoren eine Hypermethylierung des Transkriptionsstartpunktes des *hrk*-Gens gefunden.¹³⁶ Auch diese Tumorentität weist in vielen Fällen eine Unterdrückung der Bax-Expression auf, sowohl mit als auch ohne Mikrosatelliten-Instabilität.¹⁶⁸

Es stellen sich die Fragen: Wie passen eine erniedrigte Expression sowohl von *hrk* als auch von *bax* gleichzeitig in demselben Tumor oder derselben Tumorentität zusammen? Was bedeutet dies für die Therapie mit Hrk-substituierenden Pharmaka? Eine erniedrigte Expression von *hrk* bietet möglicherweise gerade in Zellen mit eingeschränkter Bax-Expression keinen Überlebensvorteil. Denn die Expression von Mcl-1 ist in malignen Zellen häufig gesteigert statt supprimiert und Bax-defiziente Zellen sind daher resistent gegenüber der proapoptotischen Wirkung von Hrk.¹⁶⁹ Folglich wäre in solchen Tumorzellen die Hrk-Expression vermutlich nicht eingeschränkt. Die in den genannten Studien gefundene Genhypermethylierung bzw. erniedrigte Expression von Hrk betrifft also möglicherweise lediglich Tumoren oder Tumoranteile mit erhaltener Expression von Bax. Modellhaft wäre vorstellbar, dass innerhalb einer entsprechenden Neoplasie in einem Teil der Zellen die Hrk-Expression unterdrückt ist, im anderen Teil dagegen die Expression von Proteinen wie Bax unterdrückt, welche die proapoptotische Funktion von Hrk bedingen.

In jedem Fall hätte eine Therapie ausschließlich mit Hrk substituierenden Pharmaka in derartigen Tumoren zur Folge, dass Zellen mit Expressionsverlust von Bax oder Überexpression von Mcl-1 selektiert würden. Es überlebten also möglicherweise eben die Tumorzellen, die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. Folglich erscheint die pharmakologische Substitution von Hrk als alleiniger therapeutischer Ansatz generell nicht zielführend.

Entsprechend diesen Überlegungen konnte gezeigt werden, dass mit murinen B-Zell-Lymphomzellen transplantierte Mäuse unter Behandlung mit dem Hrk funktionell substituierenden ABT-737 eine deutlich schlechtere Prognose haben, wenn Mcl-1 in diesen Lymphomen überexprimiert ist.¹⁴⁹ Eine BH3-mimetische Therapie sollte daher neben den vorwiegend Bax hemmenden Bcl-2-Proteinen auch Mcl-1 als Hauptinhibitor von Bak angreifen. Dies wäre beispielsweise der Fall bei einer Therapie mit Obatoclax: Obatoclax inhibiert im Gegensatz zu ABT-737/-263 neben Bcl-2, Bcl-x_L und Bcl-w auch Mcl-1.^{152, 153} Es zerstört die Bindung zwischen Mcl-1 und Bak, wodurch Bak aktiviert

wird.¹⁵³ Dieses oder funktionell ähnliche Pharmaka bieten daher die Hoffnung, auch Tumoren mit eingeschränkter Expression von Bax adäquat behandeln zu können. Neben einer Monotherapie könnten zur Überwindung von Resistenzen, die durch erniedrigte Expression von Bax bedingt sind, auch Kombinationstherapien eingesetzt werden. In einer gegenüber ABT-737 resistenten Zelllinie eines oralen Plattenepithelcarcinoms wurde mittels kombinierter Behandlung mit ABT-737 und Obatoclox Apoptose ermöglicht.¹⁵³ Die kombinierte Behandlung hatte hierbei nicht nur eine deutliche stärkere apoptotische Wirkung als die Monotherapie mit ABT-737, sondern auch als die Monotherapie mit Obatoclox.¹⁵³ Somit kann sich für eine Therapie mit einem Hrk-substituierendem Pharmakon durchaus ein therapeutischer Nutzen ergeben. Allerdings sollte es nicht als Monotherapeutikum eingesetzt werden, sondern nur als Kombinationstherapie mit Substanzen, die entweder selbst Apoptose in Bax-defizienten Zellen auslösen oder diese Zellen durch Hemmung von Mcl-1 sensibilisieren.

