

Aus dem
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC)
Berlin-Buch
AG Klinische und Molekulare Onkologie

und
aus dem

Experimental and Clinical Research Center
(ECRC)
der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Funktionelle Charakterisierung des
p14^{ARF}-Tumorsuppressorsignalwegs**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Annika Mürer

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. P. T. Daniel
2. Priv.-Doz. Dr. med. A. Egle
3. Priv.-Doz. Dr. F. Eßmann

Datum der Promotion: 07.09.2012

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	6
2.1 Die Apoptosesignalwege.....	7
2.2 Der p14 ^{ARF} -Tumorsuppressorsignalweg	11
2.2 Die Rolle von p53 in der Apoptose	13
3. Ziele der Arbeit	14
4. Methodik	15
4.1 Zellkulturen	15
4.2 Adenovirale Vektoren.....	15
4.3 Apoptosemessung	16
4.4 Messung des mitochondrialen Membranpotentials.....	16
4.5 Messung der N-terminalen Konformationsänderung von Bax und Bak.....	17
4.6 Fluoreszenzmikroskopie	17
4.7 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot Analyse.....	17
4.8 Transfektion von Zellen.....	18
4.9 Quantitative Polymerasekettenreaktion (Real-time PCR)	18
5. Ergebnisse	19
5.1 Das pro-apoptotische BH3-only-Protein Puma und der Zellzyklusregulator p21 ^{Cip1/WAF-1} spielen eine zentrale Rolle bei der p14 ^{ARF} -vermittelten, mitochondrialen Apoptose	19
5.2 In p53-defizienten Tumorzellen vermittelt der Tumorsuppressor p14 ^{ARF} eine Hemmung von Mcl-1 und eine Bak-abhängige Apoptose	22
5.3 In Bax-defizienten Tumorzellen sensibilisiert die Hemmung von Mcl-1 und Bcl-x _L für Apoptose durch den Todesliganden TRAIL.....	28
6. Diskussion	32
6.1 Die p53-abhängige, p14 ^{ARF} -vermittelte Apoptose	32
6.2 Die p53-unabhängige, p14 ^{ARF} -vermittelte Apoptose	33
6.3 Die Rolle der anti-apoptotischen Proteine Mcl-1 und Bcl-x _L in der TRAIL-vermittelten Apoptose sowie in der p14 ^{ARF} -vermittelten Apoptose	35
6.4 Ausblick	37

7. Abkürzungsverzeichnis	39
8. Literatur.....	41
9. Anteilserklärung	46
10. Ausgewählte Publikationen	48
10.1 Druckexemplare der ausgewählten Publikationen.....	49
11. Lebenslauf	52
12. Komplette Publikationsliste.....	53
12.1 Kongressbeiträge.....	54
12.2 Auszeichnungen und Stipendien.....	54
13. Eidesstattliche Erklärung.....	55
14. Danksagung.....	56

1. Zusammenfassung

Das Tumorsuppressorprotein p14^{ARF} kann Apoptose sowohl über einen p53-abhängigen, als auch über einen p53-unabhängigen, mitochondrialen Signalweg auslösen. Ziel dieser Arbeit war es daher, diese beiden Signalwege in humanen Tumorzelllinienmodellen miteinander zu vergleichen und auf funktioneller Ebene zu dissezieren. Hierfür wurden zunächst systematisch die pro- und anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Genfamilie, die maßgeblich an der Aktivierung der mitochondrialen Apoptose beteiligt sind, sowohl in einem p53-profizienten Zellen, als auch in einem p53-defizienten Zellen hinsichtlich ihrer Expression und ihrer Funktionen untersucht.

Nach Expression von p14^{ARF} kommt es in p53-profizienten Zellen zu einer transkriptionellen Hochregulation des Apoptose-fördernden BH3-only-Proteins Puma. Einhergehend damit stieg die Puma-Proteinkonzentration an. Des Weiteren folgte eine aktivierende Konformationsänderung des Apoptose-fördernden Bcl-2-Proteins Bax. Bax transloziert und senkt sich in die Mitochondrienmembran ein, was zur Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren, wie Cytochrom c, aus den Mitochondrien ins Zytosol und zur Auslösung von Apoptose führt. Die funktionelle Bedeutung des BH3-only-Proteins Puma zeigt sich ferner daran, dass Puma-defiziente Zellen vollständig resistent gegenüber der Apoptose-vermittelnden Wirkung von p14^{ARF} sind und die Rekonstitution von Puma diese Zelltodresistenz wirkungsvoll durchbrechen kann.

In p53-defizienten Zellen hingegen verläuft die Apoptose nach Expression von p14^{ARF} gänzlich unabhängig von Puma und anderen BH3-only-Proteinen, sowie von Bax ab. Stattdessen löst p14^{ARF} hier eine gezielte Herunterregulation der Apoptose-hemmenden Bcl-2-Familienmitglieder Mcl-1 und Bcl-x_L aus. Hierdurch entfällt deren hemmende Wirkung auf das Apoptose-fördernde Bax-Homolog Bak, welches durch N-terminale Konformationsänderung aktiviert wird und daraufhin Apoptose über einen mitochondrialen Signalweg einleitet. Eine Sensibilisierung für Bak-vermittelte Apoptose durch Herunterregulation von Mcl-1 konnte auch für den Zelltod, der durch den Todesliganden TRAIL (*tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand*) ausgelöst wird, gezeigt werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass, in Abhängigkeit vom p53-Status und der Expression der zentralen Apoptose-Effektoren Bax und Bak, Tumorzellen über sehr distinkte Apoptose-Signalwege auf zellulären Stress reagieren. Insbesondere konnten durch diese Untersuchungen wesentliche Unterschiede in der zellulären Reaktion auf den p14^{ARF} Tumorsuppressor, der ein wesentliches Element der Onkogen-induzierten Stressantwort darstellt, erarbeitet werden. Diese Unterschiede sind auch für die Empfindlichkeit von Krebszellen gegenüber neuen Tumorthérapeutika wie TRAIL von Bedeutung.

2. Einleitung

2.1 Die Apoptosesignalwege

Die Apoptose wurde erstmals 1972 durch Kerr et al. beschrieben und wird auch als programmierter Zelltod der Form Typ I bezeichnet (Kerr et al., 1972). Als Typ II-Zelltod wird die Autophagie oder die Autophagozytose bezeichnet. Kommt es zum Substratmangel bzw. Energiemangel der Zelle, kann diese durch lysosomalen Abbau den Energiestoffwechsel aufrechterhalten. Die Autophagie, die caspaseunabhängig abläuft, ist somit ein Anpassungsmechanismus der Zelle auf Stress und kann bei Zufuhr von Wachstumsfaktoren umgekehrt werden (Lum et al., 2005).

Als Typ III-Zelltod wird die Nekrose gezählt. Sie kann durch physikalische oder chemische Schädigung der Zelle ausgelöst werden. Die frühzeitige Permeabilisierung der Zellmembran führt zum Anschwellen des Zellkerns und der Organellen und zur Freisetzung von Zellinhalten, was - im Gegensatz zur Apoptose - eine Entzündungsreaktion hervorruft (Martinou & Green, 2001; Scholz et al., 2005; Zong et al., 2004).

Die Apoptose, oder auch programmierter Zelltod Typ I, spielt eine essentielle Rolle während der embryonalen Entwicklung multizellulärer Lebewesen. Morphologisch lassen sich apoptotische Zellen durch das Schrumpfen und Abrunden von Zellen, die Kondensation des Chromatins, den Zerfall des Zellkerns, die Abschnürung bläschenartiger Ausstülpungen der Membran (*membrane blebbing*), die Abschnürung von Vesikeln (*apoptotic bodies*) und durch die Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen charakterisieren. In adulten Organismen trägt die Entfernung gefährlicher oder maligne entarteter Zellen maßgeblich zur Verhinderung der Tumorentstehungen bei (Clarke, 1990).

Aus funktioneller Sicht werden zwei Apoptosesignalwege unterschieden. Dies sind der intrinsische und der extrinsische Apoptosesignalweg (Abbildung 1).

Der extrinsische Apoptosesignalweg wird durch die Aktivierung von Todesrezeptoren angeschaltet. Todesrezeptoren gehören zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNF-R) und binden an Todesliganden, wodurch deren Oligomerisierung induziert wird. Hierdurch wird die Bindung von Adaptermolekülen über die Todesdomäne (DD), wie beispielsweise FADD (*Fas associated death domain*), auf der intrazellulären Seite des Rezeptors ermöglicht. Die Bindung erlaubt die Rekrutierung der inaktiven Pro-Caspase-8, welche als sogenannte Initiatorcaspase fungiert und autokatalytisch aktiviert wird. Die Pro-Caspase-8 rekrutiert schließlich die nachgeschalteten Effektorcaspasen-3, -6 und -7 und leitet schließlich deren unumkehrbare, proteolytische Spaltung und Aktivierung sowie die Endphase des apoptotischen Zelltodes ein (Medema et al., 1997).

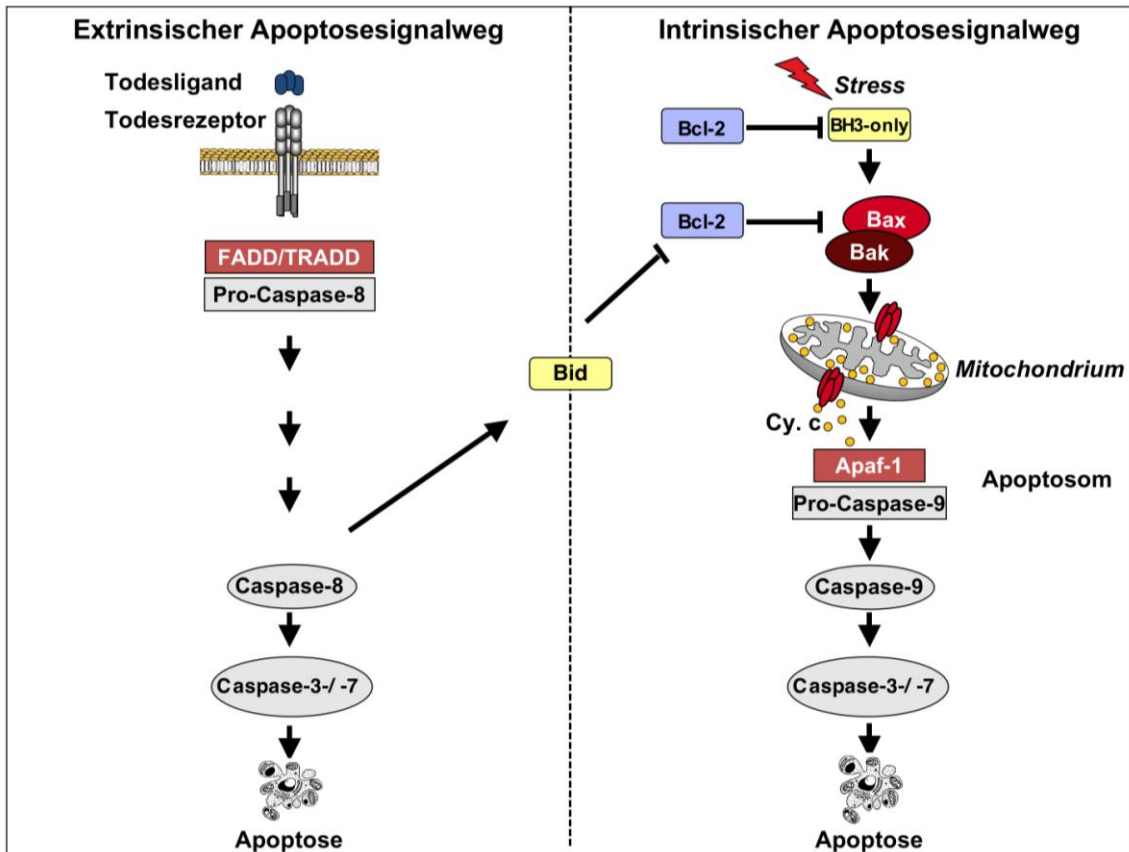


Abbildung 1: Extrinsischer und intrinsischer Apoptosesignalweg. Der extrinsische Signalweg (links) wird durch die Aktivierung von Todesrezeptoren angeschaltet. Das Adapterprotein FADD führt zur Rekrutierung und Spaltung der Pro-Caspase-8, die anschließend die Pro-Caspase-3 aktiviert und dadurch die Apoptose auslöst. Der intrinsische Signalweg (rechts) wird durch zellulären Stress, wie z.B. DNA-Schädigung oder Onkogenaktivierung ausgelöst und führt zur Aktivierung der pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder Bax und Bak. Diese oligomerisieren und binden in die äußere Mitochondrienmembran. Es kommt zur Porenbildung und zur Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren, wie beispielsweise Cytochrom c, und zur Bildung des Apoptosoms, bestehend aus der Pro-Caspase-9, Apaf-1, (d)ATP und Cytochrom c (Cy. c). Dies führt zur Aktivierung von Caspase-9 und zur Einleitung der Caspasekaskade und letztlich zur morphologischen Ausprägung der Apoptose. Beide Signalwege sind durch das pro-apoptotische Protein Bid verbunden, welches zu tBid gespalten wird und maßgeblich an der Aktivierung von Bax und Bak beteiligt ist (Daniel, 2000).

Der intrinsische Apoptosesignalweg wird auch als mitochondrialer Signalweg bezeichnet und wird durch die Proteine der Bcl-2-Familie reguliert (Abbildung 1) (Danial & Korsmeyer, 2004). Die Bcl-2-Familienmitglieder werden ihrer Funktion nach in anti- und pro-apoptotische Bcl-2-Proteine unterteilt (Abbildung 2) (Adams & Cory, 2007; Gillissen et al., 2003b; Youle & Strasser, 2008). Die anti-apoptotischen Familienmitglieder zeichnen sich durch eine Homologie in den Domänen BH1, BH2, BH3 bis BH4 aus. Die pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine besitzen die Domänen BH1, BH2 bis BH3, wohingegen die BH3-only-Proteine strukturelle Homologien nur innerhalb der BH3-Domäne aufweisen. Letztere sind essentielle Vermittler von Zelltods signalwegen (Adams & Cory, 2007; Gillissen et al., 2003b; Youle & Strasser, 2008). Die Vertreter der pro-apoptotischen BH3-only-Proteine sind Bim, Puma, Noxa, Nbk, Bad, Hrk, BNIP3 und Spike (Willis & Adams, 2005). Nach funktionellen Datenanalysen kann man Puma, Bim und tBid als starke Auslöser der Apoptose bezeichnen,

da sie alle Vertreter der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine antagonisieren können. Noxa, Nbk und Bad hingegen binden nur selektiv an bestimmte Bcl-2-Proteine und werden daher irreführend als schwache BH3-only-Proteine bezeichnet (Abbildung 3) (Chen et al., 2005b).

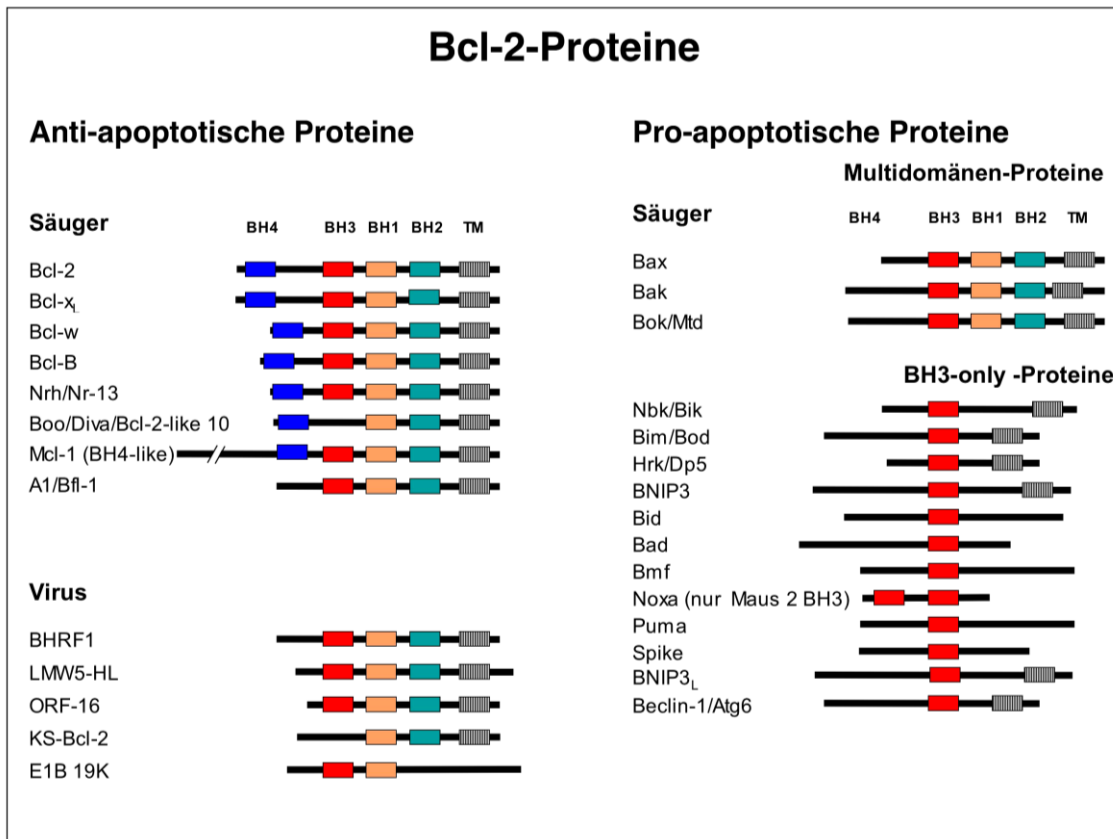


Abbildung 2: Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie. Die Bcl-2-Familie setzt sich aus pro- und anti-apoptotischen Proteinen zusammen. Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 und A1/Bfl-1 gehören den anti-apoptotischen Proteinen an und besitzen eine BH1-, BH2-, BH3- und eine BH4-Domäne. Die pro-apoptotischen Mitglieder Bax, Bak und Bok/Mtd besitzen homologe BH1-, BH2- und BH3-Domänen. Die BH3-only-Proteine hingegen weisen Homologien nur innerhalb der konservierten BH3-Domäne auf (Coults & Strasser, 2003).

Mitglieder der pro-apoptotischen Bcl-2-Familie, wie beispielsweise Bax und Bak, werden als Multidomänenproteine bezeichnet. Durch die Bindung der pro-apoptotischen Proteine an die anti-apoptotischen Proteine werden Bax und Bak aus der Bindung zu den anti-apoptotischen Proteinen verdrängt, freigegeben und lösen somit mitochondriale Apoptose aus. Ob die BH3-only-Proteine direkt an Bax bzw. Bak binden können und sie durch eine N-terminale Konformationsänderung aktivieren, wird kontrovers diskutiert (Willis & Adams, 2005).

