

**Untersuchungen zur Apoptose-Resistenz
maligner Gliome: molekulare Mechanismen und
neue therapeutische Strategien**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften**

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Holger Hetschko
aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2007

D30

Vom Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität
als Dissertation angenommen.

Dekan: Herr Prof. Dr. Wittig

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Zimmermann

Zweitgutachter: Herr Priv. Doz. Dr. Kögel

Drittgutachter: Herr Priv. Doz. Dr. Laube

Datum der Disputation: 19.10.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Maligne Gliome des Menschen	1
1.2	Der apoptotische und nekrotische Zelltod	2
1.3	Mitochondrien, zentrale Regulatoren des intrinsischen Apoptose-Signalwegs	4
1.4	Die Bcl-2-Proteinfamilie.....	6
1.5	Hypoxie-Adaption von malignen Gliomen.....	7
1.6	Genetik und molekulare Ursachen der Apoptoseresistenz maligner Gliome	8
1.7	TRAIL und der extrinsische Apoptose-Signalweg	9
1.8	TRAIL in der Krebstherapie	11
1.9	Funktion und Rolle des Proteasoms.....	12
1.10	Proteasomeninhibitoren in der Tumorthherapie	14
2	Zielsetzung der Arbeit.....	15
3	Material	16
3.1	Zelllinien.....	16
3.2	Zellkulturmaterial	16
3.3	Antikörper	17
3.3.1	Primär-Antikörper	17
3.3.2	Sekundär-Antikörper und Isotyp-Kontrollen	17
3.4	Oligonukleotide	18
3.5	siRNA-Oligonukleotide.....	18
3.6	DNA-Marker.....	19
3.7	Proteingrößen-Marker.....	19
3.8	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	19
3.9	Zytokine, Inhibitoren und Pharmaka	20
3.10	Kits.....	20
3.11	Enzyme	21
3.12	Laborgeräte	21
3.13	Software	22
4	Methoden.....	23
4.1	Zellbiologische Arbeiten/Zellkultur.....	23
4.1.1	Humane Zelllinien.....	23
4.1.2	Trypsinierung und Subkultivierung adhärent wachsender Zellen.....	23
4.1.3	Bestimmung der Zellzahl	24
4.1.4	Einfrieren von Zellen	24
4.1.5	Auftauen von Zellen.....	24

4.1.6 <i>In vitro</i> -Anoxiemodell.....	24
4.1.7 Bestrahlung von Zellkulturen.....	25
4.2 RNA-Interferenz.....	25
4.3 Durchflusszytometrie.....	26
4.3.1 Rezeptor-Oberflächenexpression.....	27
4.4 Nachweis von Zelltod und mitochondrialer Dysfunktion.....	27
4.4.1 Caspase-Aktivitätsmessung.....	27
4.4.3 Propidiumiodid-Färbung.....	28
4.4.4 Annexin-V-FLUOS-/Propidiumiodid-Doppelfärbung.....	28
4.4.5 TMRM-Färbung.....	29
4.5 Nukleinsäure-Arbeitstechniken.....	30
4.5.1 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
4.5.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	31
4.7 Oligo GEMicroarray-Analyse.....	32
4.7.1 Hybridisierung und Detektion.....	32
4.7.2 Auswertung der Daten.....	32
4.8 Analyse von Proteinen.....	33
4.8.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten.....	33
4.8.2 Proteingehaltsbestimmung von Gesamtzellextrakten.....	33
4.8.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE.....	33
4.8.4 Western Blot.....	35
4.8.5 Immundetektion.....	36
4.8.6 Entfernen von Antikörpern („Stripping“)......	36
4.9 Statistik.....	36
5 Ergebnisse.....	38
5.1 Funktionelle Analyse und Charakterisierung der Zelltod-Induktion in Gliomzelllinien.....	38
5.1.1 Gliomzelllinien zeigen eine hohe Variabilität bezüglich ihrer Anoxie-Toleranz.....	38
5.1.2 Anoxie induziert einen nekrotischen Zelltod in Gliomzellen.....	39
5.1.3 Die Expression Zelltod-promovierender Gene des intrinsischen Signalwegs der Apoptose korreliert nicht mit der Anoxie-Adaption von Gliomzellen.....	41
5.1.4 Die Resistenz gegen den Todesliganden TRAIL ist ein häufiges Phänomen in Gliomzelllinien.....	42
5.1.5 TRAIL induziert einen apoptotischen Zelltod in Gliomzellen.....	43
5.1.6 Die TRAIL-Sensitivität korreliert nicht mit der Expression von TRAIL-assoziierten Todes- und Decoy-Rezeptoren.....	43
5.2 Strategien zur Apoptose-Reaktivierung in Gliomzellen.....	44
5.2.1 Synergistische Wirkung von Gammastrahlung und TRAIL.....	44