Interessanterweise hat das Protein Mcl-1 auch über die hier diskutierte, direkt an der Bcl-2-Proteinfamilie angreifende Therapie hinaus eine Bedeutung als Resistenzfaktor. Wie oben beschrieben führt die Bindung von Liganden wie TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) an Todesrezeptoren auf Typ II-Zellen nur über Spaltung von Bid zu tBid und MOMP zur Apoptose (s. Kap. 3.3.2.3).^{27, 37, 39} Bax-defiziente Zellen sind auch gegenüber einem solchen Rezeptor-vermittelten Apoptosesignal resistent – und die Resistenz dieser Zellen ist auch hier begründet durch Mcl-1.³⁹

Als Fazit lässt sich feststellen, dass eine pharmakologische Substitution allein der Funktion von Hrk wahrscheinlich nicht ausreicht für eine effektive antineoplastische Therapie, da sie auf Grund fehlender Hemmung von Mcl-1 nicht gegen Bax-defiziente Tumorzellen wirksam ist. Bei einer BH3-mimetischen Tumorthherapie muss immer zumindest ein Wirkstoff eine suffiziente Hemmung von Mcl-1 bewirken, um auch in Zellen mit verringerter Expression von Bax Apoptose auslösen zu können. Die Entwicklung neuer Pharmaka mit BH3-mimetischer Wirkung sollte sich also auf Substanzen fokussieren, die nicht nur an den Bax-Inhibitoren wie Bcl-2, Bcl-w und Bcl-x_L angreifen, sondern insbesondere am Hauptinhibitor von Bak: an Mcl-1.

6.5 Ausblick

Weiterführende Erarbeitung zellbiologischer Grundlagen

Vor dem Einsatz der hier gewonnenen Erkenntnisse bei klinischen Studien ist eine weitergehende Untersuchung der Zusammenhänge im Rahmen von Zellkulturen wünschenswert. Hierbei wären Analysen zum Bindungsverhalten von Bak und antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen vor und nach ektopter Expression von Hrk sowie entsprechende Analysen zum Homologen Bax zielführend, um die Ergebnisse mit Hilfe von Mechanismen auf Ebene der Protein-Protein-Interaktionen im Detail zu erklären.

Wenngleich Mcl-1 der entscheidende Faktor für die Resistenz Bak-profizienter und Bax-defizienter Zellen gegenüber Hrk-induzierter Apoptose zu sein scheint, sollte in diesem Zusammenhang zusätzlich eine Bedeutung der anderen antiapoptotischen Bcl-2-Proteine überprüft werden. Hier wären Analysen zum Bindungsverhalten und Nachweis von Apoptose nach ektopter Expression von Hrk bei Knockdown von Bcl-x_L, A1 oder gegebenenfalls auch der übrigen antiapoptotischen Proteine hilfreich.

Die in dieser Arbeit aufgestellte These, dass aktiviertes Bak ein schnelleres oder stärkeres Apoptosesignal bedeutet als aktiviertes Bax, bedarf ebenfalls einer Überprüfung. Dazu könnten erstens Bak-profiziente und dabei Bax-defiziente sowie Bax-profiziente und dabei Bak-defiziente Zellen nach Knockdown von *mcl-1* in mehreren zeitlichen Intervallen hinsichtlich der Exekution einer Hrk-induzierten Apoptose verglichen werden. Zweitens sollte eine entsprechende Untersuchung statt Hrk mit Bim oder Puma als sowohl Bak als auch Bax aktivierenden BH3-only-Proteinen durchgeführt werden, um ohne Knockdown von *mcl-1* eine Bak-abhängige Apoptose in mehreren zeitlichen Intervallen zu beobachten. Dabei ließe sich im Vergleich ein möglicher Einfluss des Knockdowns von *mcl-1* auf die Vermutung, dass aktiviertes Bak ein schnelleres oder stärkeres Apoptosesignal sein könnte, nachweisen oder ausschließen.

Zuführung zu klinischer Anwendung

Die Auswahl einer Colonkarzinomzelllinie birgt selbstverständlich Limitationen in der Übertragbarkeit auf andere Zelllinien oder humane und nicht-humane Zellen *in vivo*. Die Korrelation von Teilen der hier vorliegenden Ergebnisse mit den oben angegebenen bereits veröffentlichten Daten lässt eine generellere Übertragbarkeit vermuten (s. Kap. 6.1 und 6.2). Eine Überprüfung vor allem der unzureichenden Entthemung

von Bak durch Hrk und die Bahnung des Apoptosesignals mittels Mcl-1-Inhibition in primären Zellen könnte diese Zusammenhänge weiter generalisieren als ein wichtiger Schritt in Richtung klinischer Anwendung.