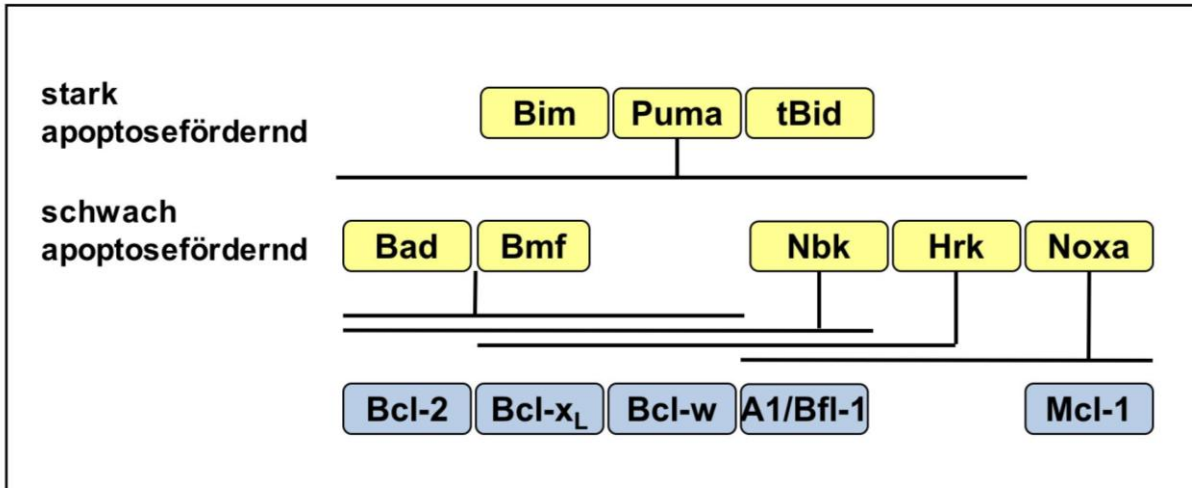


Abbildung 3: Die Hierarchie der pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine. Die BH3-only-Proteine (gelbe Kästchen) Bim, Puma und tBid werden als stark apoptosefördernd bezeichnet und können alle anti-apoptotischen Proteine (blaue Kästchen) antagonisieren. Nbk, Bmf und Bad sind schwach apoptosefördernd und können nur Bcl-x_L, Bcl-w und Bcl-2 antagonisieren, nicht aber Mcl-1. Noxa hingegen bindet nur an A1/Bfl-1 und Mcl-1 (Willis & Adams, 2005).

Es werden in der Literatur zwei Modelle zur Aktivierung von Bax und Bak beschrieben. Das Aktivator-Modell postuliert die Aktivierung von Bax und Bak direkt durch die Bindung an BH3-only-Proteine (Kuwana et al., 2005). Im Sensitizer-Modell wird die Hemmung anti-apoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder durch die Bindung der BH3-only-Proteine beschrieben (Abbildung 4) (Chen et al., 2005b).

Die Multidomänenproteine Bax und Bak üben einen direkten Einfluss auf die Mitochondrien aus. Bax transloziert nach einer N-terminalen Konformationsänderung vom Zytoplasma in die äußere Mitochondrienmembran und oligomerisiert dort. Dies könnte die Porenbildung und die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (*MOMP-Mitochondrial outer membrane permeabilization*) zur Folge haben (Green & Kroemer, 2004). MOMP führt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) und zur Freisetzung löslicher, apoptoseinduzierender Faktoren, wie beispielsweise Cytochrom c, aus dem intermembranären Spalt der Mitochondrien in das Zytoplasma. Das Apoptosom, ein Signalkomplex, der aus Cytochrom c, APAF-1, (d)ATP und der Procaspase-9 besteht, wird gebildet. Die Procaspase-9 wird anschließend autokatalytisch zur biologisch aktiven Caspase-9 gespalten (Srinivasula et al., 1998) und aktiviert die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 durch limitierte Proteolyse (Nicholson, 1999). Letztlich kommt es zum apoptotischen Zelltod.

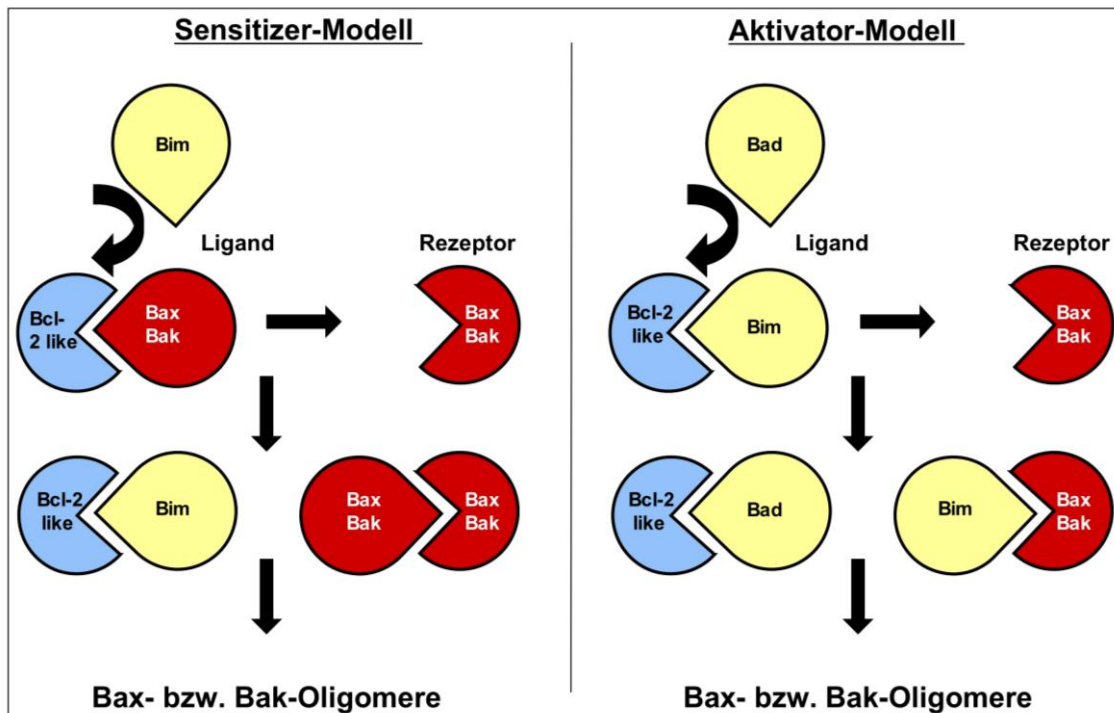


Abbildung 4: Sensitizer-Modell versus Aktivator-Modell. Die pro-apoptotischen Proteine, wie beispielsweise Bim, Bax bzw. Bak können aus ihrer Bindung zu anti-apoptotischen Bcl-2- Proteinen verdrängt werden. Infolge dessen kommt es zu einer Konformationsänderung von Bax und/oder Bak (Sensitizer-Modell, links). Die BH3-only-Proteine Bim, Bid und Puma können möglicherweise Apoptose durch direkte Aktivierung von Bax und/oder Bak auslösen (Aktivator-Modell, rechts) (Willis & Adams, 2005).

Das Bindeglied des extrinsischen und des intrinsischen Signalwegs ist das BH3-only-Protein Bid (*BH3-interacting domain death agonist*). Die aktive Form tBid (trunkiertes Bid) wird durch die Caspase-8 reguliert und führt nach Translokation zum Mitochondrium zur N-terminalen Konformationsänderung von Bax und Bak (Li et al., 1998).

2.2 Der p14^{ARF}-Tumorsuppressorsignalweg

Die Inaktivierung des p14^{ARF}-Signalwegs spielt bei der Entstehung und Entwicklung zahlreicher Tumore eine essentielle Rolle. Der p14^{ARF}-Tumorsuppressor (p19^{ARF} in der Maus) ist an der Vermittlung von Zellzyklus-Arrest, Zelltod und Seneszenz maßgeblich beteiligt, dennoch ist dessen Wirkmechanismus noch größtenteils unverstanden (Abbildung 5).

Der p14^{ARF}-Tumorsuppressor wird gemeinsam mit dem Zellzyklusregulator p16^{INK4a} am INK4A-Lokus kodiert (Duro et al., 1995; Mao et al., 1995; Quelle et al., 1995). Die Verwendung unterschiedlicher Exons 1 (bei p16^{INK4a} wird das Exon 1 α abgelesen und bei p14^{ARF}/p19^{ARF} das Exon 1 β) und einer Verschiebung des Leserasters in einen alternativen Leserahmen (ARF: **A**lternative **R**eadin**F**rame), führt zur Bildung zweier Proteine, die sich in ihrer Struktur und Funktion unterscheiden. Die Expression von p14^{ARF} wird durch Onkogene oder zellulären Stress, wie z.B. DNA-Schädigung, induziert (de Stanchina et al., 1998; Palmero et al., 1998; Zindy et al., 1998). Dies führt zum p14^{ARF}-vermittelten Abbau des p53-

Antagonisten Hdm-2 und zur physikalischen Stabilisierung des p53-Tumorsuppressors. Neben der Aktivierung p53-vermittelter Signale weisen zahlreiche Arbeiten darauf hin, dass p14^{ARF} Proliferation, Zelltod und Seneszenz auch über p53-unabhängige Signalwege kontrolliert (Eymin et al., 2003; Hemmati et al., 2002b; Sherr, 2006; Sherr et al., 2005). Der p14^{ARF}-Tumorsuppressor besitzt darüber hinaus die Fähigkeit, die ribosomale RNA-Synthese zu hemmen (Moss et al., 2007; Sugimoto et al., 2003).

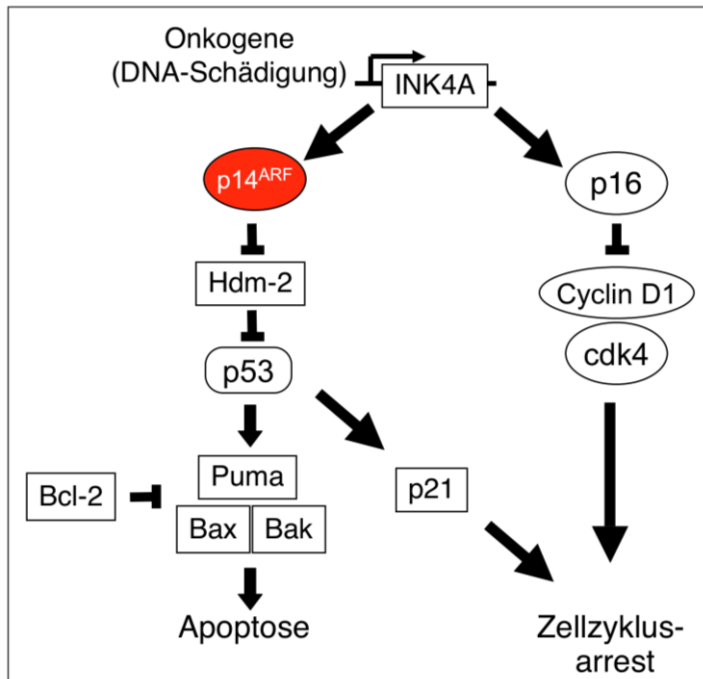


Abbildung 5: Der p14^{ARF}-Tumorsuppressorsignalweg. Der Tumorsuppressor p14^{ARF} wird gemeinsam mit dem Zellzyklusregulator p16INK4A durch den INK4A-Genlokus kodiert. P14^{ARF} führt zur Stabilisierung des p53-Tumorsuppressorproteins durch Antagonisierung von Hdm-2, einer E3-Ubiquitinligase. Der Transkriptionsfaktor p53 aktiviert pro-apoptotische Bcl-2-Proteine, wie beispielsweise das BH3-only-Protein Puma, durch transkriptionelle Hochregulation. Dies führt zur N-terminalen Konformationsänderung von Bax und Bak und zur Exekution der Apoptose. P16, als weiteres Genprodukt des INK4A-Lokus, führt zum Zellzyklus-Arrest (Daniel, 2000).

In der Literatur sind zahlreiche Bindungspartner von p14^{ARF} beschrieben. Das sind unter anderem Hdm-2 und die in der Transkriptionskontrolle involvierten Proteine, wie Dp1, c-myc, p63, Hif1 α und Foxm1b (Calabro et al., 2004; Datta et al., 2004; Datta et al., 2005; Eymin et al., 2001; Fatyol & Szalay, 2001; Kalinichenko et al., 2004; Korgaonkar et al., 2005). Ebenso bindet p14^{ARF} nukleäre Proteine, wie beispielsweise das virale Protein HIV-1Tat und Proteine, die der Chromosomenstabilität dienen, wie beispielsweise die Topoisomerase 1, Tip60 und die WRN-Helikase, sowie die E3-Ubiquitinligasen Ubc9, Hdm-2 und ARF-BP1/Mule (Chen et al., 2005a; Eymin et al., 2006; Tago et al., 2005; Woods et al., 2004). Als wichtiger Interaktionspartner von p14^{ARF} wurde das nukleäre Protein Nucleophosmin (NPM-1/B23) identifiziert (Itahana et al., 2003). NPM-1 ist an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt, wie beispielsweise an der Genomstabilisierung, der Regulation des Zellzyklus und der Regulation des Zellwachstums, sowie am nukleären Proteintransport und

an mRNA-Polyadenylierungen (Grisendi et al., 2006; Palaniswamy et al., 2006). Durch die Bindung von p14^{ARF} an NPM-1 wird der Hin- und Hertransport von NPM-1 zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma blockiert (Bertwistle et al., 2004). NPM-1 konkurriert zudem mit der E3-Ligase Hdm-2 um die ARF-Bindung und somit um die Stabilisierung von p53 (Brady et al., 2004). NPM-1 besitzt jedoch ebenfalls eine apoptosefördernde Wirkung, da es nach einem apoptotischen Stimulus, wie der Staurosporinbehandlung, vom Nukleus zum Zytoplasma transloziert. Es bindet Bax und p53 und löst somit die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien aus und ist daher als Bindungspartner von p14^{ARF} in der p14^{ARF}-vermittelten Apoptose durchaus interessant (Kerr et al., 2007). P14^{ARF} reguliert NPM-1 durch eine sogenannte negative Rückkoppelung, welche zu einer Hemmung der ribosomalen RNA-Synthese führt (Itahana et al., 2003).

Der Tumorsuppressor p14^{ARF} ist darüber hinaus in der Lage, Bindungspartner zu ubiquitinieren, zu sumoylieren und zu degradieren (Haindl et al., 2008; Kuo et al., 2008; Tago et al., 2005). Der Mechanismus, durch welchen p14^{ARF} die Aktivität seiner Bindungspartner beeinflusst, ist jedoch noch unverstanden (Lowe & Sherr, 2003). Bekannt ist jedoch, dass p14^{ARF} die Stabilität seiner Bindungspartner verändert. Dies bewirkt einerseits den Ubiquitin-abhängigen Abbau der Bindungspartner über das Proteasom, jedoch sind andererseits Ubiquitin-unabhängige Abbauewege beschrieben, wie beispielsweise für den Abbau von HIV-1Tat und CtBP2 (Paliwal et al., 2006).

2.2 Die Rolle von p53 in der Apoptose

Der Transkriptionsfaktor p53 wird durch DNA-Schäden in der Zelle aktiviert. Dies können unter anderem DNA-Doppelstrangbrüche, die durch Strahlung oder Chemotherapie verursacht werden, sein (Levine, 1997). P53 dient als Transkriptionsfaktor für zahlreiche Gene, wie p21^{Cip1/WAF-1}, Bax, Puma, Noxa, 14-3-3, Gadd45, IGF-Bp3 und PIG (Kannan et al., 2001a; Kannan et al., 2001b; Nakano & Vousden, 2001; Oda et al., 2000), kann jedoch auch die Expression einiger Gene hemmen (Taylor & Stark, 2001). Bedeutend für die Tumorthherapie ist, dass p53 häufig in Tumoren inaktiv ist. 90 % der p53-Mutationen hemmen die DNA-Bindungsdomäne von p53 (Levine, 1997). Somit ist bei der Behandlung der Tumorerkrankung im Wesentlichen der p53-Status entscheidend für eine erfolgreiche Therapiemöglichkeit. Ist p53 im Tumor inaktiv, müssen p53-unabhängige Mechanismen für die Vermittlung der Apoptose und somit für die Behandlung des Tumors stimuliert werden. Der Tumorsuppressor p14^{ARF} kann unabhängig vom p53-Status Apoptose auslösen und ist daher aus prognostischer Sicht für die Tumorthherapie interessant (Sherr, 2006; Sherr et al., 2005). Die Mechanismen einer p53-abhängigen oder p53-unabhängiger Apoptose sind aus klinischer Sicht noch vorwiegend unverstanden und sind daher besonders Gegenstand dieser vorliegenden Arbeit.

3. Ziele der Arbeit

Da die Inaktivierung des p14^{ARF}-Tumorsuppressorsignalwegs eine zentrale Rolle bei der Entstehung maligner Tumore sowie bei der Entwicklung von Apoptoseresistenzen spielt, ist es von klinisch-prognostischer Bedeutung, den Wirkmechanismus von p14^{ARF} detaillierter zu analysieren. Die Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die adenoviralvermittelte Expression von p14^{ARF} sowohl p53-abhängige, als auch p53-unabhängige mitochondriale Apoptose auslöst. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die zugrunde liegenden Mechanismen in der p53-abhängigen und in der p53-unabhängigen Apoptose in humanen Tumorzelllinien zu untersuchen und hinsichtlich ihrer Funktionen zu analysieren.

Ein wesentlicher Aspekt war hierbei, die p14^{ARF}-vermittelte Apoptose in humanen Tumorzellsystemen detailliert zu untersuchen und auf funktioneller Ebene zu dissezieren. Insbesondere sollte die Rolle der differentiellen Regulation von pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen nach adenoviraler Expression von p14^{ARF} untersucht werden.

Im Rahmen der Arbeit sollten folgende Aspekte beantwortet werden:

1. Untersuchung der Regulation der pro- und anti-apoptotischen BH3-only-Proteine nach der Expression von p14^{ARF} in p53-profizienten, humanen Tumorzelllinien. Hierzu sollen die pro- und anti-apoptotischen Proteine hinsichtlich ihrer Regulation der mRNA-Expression und hinsichtlich ihrer Protein-Expression untersucht werden und die Auslösung der Apoptose nach p14^{ARF}-Expression mit geeigneten Analysemethoden (durchflusszytometrische Messung der fragmentierten DNA, durchflusszytometrische Messung des Zusammenbruchs des Membranpotentials und die Untersuchung der N-terminalen Konformationsänderung von Bax und Bak) analysiert werden.
2. Untersuchung der Regulation der pro- und anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine nach der Expression von p14^{ARF} in p53-defizienten, humanen Tumorzelllinien. Hierzu soll verstärkt die Rolle der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine z.B. von Bcl-x_L oder Mcl-1 bei der Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges nach Expression von p14^{ARF} mittels geeigneter Apoptose-Analysemethoden (durchflusszytometrische Messung der fragmentierten DNA, durchflusszytometrische Messung des Zusammenbruchs des Membranpotentials die Untersuchung der N-terminalen Konformationsänderung von Bax und Bak) untersucht werden.
3. Beeinflussung der TRAIL-vermittelten Apoptose durch Herunterregulation der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine. Hierzu soll die Sensibilisierung für TRAIL-vermittelte Apoptose untersucht werden, wenn beispielsweise anti-apoptotische Bcl-2-Proteine wie Bcl-x_L oder Mcl-1 durch siRNA herunter reguliert werden.