5.2.2 BH3-Mimetika	45
5.2.2.1 BH3-Mimetika und TRAIL wirken synergistisch.....	46
5.2.2.2 BH3-Mimetika steigern den Anoxie-induzierten Zelltod.....	49
5.2.3 Transienter Knockdown von Mcl-1 durch RNA-Interferenz	50
5.2.3.1 Mcl-1 trägt nicht zur TRAIL-Resistenz von Gliomzellen bei.....	51
5.2.3.2 Mcl-1 nimmt keinen Einfluß auf den Anoxie-induzierten Zelltod in Gliomzellen.....	51
5.2.4 Proteasomeninhibitoren reaktivieren effektiv TRAIL-induzierte Apoptose	53
5.3 Molekulare Mechanismen der TRAIL-Sensitivierung durch Proteasomeninhibitoren	54
5.3.1 Oligo GEArray-Analyse Proteasomeninhibitor-induzierter Genexpression	55
5.3.2 Proteasomeninhibitoren induzieren potent die Expression von DR5	57
5.3.3 Effekte der Proteasomeninhibition auf die Level anti-apoptotischer Schlüsselfaktoren.	58
5.3.4 Die Proteasomeninhibitor-induzierte Aktivierung von DR5 trägt zur Sensitivierung von Gliomzellen für TRAIL bei.....	59
5.3.5 CHOP ist nicht an der Aktivierung von DR5 und der Sensitivierung für TRAIL nach Proteasomeninhibition beteiligt.....	61
5.3.6 Untersuchungen zur möglichen Rolle von NF- κ B bei der Aktivierung von DR5 nach Proteasomeninhibition.....	62
5.3.7 Der JNK/c-Jun-Signalweg ist maßgeblich an der Proteasomeninhibitor-induzierten DR5-Aktivierung und der Sensitivierung gegenüber TRAIL beteiligt.....	66
6 Diskussion.....	69
6.1 Die Anoxie-Resistenz von Gliomzellen.....	69
6.2 Expression von TRAIL-Rezeptoren und TRAIL-Sensitivität von Gliomzellen.....	70
6.3 Reaktivierung der Apoptose in Gliomzellen: Einsatz von BH3-Mimetika	71
6.4 Sensitivierung von Gliomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose durch Proteasomeninhibitoren	75
Ausblick.....	81
7 Zusammenfassung.....	82
8 Literaturverzeichnis.....	84
9 Abkürzungsverzeichnis	94
Anhang	97
Lebenslauf.....	99
Verzeichnis der akademischen Lehrer	100
Originalarbeiten.....	100
Eingereichte Manuskripte und Manuskripte in Vorbereitung.....	100
Postervorträge und Abstracts	100
Danksagung	101

1 Einleitung

1.1 Maligne Gliome des Menschen

Gliome, Neoplasien glialen Ursprungs, machen 42 % aller primären Tumore des Zentralen Nervensystems (ZNS) aus und 77 % aller malignen primären ZNS-Tumore (Ashby and Ryken 2006). Sie werden von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aufgrund ihrer Morphologie und Histologie in vier für Tumore allgemeingültige Malignitätsgrade eingeteilt (Kleihues et al. 2002). Die am häufigsten diagnostizierten niedergradigen Gliome sind das langsam wachsende und benigne pilozystische Astrozytom (Grad I) und das langsam wachsende aber invasive diffuse Astrozytom (Grad II) (Collins 2004).

Grad III und IV umfassen die Gruppe der malignen Gliome, die häufigsten nicht-metastasierenden humanen Gehirntumore (Rainov et al. 2006). Dazu gehören das anaplastische Astrozytom, das anaplastische Oligoastrozytom und das anaplastische Oligodendrogliom (Grad III) sowie die aggressivste und bösartigste Form des Astrozytoms, das Glioblastom (Glioblastoma multiforme (Grad IV)) (Ashby and Ryken 2006). In letzterem Fall unterscheidet man zwischen primären Glioblastomen, die sich *de novo* entwickeln, und sekundären Glioblastomen, die sich aus einem im Vorfeld diagnostizierten niedergradigen Gliom entwickeln (Collins 2004).

Grad III und IV Gliome treten typischerweise in der lobulären weißen Substanz oder der kortikalen grauen Substanz auf (Rainov et al. 2006). Charakteristisch für anaplastische Astrozytome (Grad III) sind eine erhöhte Zellularität (Nuklei pro Volumeneinheit Gewebe), mitotische Aktivität, nukleare Atypien und eine pleomorphe Zellform. Glioblastome (Grad IV) zeigen eine vergleichsweise höhere Zellularität und ein breiteres zellmorphologisches Spektrum, einschließlich mehrkerniger Riesenzellen. Charakteristisch für Glioblastome sind zudem ausgeprägte Tumornekrosen (vgl. Abschnitt 1.5) (Collins 2004). Allen malignen Gliomen gemein sind schnelle Proliferation, ein hohes migratorisches Potential und ein diffuses, infiltratives Wachstum ins umliegende Hirngewebe (Janus et al. 1992; Ohgaki 2005). Diese Eigenschaften, die mit einer Reihe von genetischen Veränderungen einhergehen (vgl. Abschnitt 1.6), verleihen ihnen eine extrem hohe Therapieresistenz und sind zudem dafür verantwortlich, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt der Diagnose sehr weit in das angrenzende Hirngewebe ausgebreitet haben (Janus et al. 1992; Maher et al. 2001; Mitchell et al. 2005). Hinzu kommt, dass bildgebende Verfahren wie Computertomographie oder Magnetresonanztomographie bei der klaren Abgrenzung zwischen Gliom und umgebendem Hirngewebe an ihre Grenzen stoßen. Sie können lediglich Areale mit einem hohen Anteil an Tumorzellen und einer starken Neoangiogenese sichtbar machen, jedoch nicht die schwächer befallene und entsprechend weniger vaskularisierte Tumorperipherie (Schiffer et al. 1997). Mit Rücksicht auf das angrenzende Hirngewebe ist deshalb trotz des neurochirurgischen Prinzips der „Maximum Safe Resection“ die vollständige Entfernung eines