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der hier gewonnenen Ergebnisse auf die klinische Tumorthherapie könnten ausgewählte neoplastische Zellen, in denen möglichst isoliert die Hrk-Expression verringert ist, dahingehend untersucht werden, ob sie sensibel gegenüber ABT-737 sind. Darüber hinaus könnten in einem weiteren Schritt humane Tumor-Xenograft-Mausmodelle von Tumoren mit verringerter Hrk-Expression ebenfalls einer solchen Behandlung unterzogen werden. Eben diese Tumoren, falls zunächst sensibel, könnten in einem weiteren Schritt hinsichtlich der Akquirierung von Resistenzen durch verringerte Bax-Expression überprüft werden.

Auch ein Vergleich zwischen Tumorzellen mit unterschiedlichen Expressionsmustern von Hrk, Mcl-1-bindenden BH3-only-Proteinen und Mcl-1 bezüglich des Ansprechens auf eine Therapie mit ABT-737, Obatoclax sowie eine Kombinationstherapie mit beiden Pharmaka wäre hier hilfreich.

Um möglicherweise spezifisch veränderte Expressionsmuster von Hrk in weiteren Entitäten von Neoplasien aufzudecken und so die primär für eine Behandlung mit entsprechenden spezifischen Tumorthapeutika in Frage kommenden Entitäten einzugrenzen, ließen sich mittels Real-Time-quantitativer Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) oder Immunhistochemie verschiedene Neoplasien miteinander und mit nichtmalignem Gewebe vergleichen. Außerdem wäre hier interessant zu untersuchen, ob niedrige Expressionslevel von Hrk vorwiegend in Zellen mit erhaltener Bax-Expression zu finden sind. Andersherum wäre interessant, ob in Tumorzellen mit fehlender Expression von Bax überhaupt eine Veränderung der Hrk-Expression auftritt. Diese Untersuchungen wären insbesondere hilfreich, um die pathologischen Veränderungen von Tumorzellen in definierte Muster von sich gegenseitig bedingenden Expressionsveränderungen innerhalb der Bcl-2-Proteinfamilie einzuteilen. Es wäre weitaus einfacher, spezifische Therapien nur für derartige sich wiederholende Muster zu finden als an die Expression jedes einzelnen dieser Proteine angepasste Therapien.

7 Literaturverzeichnis

1. Daniel, P.T. Molekulare Grundlagen der zielgerichteten Tumortherapie. *Der Onkologe* **13**, 8-19 (2007).
2. Sturm, I. et al. Loss of the tissue-specific proapoptotic BH3-only protein Nbk/Bik is a unifying feature of renal cell carcinoma. *Cell Death Differ* **13**, 619-27 (2006).
3. Zantl, N. et al. Frequent loss of expression of the pro-apoptotic protein Bim in renal cell carcinoma: evidence for contribution to apoptosis resistance. *Oncogene* **26**, 7038-48 (2007).
4. Galluzzi, L. et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ* **22**, 58-73 (2015).
5. Sun, L. & Wang, X. A new kind of cell suicide: mechanisms and functions of programmed necrosis. *Trends Biochem Sci* **39**, 587-93 (2014).
6. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57 (1972).
7. Thompson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-62 (1995).
8. Tait, S.W. & Green, D.R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 621-32 (2010).
9. Crawford, E.D. & Wells, J.A. Caspase substrates and cellular remodeling. *Annu Rev Biochem* **80**, 1055-87 (2011).
10. Chai, J. et al. Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding. *Cell* **107**, 399-407 (2001).
11. Muzio, M. et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* **85**, 817-27 (1996).
12. Hofmann, K., Bucher, P. & Tschopp, J. The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* **22**, 155-6 (1997).
13. Renatus, M., Stennicke, H.R., Scott, F.L., Liddington, R.C. & Salvesen, G.S. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14250-5 (2001).
14. Stennicke, H.R. et al. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* **274**, 8359-62 (1999).
15. Fernandes-Alnemri, T. et al. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7464-9 (1996).
16. Li, P. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-89 (1997).
17. Duckett, C.S. et al. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J* **15**, 2685-94 (1996).
18. Deveraux, Q.L. et al. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* **17**, 2215-23 (1998).
19. Suzuki, Y., Nakabayashi, Y. & Takahashi, R. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8662-7 (2001).
20. Scott, F.L. et al. XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *EMBO J* **24**, 645-55 (2005).
21. Deveraux, Q.L. et al. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* **18**, 5242-51 (1999).
22. Sun, X.M. et al. Caspase activation inhibits proteasome function during apoptosis. *Mol Cell* **14**, 81-93 (2004).
23. Srinivasula, S.M. et al. The Ced-3/interleukin 1beta converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32. *J Biol Chem* **271**, 27099-106 (1996).