4. Methodik

4.1 Zellkulturen

HCT116-Kolonkarzinomzellen, DU145-Prostatakarzinomzellen und SAOS-2-Osteosarkomzellen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) wurden in DMEM-Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 10 % fetalem Kälberserum (*fetal calf serum*: FCS), 100.000 U/l Penicillin und 0,1 g/l Streptomycin bei 37 °C mit 5 % CO₂ und bei 95 % Luftfeuchte kultiviert.

HCT116 Wild-Typ-Zellen und die isogenen Sublinien HCT116 Puma^{-/-}, HCT116 p21^{cdkn1-/-} und HCT116 Puma^{-/-}/HCT116 p21^{cdkn1-/-} sowie die isogenen Sublinien HCT116 Bax^{-/-} und HCT116 Bak *knock down* (kd) und HCT116 Bax^{-/-}/Bak *knock down* (kd) wurden von Dr. Bert Vogelstein, vom Johns Hopkins Cancer Center, aus Baltimore USA zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der retroviralen Kontrollzellen (HyTK-mock-transfiziert) und der Bax-re-exprimierenden Zellen (HyTK-Bax-transfiziert) erfolgte wie bei Gillissen et al. und von Haefen et al. beschrieben (Gillissen et al., 2003b; von Haefen et al., 2002). Des Weiteren erfolgte die Herstellung der Bak-GFP-Transfektanten und der Bax-GFP-Transfektanten wie publiziert (von Haefen et al., 2004).

4.2 Adenovirale Vektoren

Die Konstruktion des rekombinanten, replikationsinkompetenten Ad5-CMVp14^{ARF} (Ad-p14^{ARF}) erfolgte nach Hemmati et al. (Hemmati et al., 2002a). Die Herstellung der verwendeten Adenoviren sowie die Virus-Titerbestimmung wurden wie in Gillissen et al. beschrieben. Ein Kontrollvirus, das β -Galactosidase (Ad-lacZ) exprimiert, wurde auf die gleiche Weise hergestellt (Gillissen et al., 2003a).

Die Virusgewinnung bzw. Aufreinigung lässt sich kurz wie folgt beschreiben: HEK293-Zellen wurden mit Virus-Lysat in serumfreiem Medium für 1,5 h bei 37 °C mit 5 % CO₂ und bei 95 % Luftfeuchte inkubiert und danach mit Zugabe von Medium (20 % FCS) für 48 h bei 37 °C mit 5 % CO₂ und bei 95 % Luftfeuchte kultiviert. Die infizierten Zellen wurden gesammelt und durch mehrmaligem Einfrieren und Auftauen bei -20 °C aufgeschlossen. Die Virusaufreinigung erfolgte durch Ultrazentrifugation (Beckmann GmbH, München, Deutschland). Zunächst wurde ein Cäsiumchlorid-Gradient hergestellt. Eine Lösung aus 2,5 ml einer 1,25 g/cm³ CsCl-Lösung wurde mit 2,5 ml einer 1,5 g/cm³ CsCl-Lösung überschichtet und das Virus-Lysat hinzugefügt (3 ml) und bei 30000 g für 2 h zentrifugiert. Nach der Zentrifugation konnte eine Virusbande mittels einer Spritze aus dem Zentrifugenröhrchen isoliert werden (1 ml). Es wurde erneut ein Gradient erstellt. Hierfür wurde zunächst das Virus-Lysat (1 ml) mit 2 ml einer 1,35 g/cm³ CsCl-Lösung gemischt und erneut mit 3 ml einer 1,35 g/cm³ CsCl-Lösung und mit 3 ml einer 1,25 g/cm³ CsCl-Lösung unterschichtet. Anschließend erfolgte eine Trennung durch Zentrifugation bei 30000 g für 16

h. Die durch den Gradient entstandene Virusbande wurde erneut aus dem Zentrifugenröhrchen isoliert und das Virus-Lysat über eine NAP-25-Säule (Amersham Buchler, Braunschweig, Deutschland) aufgereinigt und mittels des Adenosuspensionspuffers (135 mM NaCl, 3 mM KCl, 1mM MgCl₂, 100 mM Tris/HCl, 10 % Glycerin) gewaschen. Letztlich erfolgte eine Bestimmung des Virus-Titers nach der Endpunktverdünnungsmethode. Hierfür wurden HEK293-Zellen in einer 24-Lochplatte bei 37 °C mit 5 % CO₂ und bei 95 % Luftfeuchte für 24 h kultiviert. Die Zellen wurden mit einer Verdünnung des Virus in log₁₀-Schritten infiziert und für eine Woche bei 37 °C mit 5 % CO₂ und bei 95 % Luftfeuchte kultiviert. Zur Kontrolle wurde ein Virus mit bekanntem Titer mitgeführt. Der Titer kann aufgrund der Virus-Plaque-Bildung in den Vertiefungen der 24-Lochplatte berechnet werden. Als endgültiger Titer wurde die Verdünnungsstufe angegeben, bei der die letzte Plaquebildung zu beobachten war.

4.3 Apoptosemessung

Die Ermittlung von apoptotischer, fragmentierter DNA erfolgte auf Einzelzellniveau durchflusszytometrisch am FACScan Durchflusszytometer (BD-Pharmingen). Die Daten wurden mit der CellQuestPro Software ausgewertet (Hemmati et al., 2002a). Der prozentuale Zellanteil mit Sub-G1 DNA-Gehalt gibt den prozentualen Anteil an apoptotischen Zellen mit fragmentierter genomischer DNA an. Die Zellen wurden nach Behandlung mit Trypsin geerntet und in 0,7 % Formaldehyd fixiert. Anschließend folgte die Inkubation in 70 % Ethanol und eine RNase-Behandlung (40 µg/ml) bei 37°C für 30 min. Die Zellen wurden schließlich in 200 µl einer Propidiumjodidlösung (50 µg/ml) resuspendiert und anschließend am Durchflusszytometer gemessen.

4.4 Messung des mitochondrialen Membranpotentials

Die Zellen wurden durch Trypsinieren geerntet und bei 37 °C für 30 min mit dem lipophilen, kationischen Farbstoff JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin Jodid, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) inkubiert. Aufgrund seiner negativen elektrischen Ladung akkumuliert der Farbstoff an der Innenseite der inneren Mitochondrienmembran. In nicht-apoptotischen Zellen mit hohem Membranpotential bildet der Farbstoff sog. J-Aggregate aus, die eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums von 537 nm zu 597 nm auslösen. Apoptotische Zellen weisen eine verminderte Fluoreszenz und ein vermindertes Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) auf. Dies ermöglicht die Messung des Zusammenbruchs des mitochondrialen Membranpotentials mittels Durchflusszytometrie auf Einzelzellniveau (Gillissen et al., 2003a).

4.5 Messung der N-terminalen Konformationsänderung von Bax und Bak

Die Zellen wurden durch Trypsinieren geerntet und in 0,5 % Paraformaldehyd für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschen mit 1 % FCS in 1x PBS (*phosphate buffered saline*) wurden die Zellen mittels eines Antikörpers (Endkonzentration 1 µg/ml in PBS mit 1 % FCS und 0,1 % Saponin), der spezifisch die N-terminale Konformationsänderung detektiert, für 1 h bei 4°C inkubiert. In einem weiteren Schritt wurden die Zellen gewaschen und für 1 h bei 4°C mit einem sekundären FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-markierten Antikörper (Endkonzentration: 1 µg/ml) inkubiert. Nach erneutem Waschen und der Resuspension der Zellen in PBS wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf Einzelzellniveau gemessen. Die konformationsgeänderten Bax- oder Bak-Proteine werden von dem spezifischen Antikörper gebunden und sind aufgrund der FITC-Markierung, die als eine Grünfluoreszenz messbar ist, am Durchflusszytometer detektierbar.

4.6 Fluoreszenzmikroskopie

Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte die GFP-Bak und GFP-Bax-Oligomerisierung in DU145-Zellen, die stabil GFP-Bax oder GFP-Bak exprimieren, untersucht werden. Hierzu wurden Zellen auf Objektträgern kultiviert, nach 24 h Inkubation p14^{ARF} exprimiert und nach 48 h mit 4 % Paraformaldehyd in PBS für 15 min fixiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen und die Objektträger mit Aquamount überschichtet. Die überschichteten Zellen konnten direkt am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200 Mikroskop) untersucht werden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Openlab Deconvolution Software (Improvision, Coventry, UK).

4.7 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot Analyse

Zellen wurden geerntet und nach Waschen mit PBS in Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, 270 mM Saccharose, 1 % (v/v) TritonX-100, 1 Tablette Complete Mini Protease Inhibitor (Roche)) aufgeschlossen. Für die Freisetzung von Cytochrom c wurden die Zellen mit 200 µl Isolationspuffer mit 0,75 % Digitonin und 0,75 % PMSF (20 mM HEPES pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1mM EDTA) für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand entspricht der zytosolischen Fraktion und das Pellet der mitochondrialen Fraktion. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Methode (Pierce, Rockford, USA) bestimmt und die Proben mit 5 x Probenpuffer (125 mM Tris/HCl, 288 mM β-Mercaptoethanol, 20 % Glycerin, 2 % SDS, 10 µg/ml Bromphenolblau) versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Gleiche Mengen an Protein (25 µg) wurden mittels SDS-Gelelektrophorese separiert und auf Nitrozellulosemembranen (0,2 µm Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) nach dem Semidry-Verfahren (Trans-blot SD transfer cell, Bio-Rad, München, Deutschland) geblottet. Der Nachweis der spezifischen Antikörperbindung erfolgte durch

Chemolumineszenz (SuperSignal West Pico Chemoluminescent substrate system, Pierce, Rockford, USA).

4.8 Transfektion von Zellen

Transfektion durch siRNA

Die Transfektion der Zellen mit siRNA (*small interfering RNA*) wurde mittels DharmaFECT Transfection Reagent nach den Herstellerbedingungen von Dharmacon (Lafayette, CO, USA) durchgeführt.

Transfektion durch Elektroporation

Die Mcl-1-cDNA wurde in einen Doxycyclin-regulierbaren pRTS1-Vector (Bornkamm et al., 2005) kloniert und anschließend in die DU145-Zellen mittels Elektroporation transfiziert. Hierfür wurden 5×10^6 DU145-Zellen in 500 μ l DMEM-Medium ohne Zusätze aufgenommen und mit 10 μ g der Plasmid-DNA bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Danach erfolgte die Elektroporation bei 0,25 kV und 925 μ F für 10 sec. Die transfizierten Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10 % FCS, 0,1 % Pen/Strep und mit 750 μ g/ μ l Hygromycin B (Calbiochem) selektiert. Anschließend erfolgte nach Induktion von GFP durch Zugabe von Doxycyclin (1 μ g/ μ l) eine Sortierung der Zellen am Durchflusszytometer.

Die cDNA von Bcl-x_L wurde in den pIRESneo3-Vektor kloniert und Bulk-Zellkulturen hergestellt, wie beschrieben in (Gillissen et al., 2003b; Hasenjäger et al., 2004).

4.9 Quantitative Polymerasekettenreaktion (Real-time PCR)

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mittels des NucleoSpin RNA II Kits der Macherey-Nagel GmbH (Düren, Deutschland). Es wurden 1000 ng Gesamt-RNA mittels reversen Transkriptasen (Random Primer, Biotin GmbH, Deutschland) in cDNA umgeschrieben und anschließend eine quantitative Real-time PCR nach der TaqMan-Methode mittels des ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) durchgeführt.

5. Ergebnisse

Zur Aufklärung der Bedeutung von p53 in der p14^{ARF}-vermittelten Apoptose wurden die Untersuchungen ausschließlich in p53-profizienten, humanen Tumorzelllinien und in p53-defizienten Tumorzelllinien durchgeführt und die Resultate miteinander verglichen.

Für die Analysen wurde in den Zellen der Tumorsuppressor p14^{ARF} adenoviral exprimiert. Eine adenovirale Expression des Zielgens erlaubt eine hohe Effizienz der Proteinexpression in den Zielzellen und ist daher ein vorteilhaftes Vektorsystem.

5.1 Das pro-apoptische BH3-only-Protein Puma und der Zellzyklusregulator p21^{Cip1/WAF-1} spielen eine zentrale Rolle bei der p14^{ARF}-vermittelten, mitochondrialen Apoptose

In p53-profizienten Zellsystemen zeigten Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, dass die Expression von p14^{ARF} Apoptose über einen p53, Bax-vermittelten, mitochondrialen Signalweg auslöst (Hemmati et al., 2006; Normand et al., 2005). Die BH3-only-Proteine sind maßgeblich an der Aktivierung des pro-apoptischen Bcl-2-Familienproteins Bax beteiligt. Es wurde daher untersucht, ob und wenn ja welche BH3-only-Proteine zur Aktivierung des p14^{ARF}-induzierten, p53-vermittelten mitochondrialen Apoptosesignalweges erforderlich sind.

Des Weiteren ist bekannt, dass nach DNA-Schädigung der Zellzyklusregulator p21^{Cip1/WAF-1}, welcher zum Zellzyklus-Arrest führt, durch den Transkriptionsfaktor p53 hochreguliert wird. Die Apoptosesensitivität beim Verlust von p21^{Cip1/WAF-1} und/oder der Doppelverlust von Puma und p21^{Cip1/WAF-1} sollten in diesem Zusammenhang gleichfalls untersucht werden. Vorarbeiten zeigten, dass p21 p14^{ARF}-vermittelte Apoptose hemmt und p14^{ARF} über p21 Zellzyklus-Arrest auslöst (Hemmati et al., 2006; Normand et al., 2005).

Nach adenoviral-vermittelter Expression von p14^{ARF} in p53-profizienten HCT116-Kolonkarzinomzellen wurde zunächst die mRNA-Expression verschiedenster BH3-only-Proteine mittels quantitativer Real-time PCR über einen Zeitraum von 72 h untersucht. Nach 24-stündiger Expression von p14^{ARF} wiesen wir eine mehr als 4-fach erhöhte Menge an mRNA des BH3-only-Proteins *Puma* nach (Abbildung 6A). Des Weiteren zeigte sich eine Erhöhung der Expression für *Bim*, *Nbk* und *Noxa*. Die mRNA-Expression für die BH3-only-Proteine *Bid*, *Bad*, *Hrk* und *Bmf* blieb dabei unverändert. Die transkriptionelle Hochregulation von *Puma* und *Nbk* korreliert mit einem Anstieg der Puma- und Nbk-Proteinexpression und der Aktivierung von apoptotischer DNA-Fragmentierung. Im Gegensatz dazu konnte jedoch kein Anstieg der Proteinexpression für Bim und Noxa verzeichnet werden. P14^{ARF} führte jedoch zur transkriptionellen Hochregulation des Transkriptionsfaktors p53, des

Zellzyklusregulators $p21^{Cip1/WAF-1}$ und des Bcl-2-Familienmitglieds Bax. Ist der Zellzyklusregulator $p21^{Cip1/WAF-1}$ inaktiviert, ging dies einher mit einer Sensibilisierung für die $p14^{ARF}$ -vermittelte Apoptose (Abbildung 6B und Abbildung 7).

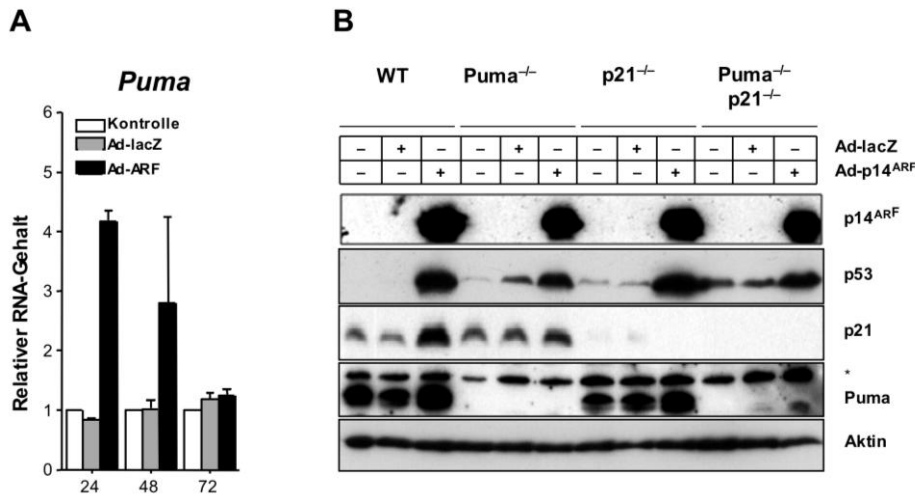


Abbildung 6: P14^{ARF} führt zur Expression des BH3-only-Proteins Puma. (A) In HCT116 WT wurde $p14^{ARF}$ und LacZ exprimiert oder die Zellen unbehandelt gelassen und nach 24 h, 48 h und 72 h RNA isoliert und in cDNA durch reverse Transkription umgeschrieben. Anschließend wurde eine quantitative Real-time PCR durchgeführt. MW +/- SD (n=3). (B) In HCT116 WT-Zellen, Puma- und p21-defizienten Zellen, sowie Puma- und p21-doppeldefizienten Zellen wurde $p14^{ARF}$ oder LacZ für 48 h adenoviral exprimiert oder die Zellen unbehandelt gelassen. Das Gesamtprotein wurde mittels SDS-Gelelektrophorese separiert und mittels der Antikörper gegen $p14^{ARF}$, p53, p21, Puma, Bax und Aktin nachgewiesen. * unspezifische Bande.

Des Weiteren wurde der Einfluss eines Verlustes von Puma auf die Apoptosesensitivität nach Expression von $p14^{ARF}$ untersucht. Es konnte durchflusszytometrisch nachgewiesen werden, dass die Expression von $p14^{ARF}$ in Puma-profizienten Zellen Apoptose auslöst. In HCT116-Zellen, in denen beide Puma-Allele durch somatische homologe Rekombination deletiert wurden (HCT116 Puma^{-/-}), konnte eine Resistenz gegenüber der Apoptose-auslösenden Wirkung von $p14^{ARF}$ gezeigt werden. Diese Resistenz gegenüber der Apoptose-auslösenden Wirkung von $p14^{ARF}$ wurde in Zellen, in denen neben Puma auch der Zellzyklusregulator $p21^{Cip1/WAF-1}$ deletiert war (HCT116 Puma^{-/-}/p21^{-/-}), bestätigt. Im Gegensatz dazu sensibilisiert der alleinige Verlust des Zellzyklusregulators $p21^{Cip1/WAF-1}$ für die $p14^{ARF}$ -induzierte Apoptose. Interessanterweise sensibilisiert der Verlust des Zellzyklusregulators $p21^{Cip1/WAF-1}$ nur in Puma-profizienten Zellen für die $p14^{ARF}$ -vermittelte Apoptose (Abbildung 7).