malignen Glioms nahezu unmöglich. Trotz großer Fortschritte in der medizinischen und chirurgischen Technik und einem zunehmenden Verständnis von der Biologie und Molekulargenetik des Tumors hat sich die Prognose für die betroffenen Patienten in den letzten vier Dekaden nur unwesentlich verbessert. Die mediane Überlebenszeit von Patienten mit malignen Gliomen liegt demnach zwischen 18 und 20 Monaten im Falle eines anaplastischen Astrozytoms und zwischen 8 und 12 Monaten im Falle eines Glioblastoms (Davis et al. 1998; Ohgaki and Kleihues 2005).

Die Standardtherapie für Grad III Gliome umfasst gegenwärtig Resektion und anschließende Radiotherapie, in Einzelfällen begleitet von Chemotherapie (Salcman 1990; Burton and Prados 2000). Im Falle eines primären Glioblastoms (Grad IV) stellte sich heraus, dass die Behandlung mit dem Alkylanz Temozolomid (TMZ) die mittlere Überlebenszeit der Patienten um wenige Monate verlängert. Dazu wird TMZ im Anschluss an den chirurgischen Eingriff in einer kombinierten Radiochemotherapie verabreicht, auf die eine adjuvante TMZ-Behandlung folgt (Stupp et al. 2005; van den Bent et al. 2006). Jedoch profitieren hauptsächlich Patienten mit einer durch Promotor-Methylierung herunterregulierten Methylguanin-methyl-Transferase (MGMT) von dem positiven Effekt der TMZ-Behandlung (Hegi et al. 2005). Trotz intensiver Bemühungen stehen derzeit also lediglich palliative Behandlungsmöglichkeiten für maligne Gliome zur Verfügung. Es zeichnet sich aber der Trend ab, vorhandene Therapiemethoden in multimodale Strategien einzubeziehen, um mit neuen Kombinationstherapien ein Langzeit-Management der Krankheit zu ermöglichen (Ashby and Ryken 2006).

1.2 Der apoptotische und nekrotische Zelltod

Der Zelltod kann in zwei Klassen unterteilt werden, den programmierten Zelltod und den nekrotischen Zelltod. Das wichtigste Kriterium, das den programmierten Zelltod von der Nekrose unterscheidet, ist die Beteiligung aktiver zellulärer Prozesse, die ihrerseits durch die Wechselwirkungen mit intrazellulären Signalen beeinflusst werden können (Jaattela 2004). Anhand der nuklearen Morphologie sterbender Zellen kann der programmierte Zelltod in drei Subklassen eingestuft werden (Leist and Jaattela 2001): (i) Die klassische, Caspase-abhängige Apoptose, gekennzeichnet durch eine kompakte Chromatinkondensierung und Nukleusfragmentierung. (ii) Den Apoptose-ähnlichen programmierten Zelltod, Caspase-unabhängig und charakterisiert durch weniger kompakte, klumpige Chromatinmassen und (iii) den Nekrose-ähnlichen programmierten Zelltod, ebenfalls Caspase-unabhängig und sich entweder durch die Abwesenheit von kondensiertem Chromatin oder das Auftreten loser Chromatinflecken auszeichnend.

In der Folge soll genauer auf die beiden prominentesten Zelltodformen, die Apoptose und die Nekrose eingegangen werden. Gemeinsam haben beiden Formen den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) (Zamzami et al. 1995), die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und die

Depletion von ATP (Kroemer et al. 2007). Die Nekrose wird jedoch seit jeher als passive Form des Zelltods aufgefasst, die mehr einer bioenergetischen Katastrophe gleichkommt, verursacht z.B. durch toxische Insulte, physikalische Beschädigung und völlige ATP-Depletion (Edinger and Thompson 2004). Morphologisch gekennzeichnet ist die Nekrose durch eine Volumenzunahme der Zelle (Onkose), gefolgt von einem Zusammenbruch der Plasmamembran und dem unorganisierten Abbau angeschwollener Organellen. Im Gegensatz zur Apoptose können austretende zytoplasmatische Bestandteile lokale Entzündungsherde verursachen. Der finale Phänotyp nekrotischer Zellen ist jedoch stark von der Art und Schwere der zugrundeliegenden Zellschädigung abhängig (Kroemer et al. 2007).

Apoptose, erstmals 1972 in Hepatozyten beschrieben (Kerr et al. 1972), ist dahingegen ein aktiver zellulärer Prozess, der die geordnete physiologische Eliminierung von Zellen unter Ausschluss entzündlicher Prozesse zum Ziel hat. Apoptose spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen und postembryonalen Entwicklung, der Gewebs-Homöostase (Thompson 1995; Reed 2002), sowie beim Entfernen von überflüssigen, beschädigten oder mutierten Zellen, frei nach dem Motto „lieber tot als fehlerhaft“ (Kroemer et al. 2007). Unterdrückung oder Störung der Apoptose-Aktivierung spielt eine Schlüsselrolle für Onkogenese und Tumor-Progression. Umgekehrt kann ein Übermaß an Apoptose, besonders in postmitotischen Zellen wie Kardiomyozyten oder Neuronen, schwere Krankheiten verursachen. Morphologische Kennzeichen der klassischen, Caspase-abhängigen Apoptose sind das Einschrumpfen der Zelle und die Ausbildung kleiner Membran-umhüllter Körperchen, die Organellen oder Teile des Nukleus einschließen. Ferner kommt es zu einer Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche (Zamzami et al. 1996), sowie Chromatinkondensierung und nuklearer Fragmentierung, die häufig von internukleosomaler DNA-Fragmentierung begleitet wird (Kroemer et al. 2005).