24. Slee, E.A., Keogh, S.A. & Martin, S.J. Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release. *Cell Death Differ* **7**, 556-65 (2000).
25. Cheng, E.H. et al. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* **278**, 1966-8 (1997).
26. Cabal-Hierro, L. & Lazo, P.S. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal* **24**, 1297-305 (2012).
27. Li, J. & Yuan, J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* **27**, 6194-206 (2008).
28. Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. & Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501 (1998).
29. Szegezdi, E., Macdonald, D.C., Ni Chonghaile, T., Gupta, S. & Samali, A. Bcl-2 family on guard at the ER. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**, C941-53 (2009).
30. Youle, R.J. & Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 47-59 (2008).
31. Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. & Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**, 147-57 (1996).
32. Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. & Wang, X. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**, 405-13 (1997).
33. Malladi, S., Challa-Malladi, M., Fearnhead, H.O. & Bratton, S.B. The Apaf-1*procaspase-9 apoptosome complex functions as a proteolytic-based molecular timer. *EMBO J* **28**, 1916-25 (2009).
34. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42 (2000).
35. Suzuki, Y. et al. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* **8**, 613-21 (2001).
36. Bhola, P.D., Mattheyses, A.L. & Simon, S.M. Spatial and temporal dynamics of mitochondrial membrane permeability waves during apoptosis. *Biophys J* **97**, 2222-31 (2009).
37. Scaffidi, C. et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* **17**, 1675-87 (1998).
38. Gillissen, B. et al. Targeted therapy of the XIAP/proteasome pathway overcomes TRAIL-resistance in carcinoma by switching apoptosis signaling to a Bax/Bak-independent 'type I' mode. *Cell Death Dis* **4**, e643 (2013).
39. Gillissen, B. et al. Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-xL: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma. *J Cell Biol* **188**, 851-62 (2010).
40. Jost, P.J. et al. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* **460**, 1035-9 (2009).
41. Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C. & Croce, C.M. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* **226**, 1097-9 (1984).
42. Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. & Croce, C.M. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* **228**, 1440-3 (1985).
43. Vogler, M. BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. *Cell Death Differ* **19**, 67-74 (2012).
44. Boyd, J.M. et al. Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* **11**, 1921-8 (1995).
45. Chittenden, T. et al. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J* **14**, 5589-96 (1995).
46. Kvsanakul, M. et al. Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ* **15**, 1564-71 (2008).

47. Muchmore, S.W. et al. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**, 335-41 (1996).
48. Sattler, M. et al. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* **275**, 983-6 (1997).
49. Lee, E.F. et al. Conformational changes in Bcl-2 pro-survival proteins determine their capacity to bind ligands. *J Biol Chem* **284**, 30508-17 (2009).
50. George, N.M., Evans, J.J. & Luo, X. A three-helix homo-oligomerization domain containing BH3 and BH1 is responsible for the apoptotic activity of Bax. *Genes Dev* **21**, 1937-48 (2007).
51. Gavathiotis, E. et al. BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* **455**, 1076-81 (2008).
52. Karbowski, M., Norris, K.L., Cleland, M.M., Jeong, S.Y. & Youle, R.J. Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* **443**, 658-62 (2006).
53. Oltvai, Z.N., Millman, C.L. & Korsmeyer, S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-19 (1993).
54. Chittenden, T. et al. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* **374**, 733-6 (1995).
55. Hsu, S.Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M. & Hsueh, A.J. 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**, 12401-6 (1997).
56. Wei, M.C. et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**, 727-30 (2001).
57. Gillissen, B. et al. Mcl-1 determines the Bax dependency of Nbk/Bik-induced apoptosis. *J Cell Biol* **179**, 701-15 (2007).
58. Ke, F. et al. BCL-2 family member BOK is widely expressed but its loss has only minimal impact in mice. *Cell Death Differ* **19**, 915-25 (2012).
59. Kim, H. et al. Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* **36**, 487-99 (2009).
60. Griffiths, G.J. et al. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* **144**, 903-14 (1999).
61. Boise, L.H. et al. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* **74**, 597-608 (1993).
62. Gibson, L. et al. bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* **13**, 665-75 (1996).
63. Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P. & Craig, R.W. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3516-20 (1993).
64. Lin, E.Y., Orlofsky, A., Berger, M.S. & Prystowsky, M.B. Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol* **151**, 1979-88 (1993).
65. Willis, S.N. et al. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* **19**, 1294-305 (2005).
66. Simmons, M.J. et al. Bfl-1/A1 functions, similar to Mcl-1, as a selective tBid and Bak antagonist. *Oncogene* **27**, 1421-8 (2008).
67. Tanaka, S., Saito, K. & Reed, J.C. Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. Addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2 beta protein restores function as a regulator of cell survival. *J Biol Chem* **268**, 10920-6 (1993).
68. Lithgow, T., van Driel, R., Bertram, J.F. & Strasser, A. The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ* **5**, 411-7 (1994).
69. Hsu, Y.T., Wolter, K.G. & Youle, R.J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3668-72 (1997).