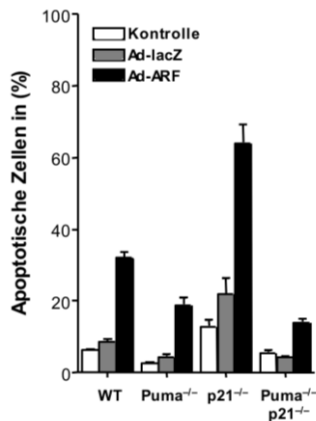


Abbildung 7: Das BH3-only-Protein Puma spielt bei der p14^{ARF}-vermittelten Apoptose eine essentielle Rolle. In HCT116 WT-Zellen, Puma- und p21-defizienten HCT116-Zellen, sowie Puma- und p21-doppeldefizienten HCT116-Zellen wurde p14^{ARF} und LacZ adenoviral exprimiert oder die Zellen unbehandelt gelassen. Es wurde nach 96 h die Apoptose durchflusszytometrisch gemessen. MW +/- SD (n=3).

Die Aktivierung des pro-apoptischen Bcl-2-Homologs Bax spielt bei der Auslösung der Apoptose eine wesentliche Rolle. Bax durchläuft zunächst eine N-terminale Konformationsänderung, transloziert vom Zytoplasma zum Mitochondrium und bindet in die äußere Mitochondrienmembran. Dies führt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, zur Freisetzung von pro-apoptischen Faktoren, wie z.B. Cytochrom c und somit zur Aktivierung der Caspasekaskade.

Nach der p14^{ARF}-Expression wurde durchflusszytometrisch die aktivierungsspezifische, N-terminale Konformationsänderung des Bax-Proteins gemessen. Es zeigte sich, dass Bax in Puma-profizienten Zellen eine Konformationsänderung durchläuft. Beim Verlust von Puma hingegen ist die Aktivierung von Bax nahezu vollständig blockiert (Hemmati et al., 2010). In Puma-defizienten Zellen wurde Puma durch ein adenovirales Vektorsystem re-exprimiert (Abbildung 8A). Puma-defiziente Zellen zeigten wieder vollständige Apoptosesensitivität (Abbildung 8B). Die alleinige Expression von p14^{ARF} führt interessanterweise in den WT-Zellen zu gleichwertig hohen Apoptoseraten, wie die kombinierte Expression von p14^{ARF} und Puma in den Puma-defizienten Zellen. Dies beweist, dass die Rekonstitution von Puma in Puma-defizienten Zellen für die p14^{ARF}-vermittelte Apoptose sensibilisiert und dass die p14^{ARF}-vermittelte Apoptose in p53-profizienten Zellen über einen ausschließlich Puma-abhängigen Mechanismus erfolgt (Abbildung 8B).

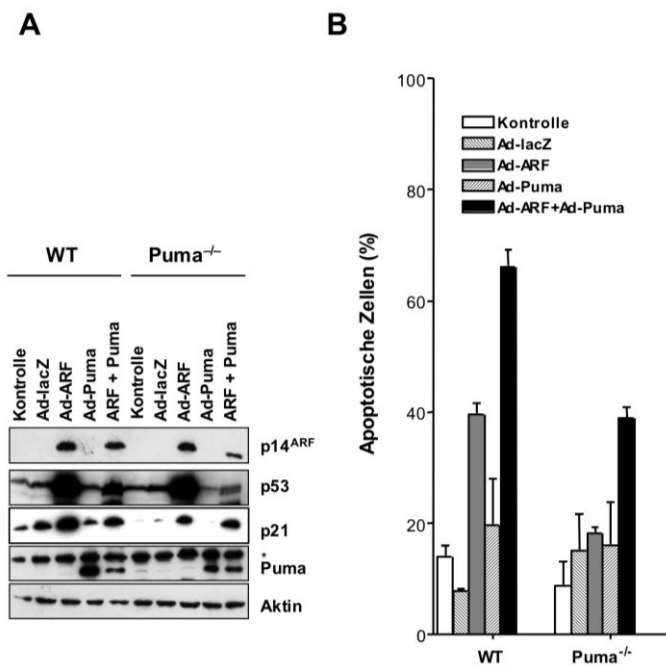


Abbildung 8: Rekonstitution von Puma in Puma-defizienten Zellen sensibilisiert für p14^{ARF}-vermittelte Apoptose. In den HCT116 WT und HCT116 Puma^{-/-} Zellen wurde Puma alleine, p14^{ARF} alleine oder Puma und p14^{ARF} in Kombination adenoviral exprimiert oder die Zellen mock oder mit LacZ als Kontrolle behandelt. Das Gesamtprotein wurde anschließend mittels SDS-Gelelektrophorese separiert (A), sowie mittels Durchflusszytometrie die apoptotische DNA-Fragmentierung gemessen (B). MW +/- SD (n=3).

Des Weiteren konnte in einem zusätzlichen Zellsystem (DU145-Prostatakarzinomzellen, die p53 stabil durch Transfektion re-exprimieren) gezeigt werden, dass bei gezielter Herunterregulation von Puma mittels siRNA die p14^{ARF}-vermittelte Apoptose im Vergleich zu unbehandelten Zellen deutlich reduziert ist. Im Gegensatz dazu führte eine Herunterregulation anderer BH3-only-Proteine mittels siRNA, z.B. von Nbk und Noxa, nicht zur Verringerung der Apoptoserate. Die BH3-only-Proteine Nbk und Noxa spielen daher allenfalls in der p14^{ARF}-vermittelten Apoptose eine untergeordnete Rolle (Hemmati et al., 2010).

5.2 In p53-defizienten Tumorzellen vermittelt der Tumorsuppressor p14^{ARF} eine Hemmung von Mcl-1 und eine Bak-abhängige Apoptose

Der Tumorsuppressor p14^{ARF} kann sowohl p53-abhängigen, als auch p53-unabhängigen Zelltod auslösen. Die p53-abhängige Apoptose wurde im ersten Teil dieser Arbeit diskutiert. Um nun die p53-unabhängige Apoptose detaillierter zu untersuchen und die Resultate mit der p53-abhängigen Apoptose zu vergleichen, wurde p14^{ARF} in p53-defizienten DU145-Prostatakarzinomzellen adenoviral exprimiert und die Ergebnisse analysiert.

Für weitere Untersuchungen wurde Bax in den p53-defizienten DU145-Zellen stabil re-exprimiert (von Haefen et al., 2002) und mit Bax-defizienten Zellen (Mock-Zellen) verglichen (Abbildung 9). Endogenes, pro-apoptotisches Bak wird sowohl in den Bax-defizienten Zellen,

als auch in den Bax-profizienten Zellen exprimiert. Nach der p14^{ARF}-Expression zeigt sich deutlich in den Bax-defizienten Mock-Zellen sowie in den Bax re-exprimierenden Zellen eine Freisetzung des pro-apoptotischen Faktors Cytochrom c aus den Mitochondrien.

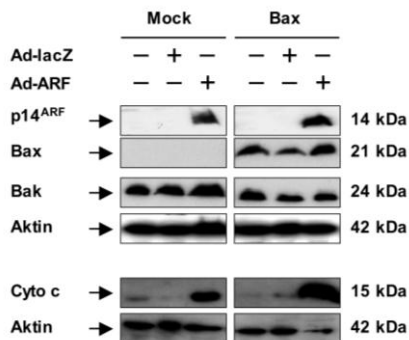


Abbildung 9: In p53-defizienten Zellen ist die p14^{ARF}-vermittelte Freisetzung von Cytochrom c Bax-unabhängig. In Bax-defizienten (Mock) und Bax-profizienten DU145-Zellen wurde p14^{ARF} und LacZ adenoviral exprimiert und nach 48 h mittels Western Blot die Proteinexpression für p14^{ARF}, p53, Bax, Bak, Cytochrom c und Aktin nachgewiesen. Mock: Zellen mit Leervektor; Cyto c: Cytochrom c

Für weitere Analysen der Apoptose in p53-defizienten Zellen wurde nach p14^{ARF}-Expression in den p53-defizienten, Bax-defizienten Mock Zellen und in den Bax re-exprimierenden Bax-Zellen die apoptotische DNA-Fragmentierung durchflusszytometrisch untersucht.

Eine apoptotische DNA-Fragmentierung nach Expression von p14^{ARF} erfolgte sowohl in den Bax-defizienten, als auch in den Bax-profizienten Zellen (Abbildung 10A). Interessanterweise zeigte sich, dass die p14^{ARF}-vermittelte Apoptose unabhängig vom Bax-Status stattfinden kann.

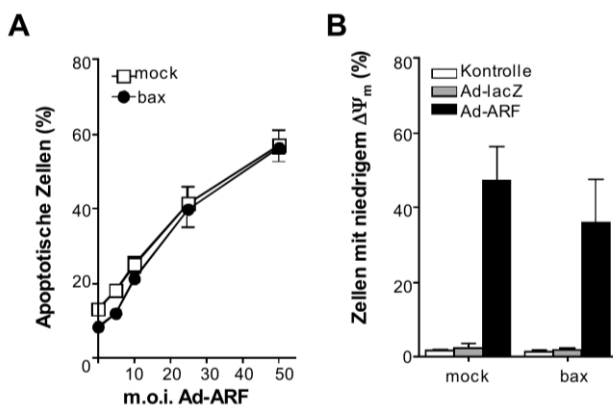


Abbildung 10: In p53-defizienten Zellen ist die p14^{ARF}-vermittelte Apoptose Bax-unabhängig. (A) In Bax-defizienten und Bax-profizienten DU145-Zellen wurde p14^{ARF} adenoviral exprimiert und nach 48 h erfolgte durchflusszytometrisch eine Messung zum Nachweis fragmentierter DNA, sowie in (B) erfolgte eine Messung zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials. MW +/- SD (n=3). Mock: Zellen mit Leervektor

Dies konnte durch den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (Abbildung 10B) bestätigt werden. Bax spielt demnach in der p14^{ARF}-vermittelten, p53-unabhängigen Apoptose keine essentielle Rolle. Das Vorhandensein von endogenem Bak könnte somit ausreichen, die Zellen für die Apoptose zu sensibilisieren.

Da die p14^{ARF}-vermittelte Apoptose Bax-Unabhängigkeit aufweist, wurde detaillierter der Frage nachgegangen, ob Bak als Vermittler der Apoptose fungieren kann. In den Bax-profizienten, sowie defizienten Zellen, wurde p14^{ARF} exprimiert und die N-terminale Konformationsänderung von Bax bzw. Bak als Parameter für die Aktivierung im Rahmen der Apoptose durchflusszytometrisch bestimmt. Interessanterweise konnte in den Bax-profizienten, sowie in den Bax-defizienten Zellen eine Konformationsänderung für Bak nachgewiesen werden (Abbildung 11A), jedoch nicht für Bax (11B). Bak durchläuft hierbei eine Konformationsänderung und wird somit aktiviert, wohingegen keine Aktivierung von Bax stattfindet. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit Epirubicin, ein Hemmer der Topoisomerase II, behandelt. Deutlich zeigte sich eine Bax-Konformationsänderung in den Bax-profizienten Zellen, nicht aber in den Bax-defizienten Mock-Zellen (11B) nach Behandlung mit Epirubicin.

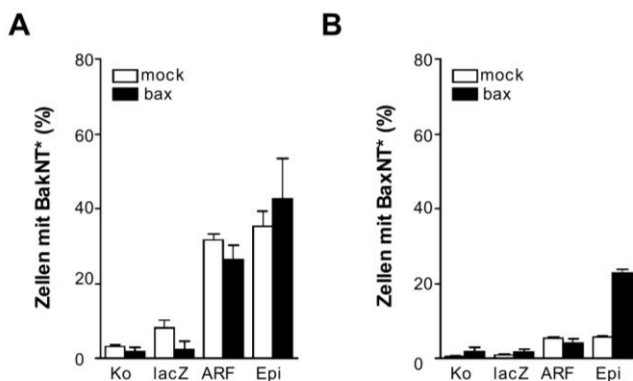


Abbildung 11: Der Tumorsuppressor p14^{ARF} führt zu einer N-terminalen Konformationsänderung im pro-apoptotischen Bak über einen Bax-unabhängigen Mechanismus. In Bax-pro und -defizienten DU145-Zellen wurde p14^{ARF} und LacZ adenoviral exprimiert oder die Zellen unbehandelt gelassen (Ko) oder mit Epirubicin behandelt (1 µg/ml) und nach 48 h durchflusszytometrisch die N-terminale Konformationsänderung von Bak (A) bzw. Bax (B) gemessen. MW +/- SD (n=3). Legende: Ko = Kontrolle; Epi = Epirubicin.

Zur Validierung dieser Daten wurde p14^{ARF} in stabilen Transfektanten, die entweder Bax-GFP oder Bak-GFP exprimieren, adenoviral exprimiert und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Sind Bax oder Bak aktiviert, kann es im Rahmen der Oligomerisierung von Bax und Bak zu einer punktförmigen, grün-fluoreszierenden Anhäufung von Bax und Bak kommen. Nach der p14^{ARF}-Expression zeigten nur die Bak-GFP-exprimierenden Zellen punktförmige Anhäufungen (12A Panel c). Keine punktförmigen Anhäufungen waren hingegen in den Bax-GFP-exprimierenden Zellen nach p14^{ARF}-Expression zu erkennen (Abbildung 12A Panel g). Nur die Zellen, die mit Cisplatin, einem Hemmer der DNA-Reparatur und der Telomeraseaktivität, als Kontrolle behandelt wurden, zeigten sowohl punktförmige Anhäufungen für Bax, als auch für Bak (Abbildung 12 Panel d und h).

Weiterhin zeigte sich, dass die Apoptose deutlich reduziert werden konnte, wenn Bak durch siRNA herunter reguliert wurde (Abbildung 12B).

Die Bak-exprimierenden Zellen zeigten nach der p14^{ARF}-Expression deutlich mehr apoptotische Zellen im Vergleich zu den Mock-Zellen, die kein Bak exprimieren. Die Bak-Expression sensibilisiert somit für p14^{ARF}-vermittelte Apoptose. Diese Daten zeigen, dass die mitochondriale, p14^{ARF}-vermittelte Apoptose in p53-defizienten Zellen von Bak abhängt, nicht aber von Bax.

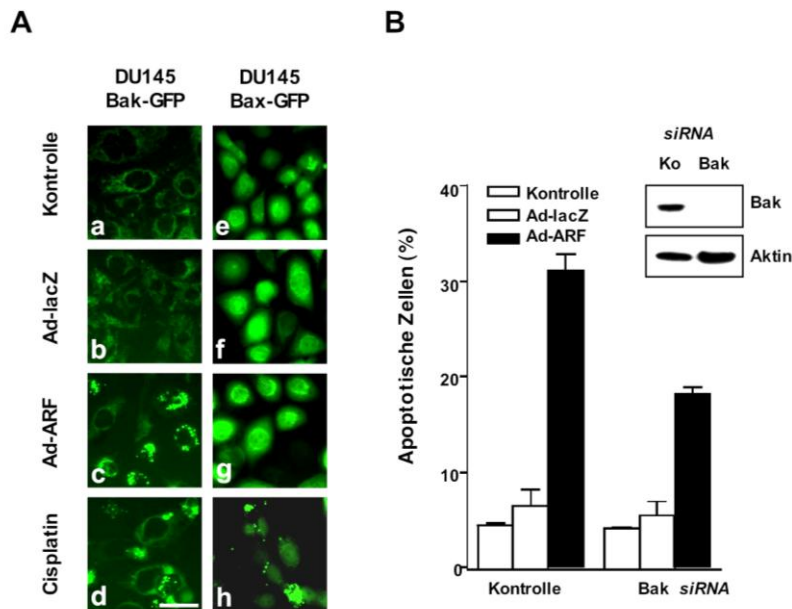


Abbildung 12: P14^{ARF} führt zur Bak-abhängigen Apoptose. (A) In DU145-Zellen, die stabil Bax-GFP oder Bak-GFP exprimieren, wurden p14^{ARF} oder LacZ adenoviral exprimiert bzw. die Zellen kontrolltransfiziert oder mit Cisplatin behandelt. Anschließend wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie grün-fluoreszierende, punktförmige Anhäufungen für Bax bzw. Bak nachgewiesen. Balken, 50 μ m. (B) In DU145-WT Zellen wurden mit siRNA gegen Bak oder Kontroll-siRNA transfiziert oder unbehandelt gelassen als Kontrolle (-) und p14^{ARF} exprimiert. Nach 72 h wurde in den Zellen durchflusszytometrisch die fragmentierte DNA gemessen. MW +/- SD (n=3).

Des Weiteren wurde die Rolle der pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Proteine in der p14^{ARF}-vermittelten Apoptose untersucht. Zunächst wurde die mRNA-Expression der pro-apoptotischen BH3-only-Proteine mittels Real-time PCR untersucht. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg der mRNA-Expression von *Puma*, *Nbk* und *Noxa*.

Bemerkenswerterweise konnte jedoch kein Anstieg der Proteinkonzentration von Puma, Noxa oder Nbk auf Proteinebene verzeichnet werden (Müer et al., 2012).

Da eine Beteiligung der pro-apoptotischen Proteine an der Regulation der p14^{ARF}-vermittelten Apoptose in p53-defizienten Zellen ausgeschlossen werden konnte, wurde die Regulation der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine detaillierter untersucht.

Bak kann durch die anti-apoptotischen Proteine Mcl-1 und Bcl-x_L antagonisiert werden. Die mRNA-Expression wurde hierfür ebenfalls mittels Real-time PCR untersucht. *Mcl-1*, *Bcl-x_L*, *Bcl-w* und *Bcl-2* wurden nicht auf mRNA-Ebene post-transkriptional reguliert. Interessanterweise war das anti-apoptotische Protein Mcl-1 nach p14^{ARF}-vermittelter

Apoptose auf Proteinebene herunter reguliert (Abbildung 13). Eine leichte Herunterregulation von Bcl-x_L nach p14^{ARF}-Expression konnte gleichfalls beobachtet werden (Müer et al., 2012).

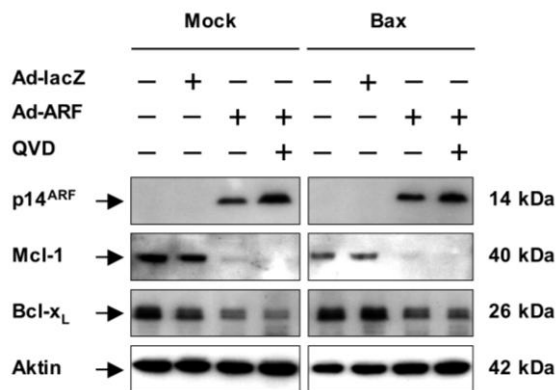


Abbildung 13: Die p14^{ARF}-vermittelte Destabilisierung von Mcl-1 wird nicht durch Caspasen reguliert. (A) In Bax-defizienten und Bax-profizienten DU145-Zellen wurde p14^{ARF} adenoviral exprimiert und in den Zellen zugleich mit Q-vD-OPh (QVD; 10 µM) behandelt. Nach 48 h wurden die Proben lysiert und mittels Western Blot die Proteinexpression für p14^{ARF}, Mcl-1, Bcl-x_L und Aktin nachgewiesen. Mock: Zellen mit Leervektor

Eine wichtige Rolle zur Regulation von Mcl-1 spielen die Caspasen. Mcl-1 kann durch Caspasen gespalten und durch transkriptionale, post-transkriptionale und post-translationale Mechanismen reguliert werden (Warr & Shore, 2008). Unsere Untersuchungen haben jedoch ergeben, dass die Caspasen nicht an der Regulation der Mcl-1-Proteinexpression beteiligt sind. Bei der Hemmung der Caspasen durch Q-vD-OPh (Quinolyl-Val-Asp-OPh) wird das Mcl-1-Protein nach Expression von p14^{ARF} weiterhin destabilisiert. Die Bcl-x_L-Proteinkonzentration wird ebenfalls durch p14^{ARF} vermindert. Nach Behandlung mit Q-vD-OPh wird die Proteinkonzentration von Bcl-x_L gleichfalls nicht erhöht (Abbildung 13).