Ein großer Teil dieser morphologischen Veränderungen wird durch die proteolytische Aktivität von spezifischen Proteasen, den sogenannten Caspasen (**Cysteiny-l-aspartat-spezifische Proteasen**) (Alnemri et al. 1996) ausgelöst. Diese liegen im Zytoplasma als inaktive Proenzyme vor und werden durch proteolytische Spaltung an zwei Aspartat-Resten aktiviert. Die aktiven Caspase-Heterodimere können ihrerseits weitere Pro-Caspasen aktivieren und damit eine Caspase-Kaskade initiieren (Slee et al. 1999). An der Exekution der Apoptose sind vor allem die Caspasen-3, -6 und -7 beteiligt, die deshalb auch als „Effektor-Caspasen“ bezeichnet werden (Kroemer et al. 2007). Ihnen gegenüber stehen die Initiator-Caspasen (-8, -9 und -10), deren Hauptaufgabe in der Aktivierung distaler Effektor-Caspasen liegt.

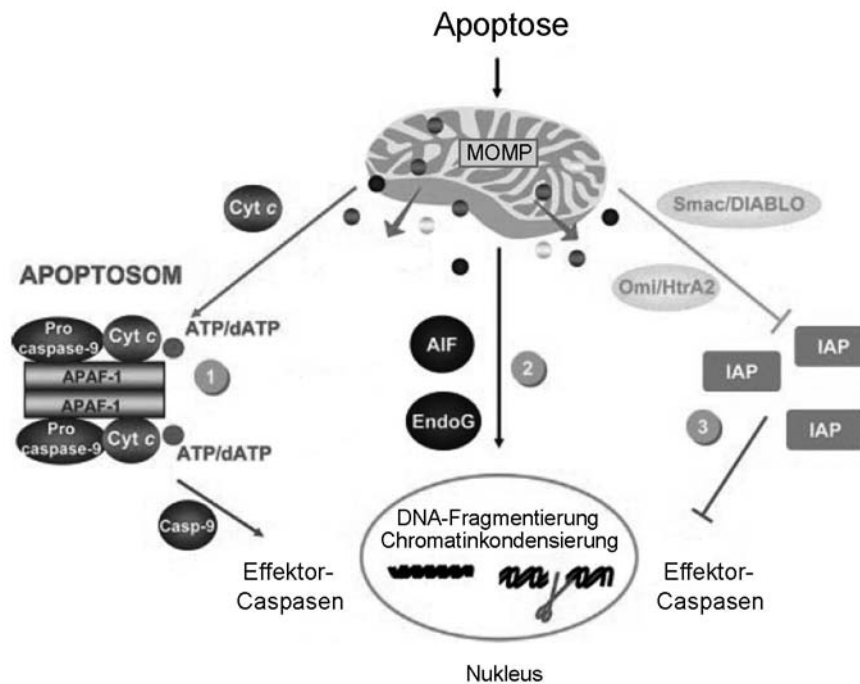


Abbildung 1.1: Das Mitochondrium ist ein integraler Regulator des programmierten Zelltods. Proapoptotische Signale resultieren in einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP) und führen zur Freilassung von Proteinen aus dem mitochondrialen Intermembranraum, darunter Cyt c, AIF, EndoG, Omi/HtrA2 und Smac/Diablo. (1) Cyt c fördert die Assemblierung des Apoptosoms, einer molekularen Plattform zur Aktivierung der Aktivator-Caspase-9, die stromabwärts gelegene Effektor-Caspasen spaltet. (2) AIF und EndoG translokalisieren aus dem Zytosol in den Nucleus, wo sie DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensierung induzieren. (3) Smac/Diablo und Omi/HtrA2 fördern Apoptose durch die Inhibition von IAP-Proteinen, die durch ihre Effektor-Caspasen-inhibierende Aktivität anti-apoptotisch wirken. Abbildung modifiziert nach Kroemer et al., 2007.

1.3 Mitochondrien, zentrale Regulatoren des intrinsischen Apoptose-Signalwegs

Der Prozess der Apoptose kann durch eine Vielzahl von Stimuli bzw. Signalen initiiert werden. Dabei unterscheidet man grundsätzlich zwischen dem Stress-induzierten mitochondrialen Apoptose-Signalweg (intrinsisch) und dem Todesrezeptor-vermittelten Signalweg (extrinsisch) (Kroemer et al. 2007). Bei der Regulation des programmierten Zelltods spielen die Mitochondrien eine zentrale Rolle (Abbildung 1.1). Im Falle der Caspase-abhängigen Apoptose ist die Aktivierung von Caspasen eng an die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP, engl. Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization) gekoppelt (Green and Kroemer 2004), die zur Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum führt. Dazu gehört Cytochrom c (Cyt c), das mit dem Apoptotic Peptidase Activating Factor-1 (Apaf-1) und ATP oder dATP einen makromolekularen Komplex, das sogenannte Apoptosom, bildet. Das Apoptosom rekrutiert und aktiviert Pro-Caspase-9, die ihrerseits in der Folge weitere Pro-Caspase-9-Moleküle sowie die Effektor-Caspasen-3 und -7 proteolytisch aktiviert (Zou et al. 1999). Weitere Faktoren, die neben Cyt c ins Zytoplasma entlassen werden, sind der Second Mitochondria-derived

Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low pI (Smac/Diablo), Omi/HtrA2 und Endonuclease G (EndoG). Smac/DIABOLO und Omi/HtrA2 fällt die Aufgabe zu, Proteine der Inhibitor of Apoptosis (IAP)-Familie zu neutralisieren, die im Sinne einer zellulären Sicherheitsvorkehrung Caspase-inhibierend wirken. Omi/HtrA2 wird mit der Initiierung eines Nekrose-ähnlichen programmierten Zelltods in Verbindung gebracht (Jaattela 2004). Der Apoptosis Inducing Factor (AIF) löst ähnlich wie EndoG einen Caspase-unabhängigen Zelltod aus, der in DNA-Fragmentierung und einer Chromatinkondensierung mündet, die charakteristisch für den Apoptose-ähnlichen programmierten Zelltod ist (Jaattela 2004; Kroemer et al. 2007).

Auch die innere Mitochondrienmembran kann an der Permeabilisierung der äußeren Membran beteiligt sein. In diesem Fall bilden makromolekulare Komponenten der inneren Membran und der Matrix, darunter Adenine Nucleotide Transferase (ANT) und Cyclophilin-D, mit dem Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) und weiteren Bestandteilen in der äußeren Membran einen Kanal, die sogenannte mitochondriale „Permeability Transition Pore“ (PTP) (Crompton 1999; Green and Kroemer 2004). Die Induktion der PTP verursacht eine Depolarisierung des Mitochondriums. Der infolge dessen ungehinderte bidirektionale Protonenfluss bringt schließlich die ATP-Produktion der F_0F_1 -ATP-Synthase zum Erliegen. Ferner kommt es zum Ausstrom von Ca^{2+} und kleinen Molekülen, darunter das Antioxidant Glutathion, was eine Zunahme reaktiver Oxygen-Spezies (ROS) zur Folge hat. Umgekehrt strömen kleine Moleküle ein, steigern die osmotische Last der mitochondrialen Matrix und bewirken durch nachströmendes Wasser ein Anschwellen des Mitochondriums, das in einem Aufreißen der äußeren Membran und der Freisetzung von Cyt c gipfeln kann (Crompton 1999; Kroemer et al. 2007).

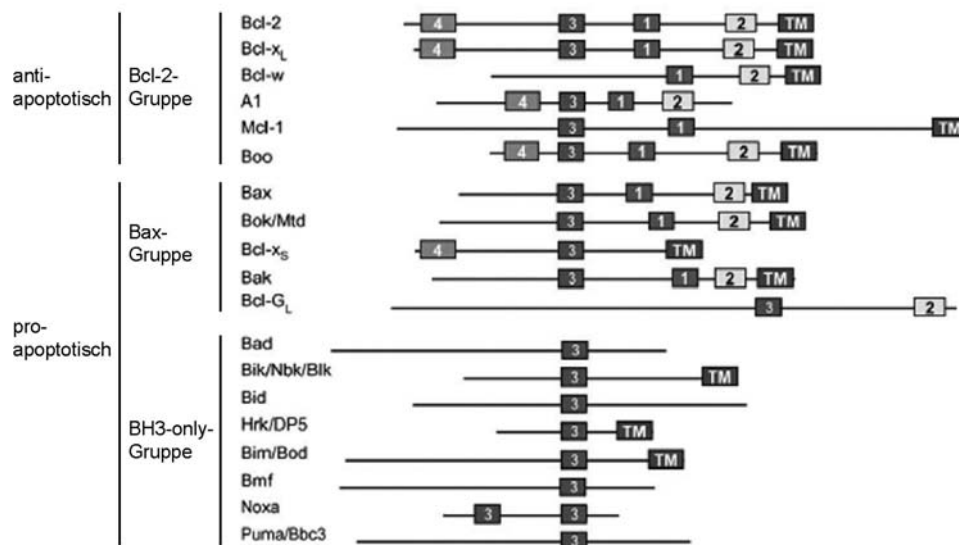


Abbildung 1.2: Überblick einer Auswahl von Bcl-2-Familienmitgliedern. Die Bcl-2-Homologiedomänen 1 bis 4 (BH1-4) und die transmembrane C-terminale Domäne (TM), die die Integration in intrazelluläre Membranen (Mitochondrien, Nukleus, ER) vermittelt, sind schematisch dargestellt. Abbildung modifiziert nach Coultas et al., 2003.

1.4 Die Bcl-2-Proteinfamilie

Für die Regulation der MOMP spielen die Mitglieder der B-Cell Lymphoma 2 (Bcl-2)-Proteinfamilie eine herausragende Rolle (Green and Kroemer 2004). Diese können drei Untergruppen zugeordnet werden, der Bcl-2-, der Bax- und der BH3-only-Gruppe (Coultas and Strasser 2003) (Abbildung 1.2). Allen Bcl-2-Familienmitgliedern sind eine oder mehrere konservierte Domänen gemein, die sogenannten Bcl-2-Homologie (BH)-Domänen. Diese weisen charakteristische α -helikale Strukturen auf und sind mit den Bezeichnungen BH1-BH4 versehen (Hengartner 2000) (Abbildung 1.2).