70. Edlich, F. et al. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* **145**, 104-16 (2011).
71. Wilson-Annan, J. et al. Proapoptotic BH3-only proteins trigger membrane integration of prosurvival Bcl-w and neutralize its activity. *J Cell Biol* **162**, 877-87 (2003).
72. Brien, G. et al. C-terminal residues regulate localization and function of the antiapoptotic protein Bfl-1. *J Biol Chem* **284**, 30257-63 (2009).
73. Yang, T., Kozopas, K.M. & Craig, R.W. The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J Cell Biol* **128**, 1173-84 (1995).
74. Germain, M. & Duronio, V. The N terminus of the anti-apoptotic BCL-2 homologue MCL-1 regulates its localization and function. *J Biol Chem* **282**, 32233-42 (2007).
75. Wang, K., Yin, X.M., Chao, D.T., Milliman, C.L. & Korsmeyer, S.J. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* **10**, 2859-69 (1996).
76. O'Connor, L. et al. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* **17**, 384-95 (1998).
77. Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* **7**, 673-82 (2001).
78. Puthalakath, H. et al. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* **293**, 1829-32 (2001).
79. Yang, E. et al. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* **80**, 285-91 (1995).
80. Oda, E. et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**, 1053-8 (2000).
81. Inohara, N., Ding, L., Chen, S. & Nunez, G. 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**, 1686-94 (1997).
82. Gustafsson, A.B. Bnip3 as a dual regulator of mitochondrial turnover and cell death in the myocardium. *Pediatr Cardiol* **32**, 267-74 (2011).
83. Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T. & Tang, D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* **18**, 571-80 (2011).
84. Deng, Y., Ren, X., Yang, L., Lin, Y. & Wu, X. A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell* **115**, 61-70 (2003).
85. Melino, G. et al. p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem* **279**, 8076-83 (2004).
86. Yu, J., Wang, Z., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. & Zhang, L. PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1931-6 (2003).
87. Fernandez, Y. et al. Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res* **65**, 6294-304 (2005).
88. Czabotar, P.E. et al. Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6217-22 (2007).
89. Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M. & Strasser, A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* **3**, 287-96 (1999).
90. Weber, A. et al. BimS-induced apoptosis requires mitochondrial localization but not interaction with anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *J Cell Biol* **177**, 625-36 (2007).
91. Schmelzle, T. et al. Functional role and oncogene-regulated expression of the BH3-only factor Bmf in mammary epithelial anoikis and morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3787-92 (2007).
92. Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. & Korsmeyer, S.J. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**, 619-28 (1996).
93. Hekman, M. et al. Reversible membrane interaction of BAD requires two C-terminal lipid binding domains in conjunction with 14-3-3 protein binding. *J Biol Chem* **281**, 17321-36 (2006).