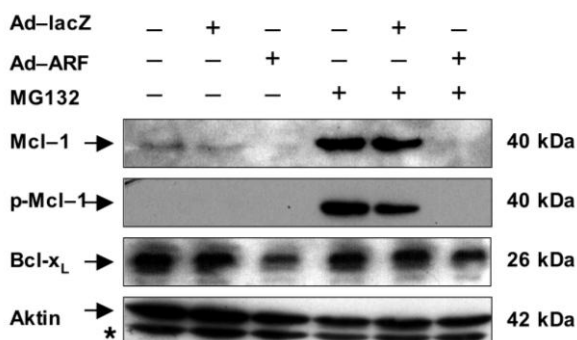


Abbildung 14: Die p14^{ARF}-vermittelte Destabilisierung von Mcl-1 wird nicht durch das Proteasom reguliert. (A) In DU145 Mock-Zellen wurde p14^{ARF} adenoviral exprimiert und mit dem Proteasomhemmer MG132 (10 µM) behandelt. Nach 48 h wurden die Proben lysiert und mittels Western Blot die Proteinexpression für p14^{ARF}, Mcl-1, Bcl-x_L und Aktin nachgewiesen.

Das Proteasom ist am Abbau zahlreicher Proteine beteiligt. Daher wurde die mögliche Regulation von Mcl-1 und Bcl-x_L über das Proteasom untersucht. Hierfür wurde das

Proteasom mittels des Hemmers MG132 blockiert und die Proteinexpression überprüft. Es zeigte sich, dass nach p14^{ARF}-Expression und Blockierung des Proteasoms mit MG132 keine Stabilisierung von Mcl-1 zu verzeichnen war, jedoch möglicherweise das Protein Bcl-x_L stabilisiert werden könnte (Abbildung 14).

Um die funktionelle Bedeutung von Mcl-1 und Bcl-x_L in der p14^{ARF}-vermittelten Apoptose zu untersuchen, wurde nach der Expression von Mcl-1 bzw. Bcl-x_L die Hemmbarkeit der Apoptose überprüft. Messungen zur apoptotischen DNA-Fragmentierung ergaben, dass die p14^{ARF}-vermittelte Apoptose durch Expression des anti-apoptotischen Mcl-1 und des Bcl-x_L gehemmt werden konnte. Mcl-1 wurde stabil mittels eines regulierbaren pRTS-1-Vektors in DU145-Zellen exprimiert und nach p14^{ARF}-Expression die apoptotische DNA-Fragmentierung gemessen. Es zeigte sich eine deutliche Hemmung der Apoptose durch die Expression des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1. Transfektanten, die stabil das anti-apoptotische Protein Bcl-x_L exprimieren, zeigten gleichermaßen nach p14^{ARF}-Expression eine Hemmung der Apoptose (Abbildung 15A und B).

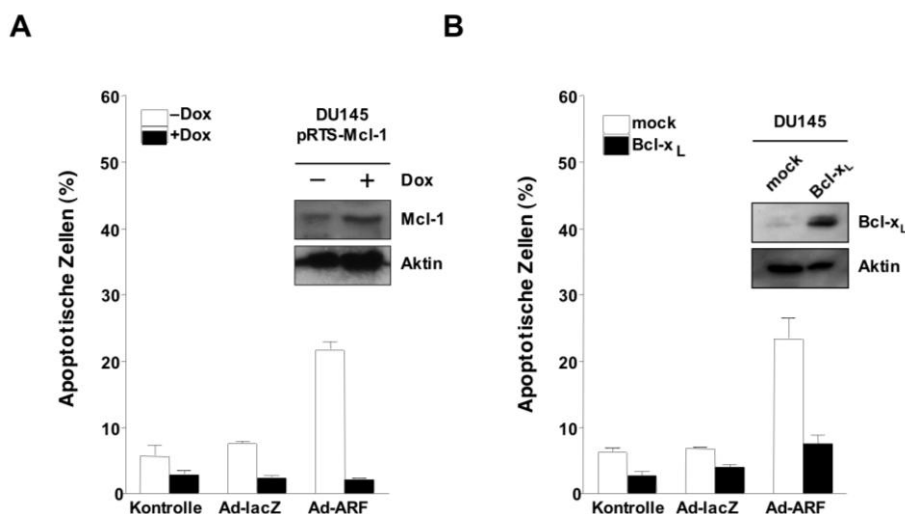


Abbildung 15: Die Expression von Mcl-1 und Bcl-x_L hemmt die p14^{ARF}-vermittelte Apoptose. (A) In DU145-Zellen wurde p14^{ARF} adenoviral exprimiert oder mock-behandelt als Kontrolle und Mcl-1 stabil mittels eines doxyzyclin-regulierbaren pRTS-1-Vektors exprimiert und nach 72 h durchflusszytometrisch die fragmentierte DNA gemessen. (B) In DU145-Zellen wurde p14^{ARF} adenoviral exprimiert und Bcl-x_L stabil mittels eines pIRES-Vektors exprimiert und nach 72 h durchflusszytometrisch die fragmentierte DNA gemessen. MW +/- SD (n=3). Legende: mock = Zellen mit Leervektor; Dox = Doxyzyclin

Zur Validierung der Ergebnisse in den p53-defizienten DU145-Zellen wurde ein weiteres Zellsystem, die p53-defiziente Saos-2-Osteosarkomzelllinie, verwendet. Saos-2 Zellen haben eine bi-allelische Deletion für p53 und sind ebenfalls p63- und p73-defizient und eignen sich somit sehr gut als vergleichbare Kontroll-Zelllinie. Es zeigte sich, dass nach der p14^{ARF}-Expression das Mcl-1-Protein auch in den Saos-2-Zellen destabilisiert wurde. Das Protein Bcl-x_L wurde ebenfalls nach 72 h leicht herunter reguliert (Abbildung 16).

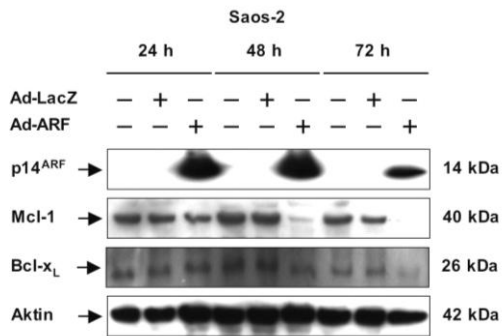


Abbildung 16: Saos-2-Zellen zeigen eine p14^{ARF}-vermittelte Destabilisierung von Mcl-1. In Saos-2-Zellen wurde p14^{ARF} adenoviral exprimiert. Nach 48 h wurden die Proben lysiert und mittels Western Blot die Proteinexpression für p14^{ARF}, Mcl-1, Bcl-x_L und Aktin nachgewiesen.

Nach der p14^{ARF}-Expression konnten, wie zuvor in den DU145-Prostatakarzinomzellen, eine Auslösung der Fragmentierung der DNA und eine N-terminale Konformationsänderung von Bak gemessen werden (17A und B). Eine Bax-unabhängige Auslösung von Apoptose konnte nach Herunterregulation von Bax durch siRNA ebenfalls in den Saos-2 Zellen gezeigt werden. Somit konnten die Ergebnisse in den DU145-Zellen mittels der Saos-2-Zellen bestätigt werden (Müer et al., 2012).

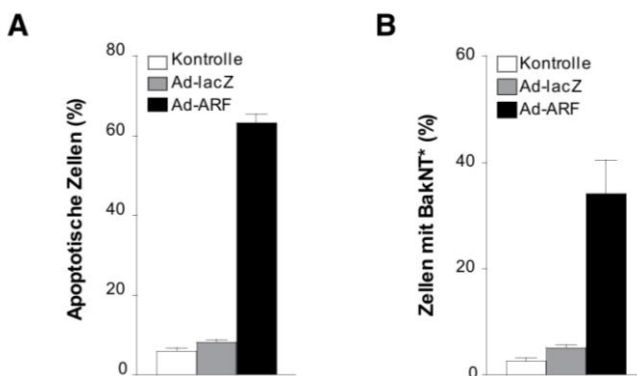


Abbildung 17: Saos-2-Zellen zeigen eine p14^{ARF}-vermittelte Apoptose. In Saos-2-Zellen wurden p14^{ARF} und LacZ adenoviral exprimiert oder die Zellen unbehandelt gelassen (Kontrolle) und nach 72 h (A) durchflusszytometrisch die fragmentierte DNA gemessen. (B) Zellen wurden wie in (A) behandelt und es wurde durchflusszytometrisch die N-terminale Konformationsänderung von Bak gemessen. MW +/- SD (n=3).

5.3 In Bax-defizienten Tumorzellen sensibilisiert die Hemmung von Mcl-1 und Bcl-x_L für Apoptose durch den Todesliganden TRAIL

In humanen Karzinomzellen ist der TRAIL-(*tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand*)-vermittelte Zelltod stark abhängig von dem pro-apoptotischen Bcl-2-Protein Bax. Maligne Tumore weisen jedoch häufig Mutationen im Bax-Gen auf. Resistenzentwicklungen gegenüber TRAIL-vermitteltem Zelltod ist oft die Folge daraus. Daher wurde der Einfluss des Verlustes von Bax bzw. Bak auf die TRAIL-vermittelte Apoptose untersucht. In HCT116-Kolonkarzinomzellen, die durch eine gezielte Herunterregulation einen Verlust von Bax

aufweisen, zeigte sich eine vollständige Resistenz gegenüber der Behandlung mit TRAIL (Abbildung 18A). Wohingegen der Verlust von Bak, durch spezifische Herunterregulation mittels *short hairpin* RNA, keinen Einfluss auf die Apoptoseinduktion durch TRAIL hatte. Bak-profiziente Zellen, die einen Verlust von Bax aufweisen, konnten jedoch nicht für TRAIL-vermittelte Apoptose sensibilisiert werden. Bak allein konnte daher den Verlust von Bax nicht kompensieren. In Bax-profizienten Zellen führte die Behandlung mit TRAIL zu einer Freisetzung von Cytochrom c und nachfolgend zur Aktivierung der Caspase-3. Bax-defiziente Zellen hingegen zeigten keine Freisetzung der pro-apoptotischen Faktoren, wie Cytochrom c (Abbildung 18B).

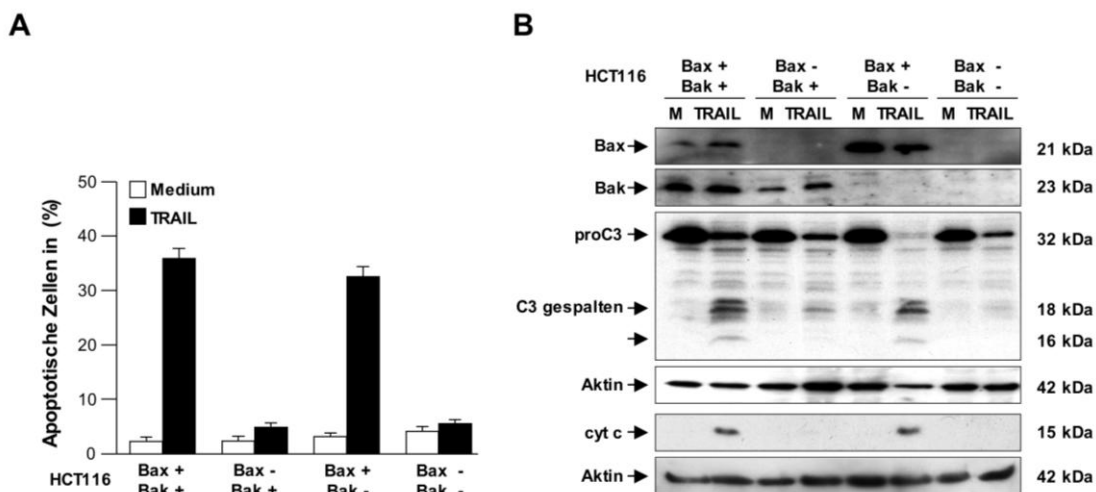


Abbildung 18: Der Verlust von Bax hemmt die TRAIL-vermittelte Apoptose. HCT116 WT, Bax-, Bak- und Bax-/Bak-Zellen wurden für 24 h mit 50 ng/ml TRAIL behandelt oder unbehandelt gelassen (Medium) und mittels Durchflusszytometrie die apoptotische DNA-Fragmentierung gemessen (MW +/- SD (n=3)). (A) Das Gesamtprotein wurde mittels SDS-Gelelektrophorese separiert und mittels spezifischer Antikörper gegen Bax, Bak, Caspase 3, Cytochrom c und Aktin nachgewiesen (B). Legende: M = Medium; proC3 = Procaspase 3

Den Verlust von Bax in TRAIL-vermittelter Apoptose kann Bak allein nicht kompensieren. Bak wird bevorzugt durch das anti-apoptotische Bcl-2-Homolog Mcl-1 gehemmt. Daher wurde die Rolle der anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder detaillierter untersucht.

Interessanterweise führte die gezielte Herunterregulation des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 mittels siRNA zur TRAIL-vermittelten Apoptose (Abbildung 19A und B). Nach TRAIL-Behandlung konnte zudem eine N-terminale Konformationsänderung von Bak nachgewiesen werden (Abbildung 19C).

In Bax-defizienten Kolonkarzinomzellen führte bei TRAIL-Behandlung die Herunterregulation des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 zum mitochondrial-vermittelten Zelltod. Zur Validierung dieser Daten wurde ein weiteres Zellsystem verwendet. Es wurden DU145-Prostatakarzinomzellen eingesetzt, die aufgrund einer Frameshift-Mutation einen Verlust von Bax aufweisen. Sie exprimieren jedoch endogenes Bak.

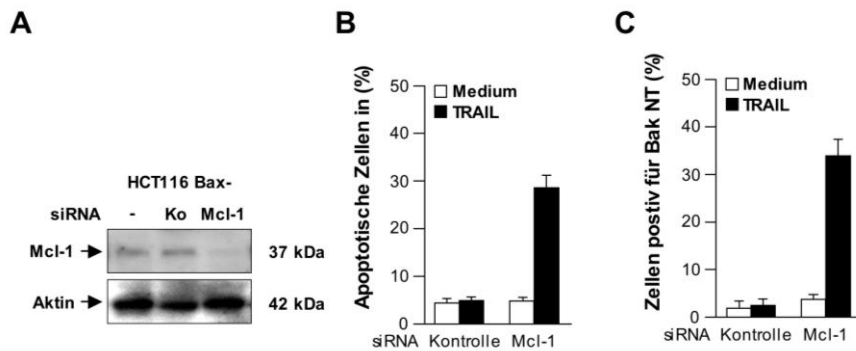


Abbildung 19: Die Herunterregulation von Mcl-1 ermöglicht die Bak-vermittelte, TRAIL-induzierte Apoptose. (A) HCT116 Bax^{-/-} Zellen wurden mit siRNA gegen Mcl-1 oder Kontroll-siRNA transfiziert oder unbehandelt gelassen als Kontrolle (-). Nach 24 h wurde das Gesamtprotein mittels SDS-Gelelektrophorese separiert und Mcl-1 mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. (B) Die Zellen wurden wie in (A) behandelt und anschließend mit 50 ng/ml TRAIL für weitere 24 h kultiviert oder unbehandelt gelassen (Medium) und durchflusszytometrisch die fragmentierte DNA gemessen. MW +/- SD (n=3). (C) Die Zellen wurden wie in (B) behandelt und anschließend erfolgte mittels Durchflusszytometrie die Messung der Bak-Konformationsänderung. MW +/- SD (n=3). Legende: Ko = Kontroll-siRNA

Um Bax-defiziente Zellen mit Bax-profizienten Zellen funktionell in ihrem Zelltodverhalten zu vergleichen, wurde Bax in den Zellen stabil re-exprimiert (von Haefen et al., 2002). Mcl-1 wurde in den Zellen herunter reguliert und diese dann mit TRAIL behandelt. TRAIL konnte in den Bax-profizienten Zellen allein Apoptose auslösen, wohingegen die Bax-defizienten Zellen Apoptose-resistent waren. In den Bax-defizienten, Bak-profizienten Zellen führte der Verlust von Bax zu einer TRAIL-Resistenz, die nur durch die Hemmung von Mcl-1 mittels siRNA kompensiert werden konnte (Abbildung 20).

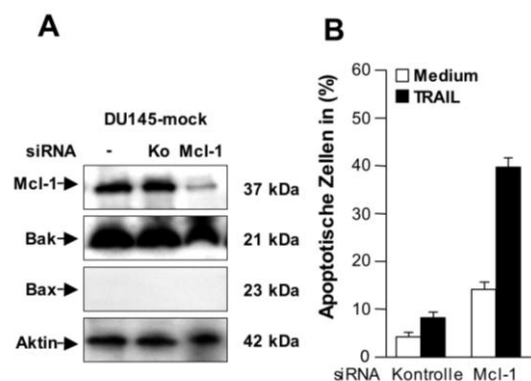


Abbildung 20: Die Herunterregulation von Mcl-1 sensibilisiert für Bak-vermittelte, TRAIL-induzierte Apoptose. (A) Bax-defiziente DU145 Mock-Zellen wurden mit siRNA gegen Mcl-1 oder mit Kontroll-siRNA transfiziert oder unbehandelt gelassen als Kontrolle (-) und nach 24 h mittels Western Blot die Proteinexpression für Mcl-1, Bax, Bak und Aktin nachgewiesen. (B) Es folgte eine Behandlung mit 50 ng/ml TRAIL für weitere 24 h oder die Zellen wurden unbehandelt gelassen (Medium) und anschließend eine durchflusszytometrische Messung zum Nachweis fragmentierter DNA durchgeführt. MW +/- SD (n=3). Legende: Ko = Kontroll-siRNA

In weiterführenden Untersuchungen wurde Bcl-x_L durch siRNA sowohl in den Bax-defizienten Zellen als auch in den Bax-profizienten Zellen herunter reguliert und die Fragmentierung von DNA gemessen (Abbildung 21A). Der Verlust von Bcl-x_L sensibilisiert nicht für die TRAIL-

vermittelte Apoptose (Abbildung 21B). Dies unterstreicht, dass Mcl-1, nicht aber Bcl-x_L, als spezifischer Hemmer bei der TRAIL-vermittelten Apoptose fungiert.