Zur anti-apoptotischen Bcl-2-Gruppe, die strukturell durch mehrere BH-Domänen und eine C-terminale hydrophobe Domäne charakterisiert ist, gehören u.a. Bcl-2 (BH1-4) (Tsujimoto et al. 1985), Bcl-xL (BH1-4) (Boise et al. 1993) und Mcl-1 (BH1 und BH3) (Kozopas et al. 1993). Während die C-terminale Domäne bei allen Vertretern dieser Gruppe die Integration in die Membran von Zellorganellen (z.B. Mitochondrien, Endoplasmatisches Retikulum (ER) und Nukleus) ermöglicht, bilden die BH-Domänen 1-3 im Falle von Bcl-2 und Bcl-xL eine hydrophobe Tasche, die eine direkte Interaktion mit der BH3-Domäne pro-apoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder erlaubt (Muchmore et al. 1996). Anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Gruppe werden in zahlreichen Krebs-Zelllinien und primären Tumoren, darunter auch maligne Gliome, überexprimiert (Kroemer 1997; Fels et al. 2000).

Proteine der pro-apoptotischen Bax-Gruppe können, basierend auf der Anzahl ihrer BH-Domänen, in zwei weitere Untergruppen aufgeteilt werden: Solche mit den Domänen BH1-3 und

solche mit weniger BH-Domänen. Die beiden wichtigsten Vertreter der Bax-Gruppe, Bak und Bax, gehören zu ersten Untergruppe und werden deshalb auch als Multidomänen-Proteine bezeichnet (Green and Kroemer 2004). Während Bak auch in vitalen Zellen ein oligomeres integrales Membranprotein der Mitochondrien und des ER ist, liegt Bax meist im Zytoplasma vor und translokalisiert erst infolge pro-apoptotischer Signale und konformationeller Änderungen zum Mitochondrium bzw. zum ER (Cory et al. 2003). Man vermutet, dass die beiden dort durch Homooligomerisierung Kanäle bilden, die wie oben beschrieben für die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP) und den Efflux Apoptose-promovierender Moleküle aus dem Intermembranraum verantwortlich sind (Cory and Adams 2002). Zudem wurde berichtet, dass die Interaktion zwischen Bax und VDAC eine MOMP verursacht (Crompton 1999; Zamzami and Kroemer 2001), während die Bak/VDAC-Interaktion Zelltod-inhibierend wirkt (Cheng et al. 2003).

Die ausschließlich Zelltod-promovierenden Vertreter der BH3-only-Gruppe sind durch eine einzelne 9-16 Aminosäuren lange BH3-Domäne gekennzeichnet. Ihre Funktion besteht in der Kopplung zahlreicher Stress- und Todessignale mit dem mitochondrialen Zelltodprogramm (Puthalakath and Strasser 2002). So kann z.B. Bid infolge TNF-Rezeptor-vermittelter Signale oder durch Cathepsine proteolytisch aktiviert werden, Bim und Bmf durch Beschädigungen des Zytoskeletts bzw. Aktivierung des JNK/c-Jun-Signalwegs und Puma und Noxa durch p53 in Folge von DNA-Schäden (Jaattela 2004). Ihre Wirkung entfalten BH3-only-Proteine vereinfacht gesagt entweder als Aktivatoren von Bak und Bax (z.B. Bid und Bim) oder als Inhibitoren von anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Gruppe (z.B. Bad und Bik) (Green and Kroemer 2004). Die beiden BH3-only Proteine Bik und Bnip3 nehmen eine Ausnahmestellung ein, da sie in der Lage sind, auch Caspase-unabhängige bzw. autophagische Zelltodprogramme zu initiieren (Vande Velde et al. 2000; Oppermann et al. 2005).

1.5 Hypoxie-Adaption von malignen Gliomen

Der Begriff Hypoxie beschreibt in der Medizin den pathologischen Zustand der Unterversorgung eines Organs oder Gewebes mit Sauerstoff. Eine Hypoxie, die durch die vollständige Abwesenheit von Sauerstoff gekennzeichnet ist, wird als Anoxie bezeichnet. In soliden Tumoren entsteht chronische Hypoxie durch ein Ungleichgewicht zwischen hoher Proliferationsaktivität und ungenügender vaskulärer Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen (Semenza 2003). Fluktuationen in der Sauerstoffversorgung werden von Tumorzellen in der Regel durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF)-1 beantwortet (Michiels 2004). Neben anti-tumorigen wirkenden Komponenten des intrinsischen Apoptose-Signalwegs wie p53, Bnip3 und Noxa (Acker and Plate 2002; Greijer and van der Wall 2004; Kim et al. 2004a) reguliert HIF-1 in der Hauptsache die Expression etlicher Faktoren, die das Zellüberleben unter hypoxischen Bedingungen fördern. Darunter sind zahlreiche Proteine, die den

intrazellulären pH-Wert regulieren (Carbonische Anhydrase), die glykolytische Kapazität der Zelle steigern (Glukosetransporter, Enzyme der Glykolyse), und die Angiogenese stimulieren (VEGF, IL-8) (Zhong et al. 1999; Acker and Plate 2002; Rong et al. 2006). Entsprechend führt der Selektionsdruck in hypoxischen Arealen bereits in frühen Stadien der Tumorigenese zur Entwicklung von Hypoxie-adaptierten Klonen und Neoangiogenese (Steinbach et al. 2005).