94. Gillissen, B. et al. 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**, 3580-90 (2003).
95. Germain, M., Mathai, J.P. & Shore, G.C. BH-3-only BIK functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria. *J Biol Chem* **277**, 18053-60 (2002).
96. Chinnadurai, G., Vijayalingam, S. & Rashmi, R. BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene* **27 Suppl 1**, S20-9 (2009).
97. Willis, S.N. & Adams, J.M. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 617-25 (2005).
98. Chen, L. et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* **17**, 393-403 (2005).
99. Kuwana, T. et al. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* **17**, 525-35 (2005).
100. Certo, M. et al. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* **9**, 351-65 (2006).
101. Merino, D. et al. The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins. *J Cell Biol* **186**, 355-62 (2009).
102. Chen, M. et al. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem* **276**, 30724-8 (2001).
103. Nakano, K. & Vousden, K.H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**, 683-94 (2001).
104. Walensky, L.D. et al. A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX. *Mol Cell* **24**, 199-210 (2006).
105. Cartron, P.F. et al. 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**, 807-18 (2004).
106. Letai, A. et al. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**, 183-92 (2002).
107. Leber, B., Lin, J. & Andrews, D.W. Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis* **12**, 897-911 (2007).
108. Lovell, J.F. et al. Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* **135**, 1074-84 (2008).
109. Imaizumi, K. et al. Molecular cloning of a novel polypeptide, DP5, induced during programmed neuronal death. *J Biol Chem* **272**, 18842-8 (1997).
110. Coultas, L., Huang, D.C., Adams, J.M. & Strasser, A. Pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family members in vertebrate model organisms suitable for genetic experimentation. *Cell Death Differ* **9**, 1163-6 (2002).
111. Towers, E. et al. The proapoptotic dp5 gene is a direct target of the MLK-JNK-c-Jun pathway in sympathetic neurons. *Nucleic Acids Res* **37**, 3044-60 (2009).
112. Gurzov, E.N. et al. Signaling by IL-1beta+IFN-gamma and ER stress converge on DP5/Hrk activation: a novel mechanism for pancreatic beta-cell apoptosis. *Cell Death Differ* **16**, 1539-50 (2009).
113. Igoillo-Esteve, M. et al. Unveiling a common mechanism of apoptosis in beta-cells and neurons in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* **24**, 2274-86 (2015).
114. Jurisicova, A. et al. Maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons diminishes murine ovarian reserve via induction of Harakiri. *J Clin Invest* **117**, 3971-8 (2007).
115. Imaizumi, K. et al. The cell death-promoting gene DP5, which interacts with the BCL2 family, is induced during neuronal apoptosis following exposure to amyloid beta protein. *J Biol Chem* **274**, 7975-81 (1999).
116. Guan, Q.H., Pei, D.S., Xu, T.L. & Zhang, G.Y. Brain ischemia/reperfusion-induced expression of DP5 and its interaction with Bcl-2, thus freeing Bax from Bcl-2/Bax dimmers are mediated by c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *Neurosci Lett* **393**, 226-30 (2006).

117. Ma, C. et al. dp5/HRK is a c-Jun target gene and required for apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *J Biol Chem* **282**, 30901-9 (2007).
118. Sanz, C., Mellstrom, B., Link, W.A., Naranjo, J.R. & Fernandez-Luna, J.L. Interleukin 3-dependent activation of DREAM is involved in transcriptional silencing of the apoptotic Hrk gene in hematopoietic progenitor cells. *EMBO J* **20**, 2286-92 (2001).
119. Hershko, T. & Ginsberg, D. Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem* **279**, 8627-34 (2004).
120. Moore, F. et al. STAT1 is a master regulator of pancreatic {beta}-cell apoptosis and islet inflammation. *J Biol Chem* **286**, 929-41 (2011).
121. Sanz, C. et al. Specific and rapid induction of the proapoptotic protein Hrk after growth factor withdrawal in hematopoietic progenitor cells. *Blood* **95**, 2742-7 (2000).
122. Suvasini, R. & Somasundaram, K. Essential role of PI3-kinase pathway in p53-mediated transcription: Implications in cancer chemotherapy. *Oncogene* **29**, 3605-18 (2010).
123. Barthson, J. et al. Cytokines tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma induce pancreatic beta-cell apoptosis through STAT1-mediated Bim protein activation. *J Biol Chem* **286**, 39632-43 (2011).
124. Urnowey, S. et al. Temporal activation of anti- and pro-apoptotic factors in human gingival fibroblasts infected with the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*: potential role of bacterial proteases in host signalling. *BMC Microbiol* **6**, 26 (2006).
125. Rizvi, F., Heimann, T., Herrnreiter, A. & O'Brien, W.J. Mitochondrial dysfunction links ceramide activated HRK expression and cell death. *PLoS One* **6**, e18137 (2011).
126. Sanz, C., Horita, M. & Fernandez-Luna, J.L. Fas signaling and blockade of Bcr-Abl kinase induce apoptotic Hrk protein via DREAM inhibition in human leukemia cells. *Haematologica* **87**, 903-7 (2002).
127. Hao, H. et al. E2F-1- and E2Ftr-mediated apoptosis: the role of DREAM and HRK. *J Cell Mol Med* **16**, 605-15 (2012).
128. Barrera-Vilarmau, S., Obregon, P. & de Alba, E. Intrinsic order and disorder in the bcl-2 member harakiri: insights into its proapoptotic activity. *PLoS One* **6**, e21413 (2011).
129. Pinto, M., Perez, J.J. & Rubio-Martinez, J. Molecular dynamics study of peptide segments of the BH3 domain of the proapoptotic proteins Bak, Bax, Bid and Hrk bound to the Bcl-xL and Bcl-2 proteins. *J Comput Aided Mol Des* **18**, 13-22 (2004).
130. Sborgi, L., Barrera-Vilarmau, S., Obregon, P. & de Alba, E. Characterization of a novel interaction between Bcl-2 members Diva and Harakiri. *PLoS One* **5**, e15575 (2010).
131. Bernabeu, A., Guillen, J., Perez-Berna, A.J., Moreno, M.R. & Villalain, J. Structure of the C-terminal domain of the pro-apoptotic protein Hrk and its interaction with model membranes. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 1659-70 (2007).
132. Sunayama, J. et al. Physical and functional interaction between BH3-only protein Hrk and mitochondrial pore-forming protein p32. *Cell Death Differ* **11**, 771-81 (2004).
133. Imaizumi, K. et al. Critical role for DP5/Harakiri, a Bcl-2 homology domain 3-only Bcl-2 family member, in axotomy-induced neuronal cell death. *J Neurosci* **24**, 3721-5 (2004).
134. Harris, C.A. & Johnson, E.M., Jr. BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons. *J Biol Chem* **276**, 37754-60 (2001).
135. Kelly, G.L. & Strasser, A. The essential role of evasion from cell death in cancer. *Adv Cancer Res* **111**, 39-96 (2011).
136. Obata, T. et al. Identification of HRK as a target of epigenetic inactivation in colorectal and gastric cancer. *Clin Cancer Res* **9**, 6410-8 (2003).
137. Higuchi, T. et al. HRK inactivation associated with promoter methylation and LOH in prostate cancer. *Prostate* **68**, 105-13 (2008).
138. Nakamura, M. et al. Frequent HRK inactivation associated with low apoptotic index in secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol* **110**, 402-10 (2005).