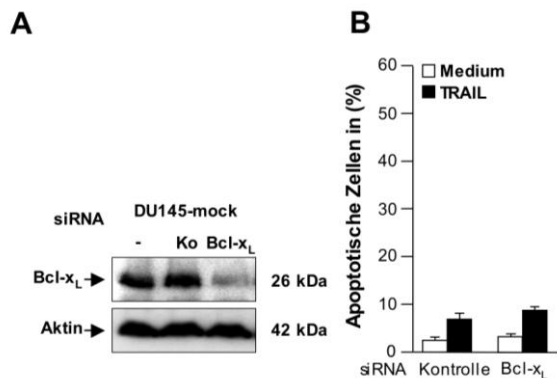


Abbildung 21: Die Herunterregulation von Bcl-x_L sensibilisiert nicht für Bak-vermittelte, TRAIL-induzierte Apoptose. (A) Bax-defiziente DU145 Mock-Zellen wurden mit siRNA gegen Bcl-x_L oder Kontroll-siRNA transfiziert oder unbehandelt gelassen (-) und nach 24 h mittels Western Blot die Proteinexpression für Bcl-x_L und Aktin nachgewiesen. (B) Es folgte eine Behandlung mit 50 ng/ml TRAIL für weitere 24 h und die Behandlung der Zellen nur mit Medium als Kontrolle und anschließend eine durchflusszytometrische Messung zum Nachweis fragmentierter DNA. MW +/- SD (n=3). Legende: Ko = Kontroll-siRNA

Der Multikinaseinhibitor Sorafenib (Nexavar; BAY43-9006) ist in der Lage, Tumorzellen für die Chemotherapie zu sensibilisieren. Dies wird durch die Herunterregulation des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 ermöglicht. Therapeutisch ist dies von großer prognostischer Bedeutung und wurde daher detaillierter an DU145-Prostatakarzinomzellen Zellen untersucht. DU145-Prostatakarzinomzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Sorafenib behandelt und in Kombination mit TRAIL für die Bildung der apoptotischen DNA-Fragmentierung analysiert. Bax-defiziente Zellen sind gegenüber TRAIL-Behandlungen resistent. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Sorafenib-Behandlung zur Überwindung der TRAIL-Resistenz in Bax-defizienten Zellen führt. Gleichermäßen vermittelt Roscovitin (CYC202, Seliciclib), ein Hemmer der zyklinabhängigen Kinasen, die TRAIL-vermittelte Apoptose in den resistenten Bax-defizienten Zellen (Gillissen et al., 2010).

6. Diskussion

6.1 Die p53-abhängige, p14^{ARF}-vermittelte Apoptose

Die Apoptose spielt eine wichtige Rolle bei der Verhinderung der Tumorentstehung. Durch die Apoptose oder auch durch den programmierten Zelltod können entartete Zellen zielgerichtet eliminiert werden. Zudem ist sie von essentieller Bedeutung bei Zellstress und DNA-Schädigung. Hierbei spielt der p14^{ARF}-Tumorsuppressorsignalweg eine wesentliche Rolle und wurde in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert.

Der Tumorsuppressor p14^{ARF} kann p53-abhängigen als auch p53-unabhängigen Zelltod auslösen (Sherr et al., 2005). Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die p53-abhängige, mitochondriale Apoptose Bax-abhängig ist (Hemmati et al., 2006; Normand et al., 2005).

Weitere Daten unserer Gruppe zeigen nun, dass in p53-profizienten Zellen nach p14^{ARF}-Expression die mRNA der BH3-only-Proteine von Puma, Nbk und Noxa hochreguliert wurden. Eine erhöhte Proteinkonzentration nach p14^{ARF}-Expression konnte für die BH3-only-Proteine Puma und Nbk gezeigt werden. Da nach der Herunterregulation von Nbk mittels siRNA keine Hemmung der Apoptose zu verzeichnen war, nehmen wir an, dass eine alleinige funktionelle Beteiligung von Nbk an der Vermittlung von p14^{ARF}-induzierter Apoptose eine untergeordnete Rolle spielt. Ferner wiesen wir nach, dass schon 24 h nach der p14^{ARF}-Expression eine Hochregulation der *Puma*-mRNA zu detektieren war und Puma eine funktionelle Beteiligung an der Vermittlung der Apoptose zeigte (Hemmati et al., 2010). Es wurde ferner deutlich, dass das BH3-only-Protein Puma bei der Vermittlung der p14^{ARF}-vermittelten Apoptose eine wesentliche Rolle spielt (Hemmati et al., 2010). Folglich führt p14^{ARF} zu einem Bax-vermittelten Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und zur Aktivierung der Initiatorcaspase-9 und letztlich zur Exekution der Apoptose. Demgegenüber bewirkt der Verlust von Puma eine fast vollständige Blockade der Apoptose. Nach der Rekonstitution von Puma in Puma-defizienten Zellen konnte jedoch die Apoptosesensitivität wieder vollständig hergestellt werden. Dies unterstreicht die essentielle Rolle von Puma und auch Bax bei der Vermittlung von p14^{ARF}-induzierter Apoptose in p53-profizienten Tumorzellen (Hemmati et al., 2006; Hemmati et al., 2010).

In der Literatur wird beschrieben, dass das BH3-only-Protein Puma die Apoptose nach Behandlung mit ionisierender Strahlung, durch Tyrosin-Kinaseinhibitoren oder durch den Entzug von Wachstumsfaktoren auslösen kann (Erlacher et al., 2006; Yu et al., 2003). Darüber hinaus führt der Tumorsuppressor p14^{ARF} zum Onkogen-vermittelten Stresssignalweg (de Stanchina et al., 1998; Zindy et al., 1998) und ermöglicht die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors p53 durch die Antagonisierung von der E3-Ligase

Hdm-2. Die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors p53 führt schließlich zur transkriptionellen Hochregulation der BH3-only-Proteine Puma, Noxa und Nbk.

In der Literatur werden zwei Modelle zur Aktivierung des Apoptosesignalwegs beschrieben (Abbildung 4). Beim Aktivator-Modell (Kuwana et al., 2005) wird postuliert, dass Bax und Bak durch Bindung von BH3-only-Proteinen aktiviert werden und eine N-terminale Konformationsänderung durchlaufen und dabei zum Mitochondrium translozieren. Jedoch ist die direkte Aktivierung von Bax und Bak durch BH3-only-Proteine durchaus umstritten.

Im Sensitizer-Modell (Chen et al., 2005b) wird hingegen beschrieben, dass BH3-only-Proteine anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder physikalisch binden und antagonisieren können, nicht jedoch Bax bzw. Bak. Anhand unserer Daten favorisieren wir das Sensitizer-Modell. Wir postulieren, dass in der p14^{ARF}-vermittelten, mitochondrialen Apoptose in p53-profizienten Zellen pro-apoptotische BH3-only-Proteine, insbesondere Puma, transkriptionell hochreguliert werden und Bax-abhängige Apoptose auslösen können. Wir konnten keine direkte Bindung von Bax an Puma nachweisen und argumentieren daher gegen das Aktivator-Modell.

Apoptose findet auf multiplen Ebenen statt. Dies zeigt, dass es aus Sicht der Tumorthherapie und Prognose schwerwiegende Folgen haben kann und die Entstehung von malignen Tumoren begünstigt, wenn ein oder mehrere BH3-only-Proteine aufgrund von Verlusten inaktiv sind. Dies könnte zu Resistenzen gegen Apoptose in humanen Tumorzellen führen und zu einem schlechteren Ansprechen auf Tumorthapien. Das verdeutlicht noch einmal den Stellenwert der BH3-only-Proteine bei der Vermittlung der p53-abhängigen, mitochondrialen Apoptose.

6.2 Die p53-unabhängige, p14^{ARF}-vermittelte Apoptose

Es konnte demgegenüber gezeigt werden, dass in p53-defizienten Zellsystemen Apoptose unabhängig von Bax und den BH3-only-Proteinen ausgelöst werden kann und dass allein Bak die p14^{ARF}-induzierte Apoptose vermittelt.

Unsere Daten zeigen, dass nach der Expression von p14^{ARF} sowohl in den Bax-defizienten, als auch in den Bax-profizienten Zellen eine apoptotische DNA-Fragmentierung zu verzeichnen ist und die p14^{ARF}-vermittelte Apoptose unabhängig vom Bax-Status stattfinden kann.

Weiterhin führt die p14^{ARF}-vermittelte Apoptose in p53-defizienten Tumorzellen zu einer N-terminalen Konformationsänderung von Bak, jedoch nicht von Bax.

Bemerkenswert war ferner, dass die pro-apoptotischen BH3-only-Proteine in der p53-unabhängigen Apoptose eine untergeordnete Rolle spielen und nicht auf Proteinebene exprimiert sind, wohl aber eine mRNA-Expression zeigen (Müer et al., 2012).

Die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine Mcl-1 und Bcl-x_L hingegen sind an der Vermittlung der p14^{ARF}-ausgelösten Apoptose in p53-defizienten Zellen maßgeblich beteiligt.

Der Tumorsuppressor p14^{ARF} führt zu einer deutlichen Reduzierung der Proteinkonzentration der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine Mcl-1 und Bcl-x_L.

Bak ist maßgeblich an der Regulation der Apoptose nach der p14^{ARF}-Expression in p53-defizienten Zellen beteiligt und die Re-Expression von Bax sensibilisiert hier nicht für die p14^{ARF}-vermittelte Apoptose. Dies erklärt, dass Bak sowohl mit Mcl-1, als auch mit Bcl-x_L interagieren kann, jedoch nicht mit Bcl-2. Werden sowohl Bcl-x_L, als auch Mcl-1 durch die Bindung von BH3-only-Proteinen neutralisiert, führt dies zur Bak-abhängigen Apoptose (Willis & Adams, 2005).

Dies weist auf folgende Modellvorstellung hin: In p53-profizienten Zellen führt p14^{ARF} zur Stabilisierung von p53, welches hauptsächlich über das BH3-only-Protein Puma und Bax die Apoptose vermittelt (Abbildung 22, links). In p53-defizienten Zellen hemmt p14^{ARF} das anti-apoptotische Protein Mcl-1, welches destabilisiert wird. Möglicherweise beeinflusst p14^{ARF} ebenso direkt die Stabilität von Bcl-x_L. Bak kann folglich nicht mehr durch Mcl-1 oder Bcl-x_L antagonisiert werden, und löst eine mitochondriale Apoptose aus (Abbildung 22, rechts).

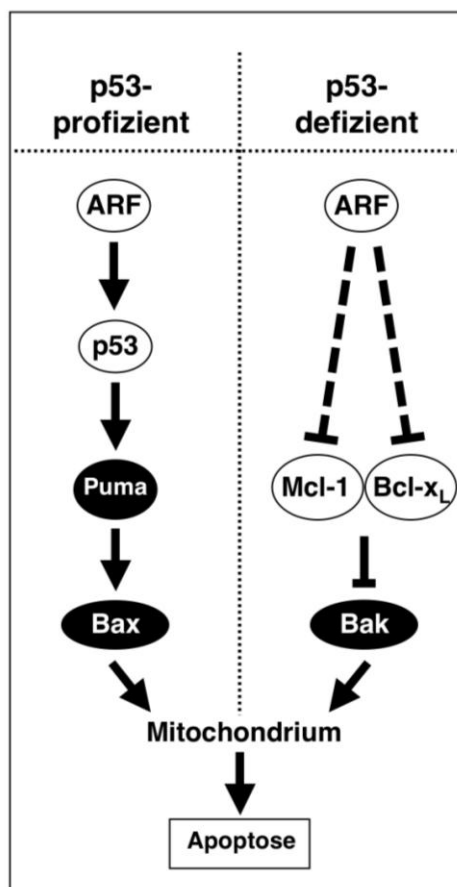


Abbildung 22: Modell für die Expression von p14^{ARF} in p53-profizienten und p53-defizienten Zellen. In p53-profizienten Zellen führt die Stabilisierung von p53 über den Puma/Bax-Signalweg zur Apoptose. In p53-defizienten Zellen hemmt p14^{ARF} die anti-apoptotischen Proteine Mcl-1 und Bcl-x_L und führt zur Vermittlung der Apoptose über Bak.

6.3 Die Rolle der anti-apoptotischen Proteine Mcl-1 und Bcl-x_L in der TRAIL-vermittelten Apoptose sowie in der p14^{ARF}-vermittelten Apoptose

Es konnte durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass der Verlust von Bax zu einer vollständigen Resistenz gegen die TRAIL-Behandlung führt. Eine Bax-abhängige Apoptose konnte nach der Expression des BH3-only-Proteins Nbk und der TRAIL-Behandlung detektiert werden. Dies zeigte sich in der N-terminalen Konformationsänderung von Bax nach der TRAIL-Behandlung, nicht aber von Bak. Möglicherweise antagonisieren hier hohe Proteinkonzentrationen des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 die Funktion von Bak, sodass die Apoptose über Bax vermittelt werden kann. Kommt es zum Verlust von Bax, ist der Apoptosesignalweg dann aufgrund der endogenen Blockade von Bak blockiert. Die Herunterregulation von Mcl-1, als Inhibitor von Bak, durchbricht bei einem Bax-Verlust die Resistenz gegen TRAIL und führt zur Apoptose nach einer Stimulation z.B. durch TRAIL (Gillissen et al., 2010).

Bax und Bak besitzen redundante Funktionen (Degenhardt et al., 2002; Lindsten et al., 2000; Wei et al., 2001). In p53-profizienten Tumorzellen wirken Bax und Bak redundant bei der p14^{ARF}-vermittelten Apoptose. Das heißt, der Verlust von Bax löst keine wesentliche Apoptoseresistenz aus, da Bak den Verlust von Bax kompensieren kann (Hemmati et al., 2006; Normand et al., 2005). Im Gegensatz dazu kompensiert Bak in p53-defizienten Tumorzellen nicht nur für den Verlust von Bax, sondern ist wichtigster Vermittler der Apoptose. Der Verlust von Bax oder Bak allein kann kompensiert werden, jedoch hemmt der kombinierte Verlust von Bax und Bak deutlich die Apoptose (Lindsten et al., 2000; Rathmell et al., 2002; Wei et al., 2001).

Bax wird durch das anti-apoptotisch wirkende Bcl-x_L gehemmt, welches jedoch durch das pro-apoptotische BH3-only-Protein tBid, der aktiven Form von Bid, neutralisiert werden kann (Abbildung 23).

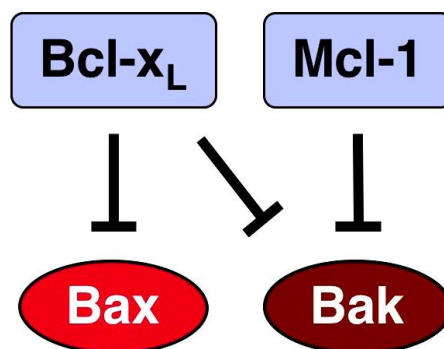


Abbildung 23: Regulation von Bax und Bak durch die anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder. Bax wird durch Bcl-x_L inaktiviert. Bak kann sowohl von Bcl-x_L, als auch von Mcl-1 gehemmt werden (Gillissen et al., 2010).

Jedoch wird in der Literatur beschrieben, dass Bcl-x_L nur in geringem Maße als Regulator der Apoptose gilt (Willis & Adams, 2005), wohingegen Mcl-1 eine wesentliche Rolle bei der Hemmung der N-terminalen Konformationsänderung von Bak spielt (Cuconati et al., 2003; Willis & Adams, 2005). Interessanterweise wird ebenfalls durch unsere Daten deutlich, dass mechanistisch die Herunterregulation von Bcl-x_L keinen Einfluss auf den Bak-Signalweg in der TRAIL-vermittelten Apoptose hat (Gillissen et al., 2010).

Einen maßgeblichen Einfluss auf die Hemmung der Apoptose übt das Bcl-2-Familienmitglied Mcl-1 aus. Hohe Proteinkonzentrationen des Mcl-1-Proteins hemmen die Aktivierung von Bak, bis BH3-only-Proteine, wie beispielsweise Noxa, mit Mcl-1 komplexieren und zu dessen Abbau führen. Die Blockade von Mcl-1 ist daher essentiell in der Bak-vermittelten Apoptose. Es ist möglich, dass die Neutralisierung von Mcl-1 ausreichend ist, um die Apoptose nach der DNA-Schädigung auszulösen (Gelinis & White, 2005; Leu et al., 2004; van Delft et al., 2006; Willis et al., 2007). Unsere Daten weisen darauf hin, dass die Neutralisierung von Mcl-1 entweder durch siRNA oder durch niedermolekulare Inhibitoren, wie Sorafenib oder Roscovitin, Apoptose durch Bak vermitteln kann (Gillissen et al., 2010).

Der Tumorsuppressor p14^{ARF} übt in p53-defizienten Tumorzelllinien ebenfalls eine destabilisierende Wirkung auf Mcl-1 aus, wodurch die hemmende Wirkung von Mcl-1 auf Bak aufgehoben werden kann (Müer et al., 2012). Der Tumorsuppressor p14^{ARF} ist gleichfalls in der Lage, zu einem geringen Anteil Bcl-x_L zu destabilisieren. Der Mechanismus ist jedoch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe. Es wäre denkbar, dass die Stabilisierung von Mcl-1 und Bcl-x_L auf transkriptioneller, translationaler oder post-translationaler Ebene beeinflusst wird. In der Literatur wird beschrieben, dass das Mcl-1-Protein eine nur sehr kurze Halbwertszeit hat und rasch proteosomal abgebaut wird (Yang et al., 1995). Ebenso sind die E3-Ligasen ARF-BP1/Mule (*ARF-binding proteine 1/ Mcl-1-ubiquitin ligase E3*) (Zhong et al., 2005) und β -TrCP (*β -transducin-repeat-containing proteine*) an dem proteosomalen Abbau von Mcl-1 beteiligt. Des Weiteren führt ARF-BP1/Mule wie Hdm-2, zur Destabilisierung von p53 und kann durch p14^{ARF} antagonisiert werden (Sherr, 2006). Die ARF-BP1/Mule-Aktivität weist jedoch keine GSK3 (*Glycogensynthase-3-Kinase*)-abhängige Regulation von Mcl-1 auf (Wertz et al., 2011), die zur Phosphorylierung und somit zum Ubiquitin-abhängigen Abbau von Mcl-1 führt, wohingegen β -TrCP eine GSK3-abhängige Phosphorylierung von Mcl-1 vermittelt. Neuere Daten von Inuzuka et al. (Inuzuka et al., 2011) und Wertz et al. (Wertz et al., 2011) jedoch zeigten, dass sowohl die Herunterregulation von ARF-BP1/Mule, als auch β -TrCP nicht zur Stabilisierung von Mcl-1 führen. Daher vermuten wir ebenfalls, dass ARF-BP1/Mule und β -TrCP nicht an der Destabilisierung von Mcl-1 nach p14^{ARF}-Expression beteiligt sein können. P14^{ARF} ist möglicherweise in der Lage, direkt ARF-BP1/Mule zu antagonisieren. Weiterhin

zeigen neuere Daten, dass Mcl-1 durch die E3-Ligase SCF^{FBW7} (*SKP1-cullin-1-F-box complex that contains FBW7 as the F-box protein*) reguliert wird (Inuzuka et al., 2011). Die E3-Ligase FBW7 bindet an Mcl-1 und führt zur GSK3-abhängigen Phosphorylierung und zum Abbau von Mcl-1 durch Ubiquitinierung. Die Gruppe konnte ebenso zeigen, dass der Verlust von FBW7 zu einer Stabilisierung von Mcl-1 führt, nicht aber beim Verlust von ARF-BP1/Mule und β -TrCP (Inuzuka et al., 2011). Aufgrund unserer Daten in der p14^{ARF}-vermittelten, p53-unabhängigen Apoptose vermuten wir jedoch, dass ein Proteasom-abhängiger Abbau von Mcl-1 ausgeschlossen werden kann. Wir konnten zeigen, dass nach Blockade des Proteasoms durch MG132 Mcl-1 nicht stabilisiert wird. Ferner vermuten wir, dass p14^{ARF} direkt die Neusynthese von Mcl-1 blockiert. Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus und zur Überprüfung der Regulation der Translation von Mcl-1 könnte eine radioaktive Markierung von Aminosäuren (³⁵S-Methionin) beitragen. Die radioaktive Markierung von Proteinen ermöglicht die Ermittlung der Gesamtproteinsynthese und eine exakte Messung der Proteinlebensdauer.