Die Anpassung an niedrige Sauerstoffverhältnisse wird mit verschiedenen phänotypischen Veränderungen in Verbindung gebracht, die fundamental für die maligne Progression von Tumoren sind und die Wahrscheinlichkeit von Metastasenbildung, Rezidiven und einer Resistenz gegenüber Chemotherapie und Strahlentherapie erhöhen (Jensen 2006).

Hochgradige Gliome und insbesondere Glioblastome sind trotz ausgeprägter Vaskularisierung durch extensive Hypoxie gekennzeichnet (Rampling et al. 1994; Collingridge et al. 1999), was auf eine funktionell ineffiziente Mikrozirkulation des Blutes zurückgeführt wird (Jain 1988; Vajkoczy and Menger 2004). In malignen Gliomen und peritumoralem Hirngewebe wurden Sauerstoff-Partialdrücke von $< 2,5$ mm Hg gemessen (Collingridge et al. 1999).

Glioblastome sind unabhängig vom Tumordurchmesser durch große Zonen intratumoraler Nekrosen charakterisiert. Diese Zonen werden von Tumorzellen umgeben, die verstärkt VEGF sekretieren und Strukturen ausbilden, die als Pseudopallisaden bezeichnet werden (Tohma et al. 1998; Brat et al. 2004). Apoptotischer Zelltod ist in diesen Regionen dagegen selten (Steinbach and Weller 2002), was auf die Hypoxie-induzierte Selektion Apoptose-resistenter Phänotypen schließen lässt.

Da die Wirkung vieler Chemotherapeutika im Wesentlichen auf der Induktion von Apoptose beruht, geht die erworbene Apoptose-Resistenz maligner Gliome mit einer verminderten Sensitivität gegenüber Chemotherapie einher. In Hinblick auf eine optimierte chemotherapeutische Behandlung sind deshalb detaillierte Kenntnisse der betroffenen Zelltod-Signalwege und ihrer Veränderungen unerlässlich.

1.6 Genetik und molekulare Ursachen der Apoptoseresistenz maligner Gliome

Tumore entstehen durch genetische Veränderungen, die normale Wachstum-kontrollierende Mechanismen aushebeln und den betreffenden Zellen *in vivo* einen Wachstumsvorteil verschaffen. Dabei umfasst die Tumorigenese eine Reihe von Ereignissen, die das Genom einer somatischen Zelle derart beschädigen, dass letztlich daraus ein maligner Phänotyp resultiert. Die maligne Progression eines Tumors wurde erstmals in Darmkrebszellen ausführlich dokumentiert, was durch das Auftreten sporadischer und hereditärer Fälle und den direkten Vergleichen von transformierten und gesunden Darmepithelzellen begünstigt wurde (Bishop and Hall 1994; Thomas 1994).

In anaplastischen Astrozytomen (Grad III) ist in mehr als 60 % der Fälle der p53-Signalweg aufgrund einer Mutation des p53-Gens gestört. Zusätzlich zu den für Grad II Astrozytome typischen Allel-Einbußen auf 6q, 13q, 17p und 22q wird häufig das Allel auf 19q verloren (die betroffenen Gene sind unbekannt) (Collins 2004). Zudem treten in 20 % der Fälle genetische Abnormalitäten auf, die typisch für Glioblastome (Grad IV) sind und andere Komponenten des p53-Signalwegs (MDM2 und p14^{ARF}, siehe unten) und den Retinoblastoma 1 (Rb1)-Signalweg betreffen (Ichimura et al. 1996).

Mehr als 70 % aller Glioblastome (Grad IV) exprimieren entweder kein Wildtyp-p53, kein p14^{ARF} oder überexprimieren MDM2 (Ichimura et al. 2000). P14^{ARF} reguliert die Aktivität von MDM2, das als E3-Ubiquitin-Ligase und direkter Repressor von p53 fungiert (Roth et al. 1998; Lowe and Sherr 2003). In den meisten Glioblastomen ist Rb-1, das den Eintritt des Zellzyklus in die S-Phase kontrolliert, inaktiviert (Ichimura et al. 2000). Ebenso häufig verlieren Glioblastome Allele von 10q, auf denen das Tumorsuppressor-Gen „Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten“ (PTEN), eine AKT-Signalwegs-inhibierende Phosphatase, liegt (Steinbach and Weller 2004). Entsprechend ist der Phosphoinositol 3 (PI3)-Kinase/AKT-Signalweg in diesen Zellen überaktiviert, was u.a. die Aktivierung von HIF-1 (vgl. Abschnitt 1.5) fördert und die Apoptose-Induktion hemmt (Zundel et al. 2000).

Die Überexpression von Oncogenen der Bcl-2- und IAP-Familie trägt zusätzlich, sowohl in anaplastischen Astrozytomen (Grad III) als auch Glioblastomen (Grad VI), zu einer Blockade der Apoptose-Signalwege bei (Steinbach and Weller 2004). Weitere wichtige Onkogene bzw. anti-apoptotisch wirkende Faktoren, die in Glioblastomen amplifiziert sind, konstitutiv aktiv sind oder überexprimiert werden, sind der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und der Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), sowie ihre Rezeptoren (Collins 2004; Ohgaki et al. 2004).