139. Nakamura, M. et al. Defective expression of HRK is associated with promoter methylation in primary central nervous system lymphomas. *Oncology* **70**, 212-21 (2006).
140. Xu, M. et al. Synergistic silencing by promoter methylation and reduced AP-2alpha transactivation of the proapoptotic HRK gene confers apoptosis resistance and enhanced tumor growth. *Am J Pathol* **182**, 84-95 (2013).
141. Letai, A., Sorcinelli, M.D., Beard, C. & Korsmeyer, S.J. Antiapoptotic BCL-2 is required for maintenance of a model leukemia. *Cancer Cell* **6**, 241-9 (2004).
142. Hill, M.E. et al. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* **88**, 1046-51 (1996).
143. McDonnell, T.J. et al. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* **52**, 6940-4 (1992).
144. Campos, L. et al. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* **81**, 3091-6 (1993).
145. Fecker, L.F. et al. Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis. *J Invest Dermatol* **126**, 1366-71 (2006).
146. Sturm, I. et al. Analysis of p53/BAX/p16(ink4a/CDKN2) in esophageal squamous cell carcinoma: high BAX and p16(ink4a/CDKN2) identifies patients with good prognosis. *J Clin Oncol* **19**, 2272-81 (2001).
147. van Keimpema, M. et al. FOXP1 directly represses transcription of proapoptotic genes and cooperates with NF-kappaB to promote survival of human B cells. *Blood* **124**, 3431-40 (2014).
148. Oltersdorf, T. et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* **435**, 677-81 (2005).
149. van Delft, M.F. et al. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* **10**, 389-99 (2006).
150. Tse, C. et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* **68**, 3421-8 (2008).
151. Lessene, G., Czabotar, P.E. & Colman, P.M. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 989-1000 (2008).
152. Zhai, D., Jin, C., Satterthwait, A.C. & Reed, J.C. Comparison of chemical inhibitors of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cell Death Differ* **13**, 1419-21 (2006).
153. Nguyen, M. et al. Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19512-7 (2007).
154. Gao, P. et al. The Bcl-2 homology domain 3 mimetic gossypol induces both Beclin 1-dependent and Beclin 1-independent cytoprotective autophagy in cancer cells. *J Biol Chem* **285**, 25570-81 (2010).
155. Brattain, M.G., Fine, W.D., Khaled, F.M., Thompson, J. & Brattain, D.E. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res* **41**, 1751-6 (1981).
156. Zhang, L., Yu, J., Park, B.H., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* **290**, 989-92 (2000).
157. Subramanian, T. & Chinnadurai, G. Pro-apoptotic activity of transiently expressed BCL-2 occurs independent of BAX and BAK. *J Cell Biochem* **89**, 1102-14 (2003).
158. Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74 (1977).
159. Herkner, H. & Müllner, M. in *Erfolgreich wissenschaftlich arbeiten in der Klinik*, S. 79-85 (Springer Verlag, Wien, 3. Auflage 2011).
160. Gossen, M. & Bujard, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5547-51 (1992).
161. Brand, K., Klocke, R., Possling, A., Paul, D. & Strauss, M. Induction of apoptosis and G2/M arrest by infection with replication-deficient adenovirus at high multiplicity of infection. *Gene Ther* **6**, 1054-63 (1999).