In der Literatur wird beschrieben, dass der Kinaseinhibitor Sorafenib (Bay 43-9006) ebenfalls eine hemmende Wirkung auf Mcl-1 ausübt (Gillissen et al., 2010; Rahmani et al., 2005). Rahmani et al. konnten zeigen, dass die Translation von Mcl-1 inhibiert wird und somit eine Neusynthese von Mcl-1 verhindert wird. Des Weiteren konnte die Gruppe nachweisen, dass eine Dephosphorylierung des Initiationsfaktors eIF4E nach Behandlung mit Sorafenib zu verzeichnen ist. Die Translation ist hauptsächlich in der Initiationsphase reguliert und wird durch verschiedenste Initiationsfaktoren beeinflusst. Hierbei spielt die Bildung eines Initiationskomplexes aus eIF4E, eIF4G und eIF4A eine wesentliche Rolle. EIF4E übernimmt eine essentielle Rolle beim Vermitteln von post-translationalen Modifikationen, wie z.B. die Phosphorylierungen und die Einleitung von Ubiquitinierungen. Sorafenib inhibiert die Phosphorylierung von eIF4E und blockiert somit die Translation. Dies wäre im Einklang mit unserem Befund, dass Sorafenib durch die Hemmung von Mcl-1 für Zelltod sensibilisiert, indem eine Mcl-1-abhängige Wirkung auf Bak antagonisiert wird.

6.4 Ausblick

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass das Antagonisieren von anti-apoptotischen Familienmitgliedern, wie Mcl-1, eine essentielle Rolle bei der Vermittlung der Apoptose spielt. Von großer, klinischer Bedeutung in der Tumorforschung ist es, weitere niedermolekulare Verbindungen, die anti-apoptotische Familienmitglieder inhibieren, zu identifizieren und ihre Wirkungsweise eingehender zu untersuchen. Mit hoher Frequenz weist das Bak-Homolog Bax in einigen Tumoren, wie dem Kolonkarzinom und dem Ovarienkarzinom, Leserastermutationen auf und führt zum schlechten Ansprechen der

Patienten auf Therapiemodalitäten (Sturm et al., 1999; Sturm et al., 2001). Neue, zielgerichtete Therapieansätze sind daher von größter Bedeutung in der Tumorbehandlung. Die Behandlung mit Breitband-Kinaseinhibitoren, wie beispielsweise Staurosporin, zeigt bereits klinisch-positive Ergebnisse (Iglesias-Serret et al., 2003; Rahmani et al., 2005).

Im Gegensatz zu Bax ist Bak jedoch in den meisten Tumoren exprimiert. Daher ist es wichtig, Therapieansätze zu entwickeln, mit denen Bak-Inhibitoren antagonisiert werden können, um gezielte Therapien zu ermöglichen. Niedermolekulare Substanzen, wie beispielsweise Sorafenib oder Roscovitin, können Apoptose durch Bak vermitteln, indem sie das Mcl-1-Protein herunter regulieren (Gillissen et al., 2010). BH3-Mimetika, wie beispielsweise ABT-737, binden nur die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine, Bcl-x_L, Bcl-w und Bcl-2, nicht aber Mcl-1 (Oltersdorf et al., 2005). Zudem vermittelt die Kombinationsbehandlung aus dem Kinase-Inhibitor Sorafenib und aus dem BH3-Mimetikum ABT-737 Zelltod durch Destabilisierung von Mcl-1, nicht aber die alleinige Behandlung mit ABT-737 (Inuzuka et al., 2011). Ebenfalls vermittelt die kombinierte Behandlung von ABT-737 mit Roscovitin Apoptose durch Instabilität von Mcl-1, da hierbei spezifisch die Transkription blockiert wird (MacCallum et al., 2005).

Nicht geklärt werden konnte in dieser Arbeit in diesem Zusammenhang der Aspekt, ob die BH3-only-Proteine auf transkriptionellem oder auf post-translationalem Weg reguliert werden können und ob der Verlust von p53 für den Mangel der transkriptionellen Expression der BH3-only-Proteine verantwortlich ist.

In weiterführenden Versuchen sollte der Stellenwert der p53-Homologe p63 und p73 in p53-defizienten Tumorzellen detaillierter untersucht werden. Es sollte die Fragestellung diskutiert werden, ob p63 und p73 den Verlust von p53 kompensieren und die Funktion als Transkriptionsfaktor für die Aktivierung pro-apoptotischer BH3-only-Proteinen übernehmen könnten.

Wichtig wäre in diesem Zusammenhang auch die Untersuchung hinsichtlich alternativer Zelltodsignalwege, die möglicherweise an der Aktivierung des Zelltods in p53-defizienten Tumorzellen beteiligt sind. Denkbar wären Zelltod-Signalwege, die über das Endoplasmatische Retikulum (ER) vermittelt werden, aber auch die Beteiligung der Autophagie und der mitotischen Katastrophe. Dies ermöglicht weitere funktionelle Einblicke in die Regulation des Zelltods und könnte aus prognostischer Sicht zu vielversprechenden Therapieansätzen in der Tumorbehandlung führen.

7. Abkürzungsverzeichnis

A1	Bcl-2-related protein A1
Ad	Adenovirus
APAF-1	Apoptotic protease activating factor 1
(d)ATP	Desoxyadenosintriphosphat
Bad	Bcl-2-associated agonist of cell death
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-w	Bcl-2-like protein 2
Bcl-x _L	B-cell lymphoma-extra large
BH	Bcl-2 homology (BH) domains
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bim	B-cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death
Bmf	Bcl-2 modifying factor
Bok	Bcl-2-related ovarian killer protein
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxycyclin
Epi	Epirubicin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	Fas associated death domain
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFP	green fluorescent protein
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
h	Stunde
Hdm-2	Human p53 binding protein homolog
Hrk	Harakiri
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin jodid
kDa	Kilodalton
kd	Knock down
Ko	Kontrolle

kV	Kilovolt
Mcl-1	myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1
Min	Minute
mM	Millimolar
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
M.o.i.	Multiplicity of infection
MOMP	Mitochondrial outer membrane permibilization
MW	Mittelwert
μ F	Mikro-Farad
μ g	Mikro-Gramm
μ l	Mikro-Liter
μ m	Mikro-Meter
Nbk/ Bik	Natural born killer/ Bcl-2-interacting killer
nm	Nanometer
NPM	Nucleophosmin
Noxa/ PMAIP1	PMAIP1: phorbol-12-myristate-13-acetate- induced protein 1
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase- chain-reaction)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
Q-vD-OPh	QuinolyI-Val-Asp-OPHh
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulphat
siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAIL	Tumor necrosis factor related apoptosis- inducing ligand
WT	Wildtyp

8. Literatur

- Adams JM and Cory S. (2007). *Oncogene*, **26**, 1324-37.
- Bertwistle D, Sugimoto M and Sherr CJ. (2004). *Mol Cell Biol*, **24**, 985-96.
- Bornkamm GW, Berens C, Kuklik-Roos C, Bechet JM, Laux G, Bachl J, Korndorfer M, Schlee M, Holzel M, Malamoussi A, Chapman RD, Nimmerjahn F, Mautner J, Hillen W, Bujard H and Feuillard J. (2005). *Nucleic Acids Res*, **33**, e137.
- Brady SN, Yu Y, Maggi LB, Jr. and Weber JD. (2004). *Mol Cell Biol*, **24**, 9327-38.
- Calabro V, Mansueto G, Santoro R, Gentilella A, Pollice A, Ghioni P, Guerrini L and La Mantia G. (2004). *Mol Cell Biol*, **24**, 8529-40.
- Chen D, Kon N, Li M, Zhang W, Qin J and Gu W. (2005a). *Cell*, **121**, 1071-83.
- Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM and Huang DC. (2005b). *Mol Cell*, **17**, 393-403.
- Clarke PG. (1990). *Anat Embryol (Berl)*, **181**, 195-213.
- Coultas L and Strasser A. (2003). *Semin Cancer Biol*, **13**, 115-23.
- Cuconati A, Mukherjee C, Perez D and White E. (2003). *Genes Dev*, **17**, 2922-32.
- Daniel NN and Korsmeyer SJ. (2004). *Cell*, **116**, 205-19.
- Daniel PT. (2000). *Leukemia*, **14**, 2035-44.
- Datta A, Nag A, Pan W, Hay N, Gartel AL, Colamonici O, Mori Y and Raychaudhuri P. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 36698-707.
- Datta A, Sen J, Hagen J, Korgaonkar CK, Caffrey M, Quelle DE, Hughes DE, Ackerson TJ, Costa RH and Raychaudhuri P. (2005). *Mol Cell Biol*, **25**, 8024-36.
- de Stanchina E, McCurrach ME, Zindy F, Shieh SY, Ferbeyre G, Samuelson AV, Prives C, Roussel MF, Sherr CJ and Lowe SW. (1998). *Genes Dev*, **12**, 2434-42.
- Degenhardt K, Sundararajan R, Lindsten T, Thompson C and White E. (2002). *J Biol Chem*, **277**, 14127-34.
- Duro D, Bernard O, Della Valle V, Berger R and Larsen CJ. (1995). *Oncogene*, **11**, 21-9.
- Erlacher M, Labi V, Manzl C, Bock G, Tzankov A, Hacker G, Michalak E, Strasser A and Villunger A. (2006). *J Exp Med*, **203**, 2939-51.
- Eymin B, Claverie P, Salon C, Brambilla C, Brambilla E and Gazzeri S. (2006). *Cell Cycle*, **5**, 759-65.
- Eymin B, Karayan L, Seite P, Brambilla C, Brambilla E, Larsen CJ and Gazzeri S. (2001). *Oncogene*, **20**, 1033-41.
- Eymin B, Leduc C, Coll JL, Brambilla E and Gazzeri S. (2003). *Oncogene*, **22**, 1822-35.
- Fatyol K and Szalay AA. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 28421-9.
- Gelinas C and White E. (2005). *Genes Dev*, **19**, 1263-8.

- Gillissen B, Essmann F, Graupner V, Stärck L, Radetzki S, Dörken B, Schulze-Osthoff K and Daniel PT. (2003a). *Embo J*, **22**, 3580-90.
- Gillissen B, Essmann F, Graupner V, Stärck L, Radetzki S, Dörken B, Schulze-Osthoff K and Daniel PT. (2003b). *Embo J*, **22**, 3580-90.
- Gillissen B, Wendt J, Richter A, Richter A, Mürer A, Overkamp T, Gebhardt N, Preissner R, Belka C, Dörken B and Daniel PT. (2010). *J Cell Biol*, **188**, 851-62.
- Green DR and Kroemer G. (2004). *Science*, **305**, 626-9.
- Grisendi S, Mecucci C, Falini B and Pandolfi PP. (2006). *Nat Rev Cancer*, **6**, 493-505.
- Haindl M, Harasim T, Eick D and Muller S. (2008). *EMBO Rep*, **9**, 273-9.
- Hasenjäger A, Gillissen B, Müller A, Normand G, Hemmati PG, Schuler M, Dörken B and Daniel PT. (2004). *Oncogene*, **23**, 4523-35.
- Hemmati PG, Gillissen B, von Haefen C, Wendt J, Stärck L, Güner D, Dörken B and Daniel PT. (2002a). *Oncogene*, **21**, 3149-61.
- Hemmati PG, Gillissen B, von Haefen C, Wendt J, Stärck L, Güner D, Dörken B and Daniel PT. (2002b). *Oncogene*, **21**, 3149-61.
- Hemmati PG, Güner D, Gillissen B, Wendt J, von Haefen C, Chinnadurai G, Dörken B and Daniel PT. (2006). *Oncogene*, **25**, 6582-94.
- Hemmati PG, Mürer A, Gillissen B, Overkamp T, Milojkovic A, Wendt J, Dörken B and Daniel PT. (2010). *J Mol Med*, **88**, 609-22.
- Iglesias-Serret D, Pique M, Gil J, Pons G and Lopez JM. (2003). *Arch Biochem Biophys*, **417**, 141-52.
- Inuzuka H, Shaik S, Onoyama I, Gao D, Tseng A, Maser RS, Zhai B, Wan L, Gutierrez A, Lau AW, Xiao Y, Christie AL, Aster J, Settleman J, Gygi SP, Kung AL, Look T, Nakayama KI, DePinho RA and Wei W. (2011). *Nature*, **471**, 104-9.
- Itahana K, Bhat KP, Jin A, Itahana Y, Hawke D, Kobayashi R and Zhang Y. (2003). *Mol Cell*, **12**, 1151-64.
- Kalinichenko VV, Major ML, Wang X, Petrovic V, Kuechle J, Yoder HM, Dennewitz MB, Shin B, Datta A, Raychaudhuri P and Costa RH. (2004). *Genes Dev*, **18**, 830-50.
- Kannan K, Amariglio N, Rechavi G, Jakob-Hirsch J, Kela I, Kaminski N, Getz G, Domany E and Givol D. (2001a). *Oncogene*, **20**, 2225-34.
- Kannan K, Kaminski N, Rechavi G, Jakob-Hirsch J, Amariglio N and Givol D. (2001b). *Oncogene*, **20**, 3449-55.
- Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR. (1972). *Br J Cancer*, **26**, 239-57.
- Kerr LE, Birse-Archbold JL, Short DM, McGregor AL, Heron I, Macdonald DC, Thompson J, Carlson GJ, Kelly JS, McCulloch J and Sharkey J. (2007). *Oncogene*, **26**, 2554-62.
- Korgaonkar C, Hagen J, Tompkins V, Frazier AA, Allamargot C, Quelle FW and Quelle DE. (2005). *Mol Cell Biol*, **25**, 1258-71.

Kuo ML, den Besten W, Thomas MC and Sherr CJ. (2008). *Cell Cycle*, **7**, 3378-87.

Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR and Newmeyer DD. (2005). *Mol Cell*, **17**, 525-35.

Leu JI, Dumont P, Hafey M, Murphy ME and George DL. (2004). *Nat Cell Biol*, **6**, 443-50.

Levine AJ. (1997). *Cell*, **88**, 323-31.

Li H, Zhu H, Xu CJ and Yuan J. (1998). *Cell*, **94**, 491-501.

Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR and Thompson CB. (2000). *Mol Cell*, **6**, 1389-99.

Lowe SW and Sherr CJ. (2003). *Curr Opin Genet Dev*, **13**, 77-83.

Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T and Thompson CB. (2005). *Cell*, **120**, 237-48.

MacCallum DE, Melville J, Frame S, Watt K, Anderson S, Gianella-Borradori A, Lane DP and Green SR. (2005). *Cancer Res*, **65**, 5399-407.

Mao L, Merlo A, Bedi G, Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ and Sidransky D. (1995). *Cancer Res*, **55**, 2995-7.

Martinou JC and Green DR. (2001). *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 63-7.

Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH and Peter ME. (1997). *Embo J*, **16**, 2794-804.

Moss T, Langlois F, Gagnon-Kugler T and Stefanovsky V. (2007). *Cell Mol Life Sci*, **64**, 29-49.

Müer A, Overkamp T, Gillissen B, Richter A, Pretzsch T, Milojkovic A, Dörken B, Daniel PT and Hemmati P. (2012). *J Biol Chem*.

Nakano K and Vousden KH. (2001). *Mol Cell*, **7**, 683-94.

Nicholson DW. (1999). *Cell Death Differ*, **6**, 1028-42.

Normand G, Hemmati PG, Verdoodt B, von Haefen C, Wendt J, Güner D, May E, Dörken B and Daniel PT. (2005). *J Biol Chem*, **280**, 7118-30.

Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T and Tanaka N. (2000). *Science*, **288**, 1053-8.

Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dinges J, Hajduk PJ, Joseph MK, Kitada S, Korsmeyer SJ, Kunzer AR, Letai A, Li C, Mitten MJ, Nettesheim DG, Ng S, Nimmer PM, O'Connor JM, Oleksijew A, Petros AM, Reed JC, Shen W, Tahir SK, Thompson CB, Tomaselli KJ, Wang B, Wendt MD, Zhang H, Fesik SW and Rosenberg SH. (2005). *Nature*, **435**, 677-81.

- Palaniswamy V, Moraes KC, Wilusz CJ and Wilusz J. (2006). *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 429-35.
- Paliwal S, Pande S, Kovi RC, Sharpless NE, Bardeesy N and Grossman SR. (2006). *Mol Cell Biol*, **26**, 2360-72.
- Palmero I, Pantoja C and Serrano M. (1998). *Nature*, **395**, 125-6.
- Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA and Sherr CJ. (1995). *Cell*, **83**, 993-1000.
- Rahmani M, Davis EM, Bauer C, Dent P and Grant S. (2005). *J Biol Chem*, **280**, 35217-27.
- Rathmell JC, Lindsten T, Zong WX, Cinalli RM and Thompson CB. (2002). *Nat Immunol*, **3**, 932-9.
- Scholz C, Richter A, Lehmann M, Schulze-Osthoff K, Dörken B and Daniel PT. (2005). *Oncogene*, **24**, 7031-42.
- Sherr CJ. (2006). *Nat Rev Cancer*, **6**, 663-73.
- Sherr CJ, Bertwistle D, W DENB, Kuo ML, Sugimoto M, Tago K, Williams RT, Zindy F and Roussel MF. (2005). *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **70**, 129-37.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T and Alnemri ES. (1998). *Mol Cell*, **1**, 949-57.
- Sturm I, Kohne CH, Wolff G, Petrowsky H, Hillebrand T, Hauptmann S, Lorenz M, Dörken B and Daniel PT. (1999). *J Clin Oncol*, **17**, 1364-74.
- Sturm I, Petrowsky H, Volz R, Lorenz M, Radetzki S, Hillebrand T, Wolff G, Hauptmann S, Dörken B and Daniel PT. (2001). *J Clin Oncol*, **19**, 2272-81.
- Sugimoto M, Kuo ML, Roussel MF and Sherr CJ. (2003). *Mol Cell*, **11**, 415-24.
- Tago K, Chiocca S and Sherr CJ. (2005). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 7689-94.
- Taylor WR and Stark GR. (2001). *Oncogene*, **20**, 1803-15.
- van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE, Willis SN, Scott CL, Day CL, Cory S, Adams JM, Roberts AW and Huang DC. (2006). *Cancer Cell*, **10**, 389-99.
- von Haefen C, Gillissen B, Hemmati PG, Wendt J, Güner D, Mrozek A, Belka C, Dörken B and Daniel PT. (2004). *Oncogene*, **23**, 8320-32.
- von Haefen C, Wieder T, Gillissen B, Stärck L, Graupner V, Dörken B and Daniel PT. (2002). *Oncogene*, **21**, 4009-19.
- Warr MR and Shore GC. (2008). *Curr Oncol*, **15**, 256-61.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB and Korsmeyer SJ. (2001). *Science*, **292**, 727-30.
- Wertz IE, Kusam S, Lam C, Okamoto T, Sandoval W, Anderson DJ, Helgason E, Ernst JA, Eby M, Liu J, Belmont LD, Kaminker JS, O'Rourke KM, Pujara K, Kohli PB, Johnson AR, Chiu ML, Lill JR, Jackson PK, Fairbrother WJ, Seshagiri S, Ludlam MJ, Leong KG, Dueber EC, Maecker H, Huang DC and Dixit VM. (2011). *Nature*, **471**, 110-4.