162. Hemmati, P.G. et al. Bak functionally complements for loss of Bax during p14ARF-induced mitochondrial apoptosis in human cancer cells. *Oncogene* **25**, 6582-94 (2006).
163. Gallia, G.L. & Khalili, K. Evaluation of an autoregulatory tetracycline regulated system. *Oncogene* **16**, 1879-84 (1998).
164. Yagi, O.K. et al. Proapoptotic gene BAX is frequently mutated in hereditary nonpolyposis colorectal cancers but not in adenomas. *Gastroenterology* **114**, 268-74 (1998).
165. Rampino, N. et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* **275**, 967-9 (1997).
166. Sturm, I. et al. Analysis of the p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *J Clin Oncol* **17**, 1364-74 (1999).
167. Grabowski, P. et al. Analysis of neuroendocrine differentiation and the p53/BAX pathway in UICC stage III colorectal carcinoma identifies patients with good prognosis. *Int J Colorectal Dis* **21**, 221-30 (2006).
168. Mrozek, A. et al. Combined p53/Bax mutation results in extremely poor prognosis in gastric carcinoma with low microsatellite instability. *Cell Death Differ* **10**, 461-7 (2003).
169. Akgul, C. Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer. *Cell Mol Life Sci* **66**, 1326-36 (2009).

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nicolas Terliesner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Die Funktion der Proteine Bax und Bak in der Initiation von Apoptose durch das BH3-only-Protein Harakiri‘ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE – www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Ich möchte die Gelegenheit nutzen, mich bei allen Personen und Institutionen zu bedanken, die mir durch ihre Unterstützung diese Arbeit ermöglicht haben.

Peter Daniel gilt mein herzlicher Dank für seine Ideen zum Thema dieser Arbeit, die Möglichkeit, die Arbeit in seinem Labor durchzuführen, seine wohlwollende und hilfreiche Betreuung und die Ratschläge für meine Laufbahn in der Medizin.

Bernd Gillissen möchte ich ebenfalls für die kompetente theoretische und praktische Betreuung meiner Arbeit danken und dafür, dass er sich nie beirren ließ, mir weiter in seiner ruhigen Art seine Erfahrung zur Verfügung zu stellen.

Anja Müller, Anja und Antje Richter, Daniel Heinze, Georg Künze, Heiner Zimmermann, Martin Singer, Thomas Pretzsch und Tim Overkamp danke ich für die vielen praktischen Hilfen, ohne die ich dies nicht geschafft hätte.

Der gesamten Arbeitsgruppe und ihren ehemaligen Mitgliedern, insbesondere auch Philipp Hemmati, Ana Milojkovic, Anna Michalak, Annika Mürer, Cindrilla Chumduri, Hyunmi Ryu, Jana Wendt und Li Min Liu gebührt mein Dank für die Ratschläge, die entspannte und kooperative Arbeitsatmosphäre und die tolle Zeit, die wir abseits von Viren und Zellkulturen miteinander verbracht haben.

Der Berliner Krebsgesellschaft e.V. danke ich herzlich für das Promotionsstipendium, der Konrad-Adenauer-Stiftung e.V. ebenso für die Förderung meines Studiums. Diese beiden Stipendien haben mir die Zeit geschenkt, in praktischer und theoretischer Hinsicht die Arbeit fertig stellen zu können.

Meiner kleinen, meiner großen Familie und meinen Freunden bin ich sehr dankbar dafür, dass sie mich überhaupt in die Lage versetzt haben, diese Arbeit schreiben zu können und dass sie mir immer die größtmögliche Unterstützung und Wertschätzung geschenkt haben.