- Willis SN and Adams JM. (2005). *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 617-25.
- Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM and Huang DC. (2007). *Science*, **315**, 856-9.
- Woods YL, Xirodimas DP, Prescott AR, Sparks A, Lane DP and Saville MK. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 50157-66.
- Yang T, Kozopas KM and Craig RW. (1995). *J Cell Biol*, **128**, 1173-84.
- Youle RJ and Strasser A. (2008). *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 47-59.
- Yu J, Wang Z, Kinzler KW, Vogelstein B and Zhang L. (2003). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1931-6.
- Zhong Q, Gao W, Du F and Wang X. (2005). *Cell*, **121**, 1085-95.
- Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ and Roussel MF. (1998). *Genes Dev*, **12**, 2424-33.
- Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ and Thompson CB. (2004). *Genes Dev*, **18**, 1272-82.

9. Anteilserklärung

Die Promovendin Frau Annika Mürer hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1:

Hemmati PG*, Mürer A*, Gillissen B, Overkamp T, Milojkovic A, Wendt J, Dörken B, Daniel PT. **Systematic genetic dissection of p14^{ARF}-mediated mitochondrial cell death signaling reveals a key role for p21^{CDKN1} and the BH3-only protein Puma/bbc3.** J Mol Med. 2010 Jun;88(6):609-22. Epub 2010 Apr 25.

*geteilte Erstautorenschaft

Anteil: 40%

Beitrag im Einzelnen:

Beteiligung an der Planung sowie gesamte Durchführung der folgenden Analysemethoden: Kultivierung der Zellen, adenovirale Transfektion der Zellen, durchflusszytometrische Apoptosemessungen (DNA-Fragmentierung, JC-1-Assay, Bax-/Bak-Konformationsassay, Caspase-Aktivitäts-Assays), Western-Blot-Analysen und Real-time PCR sowie statistische und graphische Auswertung der Ergebnisse. Beteiligung am Verfassen des Manuskripts.

Publikation 2:

Mürer A, Overkamp T, Gillissen B, Richter A, Pretzsch T, Milojkovic A, Dörken B, Daniel PT, Hemmati, P. **p14^{ARF}-induced apoptosis in p53-deficient cells is mediated by the BH3-only protein independent de-repression of Bak through down-regulation of Mcl-1 and Bcl-x_L.** J Biol Chem. 2012 May 18;287(21):17343-52. Epub 2012 Feb 21.

Anteil: 60 %

Beitrag im Einzelnen:

Beteiligung an der Planung sowie gesamte Durchführung der folgenden Analysemethoden: Kultivierung der Zellen, adenovirale Transfektion der Zellen, durchflusszytometrische Apoptosemessungen (DNA-Fragmentierung, JC-1-Assay, Bax-/Bak-Konformationsassay, Caspase-Aktivitäts-Assays), Western-Blot-Analysen, fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, Transfektion der Zellen mit siRNA und Transfektion durch Elektroporation, Herstellung einer stabilen Transfektantenzelllinie, Real-time PCR sowie statistische und graphische Auswertung der Ergebnisse. Beteiligung am Verfassen des Manuskripts.

Publikation 3:

Gillissen B, Wendt J, Richter A, Richter A, **Müer A**, Overkamp T, Gebhardt N, Preissner R, Belka C, Dörken B, Daniel PT. **Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-x_L: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma.** J Cell Biol. 2010 Mar 22;188(6):851-62.

Anteil: 10 %

Beitrag im Einzelnen:

Anteilige Durchführung der durchflusszytometrischen Apoptosemessungen (DNA-Fragmentierung) und Western-Blot-Analyse für Cytochrom C Freisetzung und Caspasespaltung. Statistische und graphische Auswertung der Ergebnisse.

Prof. Dr. med. Peter Daniel

(Doktorvater)

Dipl. Ing. (FH) Annika Müer

(Promovendin)

10. Ausgewählte Publikationen

1. **Systematic genetic dissection of p14^{ARF}-mediated mitochondrial cell death signaling reveals a key role for p21^{CDKN1} and the BH3-only protein Puma/bbc3.**

Hemmati PG*, **Müer A***, Gillissen B, Overkamp T, Milojkovic A, Wendt J, Dörken B, Daniel PT.

J Mol Med. 2010 Jun;88(6):609-22. Epub 2010 Apr 25.

Impact factor: 5,2

*geteilte Erstautorenschaft

2. **p14^{ARF}-induced apoptosis in p53 protein-deficient cells is mediated by BH3-only protein-independent derepression of Bak protein through down-regulation of Mcl-1 and Bcl-x_L proteins.**

Müer A, Overkamp T, Gillissen B, Richter A, Pretzsch T, Milojkovic A, Dörken B, Daniel PT, Hemmati, P.

J Biol Chem. 2012 May 18;287(21):17343-52. Epub 2012 Feb 21.

Impact factor: 5,7

3. **Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-x_L: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma.**

Gillissen B, Wendt J, Richter A, Richter A, **Müer A**, Overkamp T, Gebhardt N, Preissner R, Belka C, Dörken B, Daniel PT.

J Cell Biol. 2010 Mar 22;188(6):851-62.

Impact Factor: 9,6

10.1 Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Publikation 1:

J Mol Med. 2010 Jun;88(6):609-22.

Systematic genetic dissection of p14^{ARF}-mediated mitochondrial cell death signaling reveals a key role for p21^{CDKN1} and the BH3-only protein Puma/bbc3.

Hemmati PG*, Mürer A*, Gillissen B, Overkamp T, Milojkovic A, Wendt J, Dörken B, Daniel PT Department of Hematology, Oncology and Tumor Immunology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Berlin-Buch, Berlin, Germany.

Abstract

Induction of cell death by p14^{ARF} is mediated through a Bax/Bak-dependent mitochondrial apoptosis pathway. To investigate the upstream signaling events required for the activation of Bax and/or Bak and to determine the functional impact of de-regulated cell cycle restriction point control in this context, we genetically dissected the impact of BH3-only proteins and the role of the cyclin-dependent kinase (cdk) inhibitor p21^{CDKN1}. Using isogenic HCT116 colorectal cancer cells, either wild-type or homozygously deleted for the BH3-only protein Puma/bbc3 and/or p21^{CDKN1} or p53-reconstituted DU145 prostate cancer cells, we show that p14^{ARF}-induced apoptosis is attenuated in the absence of Puma. Upon expression of p14^{ARF} in HCT116 cells, Puma is rapidly induced at both the mRNA and protein level. Puma-proficient HCT116 cells undergo apoptotic (nuclear) DNA fragmentation, which is preceded by the N-terminal conformational change of Bax, the breakdown of the mitochondrial membrane potential, and induction of caspase-9 (LEHD)-like and caspase-3/7 (DEVD)-like activities. In contrast, p14^{ARF}-induced apoptosis is markedly attenuated in isogenic HCT116 cells bi-allelically deleted for puma. The sensitivity of Puma-deficient cells to p14^{ARF}-induced apoptosis is fully restored by functional reconstitution of Puma using a conditional adenoviral expression vector. Notably, the concomitant deletion of p21^{CDKN1} strongly enhances p14^{ARF}-induced apoptosis in Puma-proficient cells, but not in isogenic Puma-deficient cells. These results indicate that p14^{ARF}-induced mitochondrial apoptosis critically depends on the BH3-only protein Puma. In the presence of a functional p53/Puma/Bax-signaling axis, p14^{ARF}-triggered apoptosis is enhanced by loss of p21^{CDKN1}-mediated cell cycle checkpoint control.

*geteilte Erstautorenschaft

Impact factor: 5,2

<http://www.springerlink.com/content/e951160u02425527/>

Publikation 2:

J Biol Chem. 2012 May 18;287(21):17343-52. Epub 2012 Feb 21.

p14^{ARF}-induced apoptosis in p53 protein-deficient cells is mediated by BH3-only protein-independent derepression of Bak protein through down-regulation of Mcl-1 and Bcl-x_L proteins.

Müer A, Overkamp T, Gillissen B, Richter A, Pretzsch T, Milojkovic A, Dörken B, Daniel PT, Hemmati, P.

Department of Hematology, Oncology and Tumor Immunology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Berlin-Buch, Berlin, Germany.

Abstract

The p14^{ARF} tumor suppressor plays a central role in regulating cell cycle arrest and apoptosis. We previously reported that p14^{ARF} is capable of triggering apoptosis in a p53-independent manner. The mechanism remained, however, unclear. Here, we demonstrate that the p53-independent activation of the mitochondrial apoptosis pathway by p14^{ARF} is primarily mediated by the pro-apoptotic Bax-homolog Bak. Expression of p14^{ARF} exclusively triggers a N-terminal conformational switch of Bak, but not Bax, which allows for mitochondrial permeability shift, release of cytochrome c, activation of caspases, and subsequent fragmentation of genomic DNA. Whereas forced expression of Bak markedly sensitizes towards p14^{ARF}-induced apoptosis, re-expression of Bax has no effect. *Vice versa*, knock-down of Bak by RNA interference attenuates p14^{ARF}-induced apoptosis, whereas down-regulation of Bax has no effect. Bak activation coincides with a prominent, caspase-independent deprivation of the endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-x_L. In turn, mitochondrial apoptosis is fully blocked by over-expression of either Mcl-1 or Bcl-x_L. Taken together, these data indicate that in the absence of functional p53 and Bax, p14^{ARF} triggers mitochondrial apoptosis signaling by activating Bak, which is facilitated by down-regulating anti-apoptotic Mcl-1 and Bcl-x_L. Moreover, our data suggest that the simultaneous inhibition of two central endogenous Bak inhibitors, i.e. Mcl-1 and Bcl-x_L, may be sufficient to activate mitochondrial apoptosis in the absence of BH3-only protein regulation.

Impact factor: 5,7

<http://www.jbc.org/content/287/21/17343.long>

Publikation 3:

J Cell Biol. 2010 Mar 22;188(6):851-62.

Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-x_L: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma. Gillissen B, Wendt J, Richter A, Richter A, M \ddot{u} er A, Overkamp T, Gebhardt N, Preissner R, Belka C, Dörken B, Daniel PT

Department of Hematology, Oncology, and Tumor Immunology, University Medical Center Charité, Humboldt University, 13125 Berlin, Germany.

Abstract

Tumor necrosis factor (alpha)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is a promising anticancer agent that preferentially kills tumor cells with limited cytotoxicity to nonmalignant cells. However, signaling from death receptors requires amplification via the mitochondrial apoptosis pathway (type II) in the majority of tumor cells. Thus, TRAIL-induced cell death entirely depends on the proapoptotic Bcl-2 family member Bax, which is often lost as a result of epigenetic inactivation or mutations. Consequently, Bax deficiency confers resistance against TRAIL-induced apoptosis. Despite expression of Bak, Bax-deficient cells are resistant to TRAIL-induced apoptosis. In this study, we show that the Bax dependency of TRAIL-induced apoptosis is determined by Mcl-1 but not Bcl-x_L. Both are antiapoptotic Bcl-2 family proteins that keep Bak in check. Nevertheless, knockdown of Mcl-1 but not Bcl-x_L overcame resistance to TRAIL, CD95/FasL and tumor necrosis factor (alpha) death receptor ligation in Bax-deficient cells, and enabled TRAIL to activate Bak, indicating that Mcl-1 rather than Bcl-x_L is a major target for sensitization of Bax-deficient tumors for death receptor-induced apoptosis via the Bak pathway.

Impact Factor: 9,6

<http://jcb.rupress.org/content/188/6/851>

11. Lebenslauf

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

12. Komplette Publikationsliste

1. **Müer A**, Overkamp T, Gillissen B, Richter A, Pretzsch T, Milojkovic A, Dörken B, Daniel PT, Hemmati, P.
p14^{ARF}-induced apoptosis in p53 protein-deficient cells is mediated by BH3-only protein-independent derepression of Bak protein through down-regulation of Mcl-1 and Bcl-x_L proteins.
J Biol Chem. 2012 May 18;287(21):17343-52. Epub 2012 Feb 21.
2. Hemmati PG*, **Müer A***, Gillissen B, Overkamp T, Milojkovic A, Wendt J, Dörken B, Daniel PT. **Systematic genetic dissection of p14^{ARF}-mediated mitochondrial cell death signaling reveals a key role for p21^{CDKN1} and the BH3-only protein Puma/bbc3.**
J Mol Med. 2010 Jun;88(6):609-22.

*geteilte Erstautorenschaft
3. Gillissen B, Wendt J, Richter A, Richter A, **Müer A**, Overkamp T, Gebhardt N, Preissner R, Belka C, Dörken B, Daniel PT. **Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-x_L: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma.**
J Cell Biol. 2010 Mar 22;188(6):851-62.
4. Varon R, **Müer A**, Wagner K, Zierler H, Sodja S, Rauter L, Petek E, Tönnies H, Neitzel H, Sperling K, Kroisel PM. Institute of Human Genetics, Charité, Humboldt University, Berlin, Germany. **Nijmegen breakage syndrome (NBS) due to maternal isodisomy of chromosome 8.**
Am J Med Genet A. 2007 Jan 1;143(1):92-4

12.1 Kongressbeiträge

1) **Vortrag:**

Annika Mür, Philipp G. Hemmati, Tim Overkamp, Ana Milojkovic, Bernhard Gillissen, Dilek Güner, Bernd Dörken, Peter T. Daniel (2006). **Apoptosis induction by p14^{ARF} critically depends on the BH3-only protein PUMA in HCT116 colorectal cancer cells.** European students' conference, Berlin, Deutschland.

2) **Vortrag:**

Annika Mür, Philipp G. Hemmati, Bernhard Gillissen, Tim Overkamp, Jana Wendt, Bernd Dörken, Peter T. Daniel (2007). **Induction of mitochondrial apoptosis by p14^{ARF} critically depends on PUMA in p53-proficient cells.** European Students' Conference, Berlin, Deutschland.

3) **Poster:**

Annika Mür, Philipp G. Hemmati, Bernhard Gillissen, Tim Overkamp, Jana Wendt, Bernd Dörken, Peter T. Daniel (2007). **Regulation of mitochondrial apoptosis signaling by p14^{ARF} critically depends on Puma/Bax in p53-proficient cells.** 15th Euroconference on Apoptosis, Portoroz, Slovenien.

4) **Vortrag:**

Annika Mür, Tim Overkamp, Bernhard Gillissen, Bernd Dörken, Peter T. Daniel, Philipp G. Hemmati (2010). **The p14^{ARF} tumorsuppressor triggers p53-independent apoptosis by preferential down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 Homolog Mcl-1 and subsequent activation of pro-apoptotic Bak.** Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie. Berlin, Deutschland (DGHO).

12.2 Auszeichnungen und Stipendien

Promotionsabschlussstipendium der Charité-Universitätsmedizin Berlin

April 2011 – Juni 2012

Promotionsabschlussstipendium aus dem Hypatia-Programm gefördert durch die Beuth Hochschule für Technik Berlin

Juli 2009 – Dezember 2010

Second winner of the session prize

European students' conference, Berlin.

Oktober 2007

13. Eidesstattliche Erklärung

Erklärung

„Ich, Annika Mürer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **„Funktionelle Charakterisierung des p14^{ARF}-Tumorsuppressorsignalwegs“** selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum _____

Unterschrift _____

14. Danksagung

Herrn Univ.- Prof. Dr. P. Daniel danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Klinischen und Molekularen Onkologie des ECRC, Charité-Universitätsmedizin Berlin, erstellt haben zu dürfen. Für die kompetente Unterstützung und die Förderung meiner Arbeit bin ich sehr dankbar. **Herrn PD Dr. Philipp Hemmati** danke ich besonders für seine fachliche Unterstützung und kompetente Betreuung meiner Arbeit. Dank gilt für das Ausarbeiten vieler Konzepte, zahlreiche fachliche, wöchentliche Diskussionen und gute Ratschläge. Nicht unerwähnt bleiben sollte hier auch die Hilfe am Erstellen der Manuskripte für die Publikationen. Vielen Dank!

Dank gilt auch besonders allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Mitdoktoranden und Diplomanden für die stets erfrischenden Diskussionen, für die Unterstützung auch in schwierigen Lagen und für die immer gute Arbeitsatmosphäre, ohne die man oft auch hätte verzweifeln können. Besonderer Dank gilt hier **Herrn Dr. Bernd Gillissen** und **Frau Dr. Jana Wendt**, die immer eine offene Tür und Ohr boten für Diskussionen, fachlichen Rat und Unterstützung. Besonders danke ich auch **Tim Overkamp** für seine fachliche Unterstützung und guten Ratschläge. Besondere Erwähnung sollten hier auch die Technischen Assistentinnen **Antje** und **Anja Richter** finden. Ich danke hier für die fachlich, kompetente Hilfe und Unterstützung bei zahlreichen Versuchen.

Bei meiner Familie, meinen Eltern **Angelika Mürer-Gasim** und **Hermann Mürer**, möchte ich mich besonders bedanken, für die immer herzliche Unterstützung bei allen meinen Vorhaben über die lange Zeit hinweg. Danke, dass ihr mir fortwährend zugehört habt und mich auch in Tiefen motiviert und unterstützt habt.

Von Herzen sei auch **Hartwig Jost** gedankt. Danke, dass du mich immer wieder in allen Lebenslagen aufgefangen hast, mich uneingeschränkt motiviert und unterstützt hast und immer für mich da warst.

Besonderer Erwähnung gilt den Organisationen, die dieses Projekt durch ihre finanzielle Unterstützung ermöglicht haben - das **Hypatia-Programm der Beuth Hochschule für Technik** für das Promotionsabschlussstipendium. Hier möchte ich besonders Frau **Prof. Dr. Astrid Speer** für ihre Betreuung danken und Frau **Prof. Dr. Monika Gross**, die mich auf die Möglichkeit der Förderung aufmerksam gemacht hat. Des Weiteren danke ich der **Charité-Universitätsmedizin Berlin, Kommission für Nachwuchsförderung** für die Förderung durch ein Promotionsabschlussstipendium.

Letztlich gilt auch Dank der **Deutschen Krebshilfe** und der **Berliner Krebsgesellschaft** für die finanzielle Unterstützung des Projektes.