1.7 TRAIL und der extrinsische Apoptose-Signalweg

Der Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL/Apo2L) ist ein Typ II Membranprotein aus der Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Superfamilie, das auf der Oberfläche von Lymphozyten und vielen Krebszellen als Homotrimer exprimiert wird (Wiley et al. 1995; Pitti et al. 1996) und Vesikel-assoziiert oder nach Abspaltung in löslicher Form in die Zellumgebung abgegeben wird (Rowinsky 2005). Ursprünglich wurde TRAIL aufgrund seiner Homologie zu FasL und TNF identifiziert (Wiley et al. 1995). Wie andere Liganden der TNF-Familie interagiert TRAIL mit distinkten Oberflächenrezeptoren und initiiert damit den Rezeptor-vermittelten, extrinsischen Apoptose-Signalweg. Im Menschen wurden bislang fünf TRAIL-Rezeptoren beschrieben, alle Mitglieder der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor (TNFR)-Superfamilie. Die Todesrezeptoren DR4 (TRAIL-R1) und DR5 (TRAIL-R2) verfügen über eine intrazelluläre Todesdomäne, über die sie den extrinsischen Apoptose-Signalweg nach Ligation von TRAIL

induzieren können. DcR1 (TRAIL-R3) und DcR2 (TRAIL-R4) sind hingegen sogenannte Decoy-Rezeptoren, die aufgrund ihrer fehlenden bzw. nur unvollständigen Todesdomäne nicht funktionell sind und keine Zelltod-promovierenden Signale ins Zellinnere weiterleiten (Kimberley and Screaton 2004). Alle vier Rezeptoren sind transmembrane Proteine vom Typ I und durch hochkonservierte Cystein-reiche Abschnitte in der extrazellulären Domänen charakterisiert. Der fünfte TRAIL-Rezeptor, Osteoprotegerin (OPG), ebenfalls ein Decoy-Rezeptor, wird von der Zelle in löslicher Form sekretiert. Im Gegensatz zu den anderen vier bekannten TRAIL-Rezeptoren, die Homotrimere bilden, ist OPG ein Dimer (Emery et al. 1998).

Der Todesrezeptor DR5 ist zu 58 % mit DR4 homolog (Kimberley and Screaton 2004) und tritt in zwei Splicevarianten auf, die sich durch einen 23 Aminosäuren umfassenden Abschnitt voneinander unterscheiden (Screaton et al. 1997). In Folge der Anhäufung von Todesdomänen löst die erzwungene Überexpression von DR5 spontan Zelltod aus (Screaton et al. 1997). Jedoch können DR5 und DR4 auch Signalwege aktivieren, die das Überleben der Zelle fördern (siehe unten).

Der genaue Ablauf der TRAIL/Rezeptor-Interaktion ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Untersuchungen an Kristallkomplexen anderer TNF-Liganden legen aber ein Modell nahe, in dem der trimere Ligand drei Rezeptor-Monomere rekrutiert (Kimberley and Screaton 2004). Hingegen schlagen Studien an den TNF-Rezeptoren Fas und TNFR1 eine Liganden-unabhängige Oligomerisierung vor, die von einer als Pre-Ligand Assembly-Domain (PLAD) bezeichneten extrazellulären Region vermittelt wird (Hymowitz et al. 1999; Siegel et al. 2000). Fest steht hingegen, dass die intrazelluläre Rezeptor-Todesdomäne in Folge der extrazellulären Bindung von TRAIL unterschiedliche Adaptorproteine rekrutiert und den sogenannten Death Inducing Signaling Complex (DISC) bildet (Abbildung 1.3). Initial wird dazu das Adaptorproteine FADD rekrutiert, das, wie kürzlich gezeigt (Thomas et al. 2004), über seine Todes-Effektordomäne sowohl die Todesdomäne des Rezeptor-Trimers als auch die Todes-Effektordomäne der Pro-Caspasen-8 und -10 bindet, die im Zuge dieser Oligomerisierung zu einer autokatalytischen Spaltung angeregt werden. Die Todesdomänen-vermittelte Rekrutierung von TRADD hingegen führt über das Rezeptor-interagierende Protein (RIP) zur Bindung von TRAF-2, das wiederum Signalwege induziert, die in die Aktivierung von NF- κ B und c-Jun münden (Kimberley and Screaton 2004). Die DR4- und DR5-vermittelte NF- κ B-Induktion ist jedoch nicht hinreichend, um TRAIL-induzierte Apoptose zu inhibieren (Hu et al. 1999).

Nach der TRAIL-induzierten Aktivierung der apikalen Caspasen-8 und -10 spalten diese die Effektor-Caspasen-3 und -7 (Srivastava 2001). In vielen Zelltypen bedarf es für eine effektive Effektor-Caspasen-Aktivierung einer zusätzlichen Verstärkung des apoptotischen Signals über den mitochondrialen Signalweg (LeBlanc et al. 2002; LeBlanc and Ashkenazi 2003). Dieses „Zwiesgespräch“ der beiden Signalwege (extrinsisch und intrinsisch) wird u.a. durch die Caspase-8-induzierte Spaltung von Bid initiiert (Abbildung 1.3). Das gespaltene Bid-Fragment (tBid)

translokalisiert zu den Mitochondrien, wo es Bax aktiviert und damit die MOMP auslöst (Li et al. 1998; Broaddus et al. 2005).

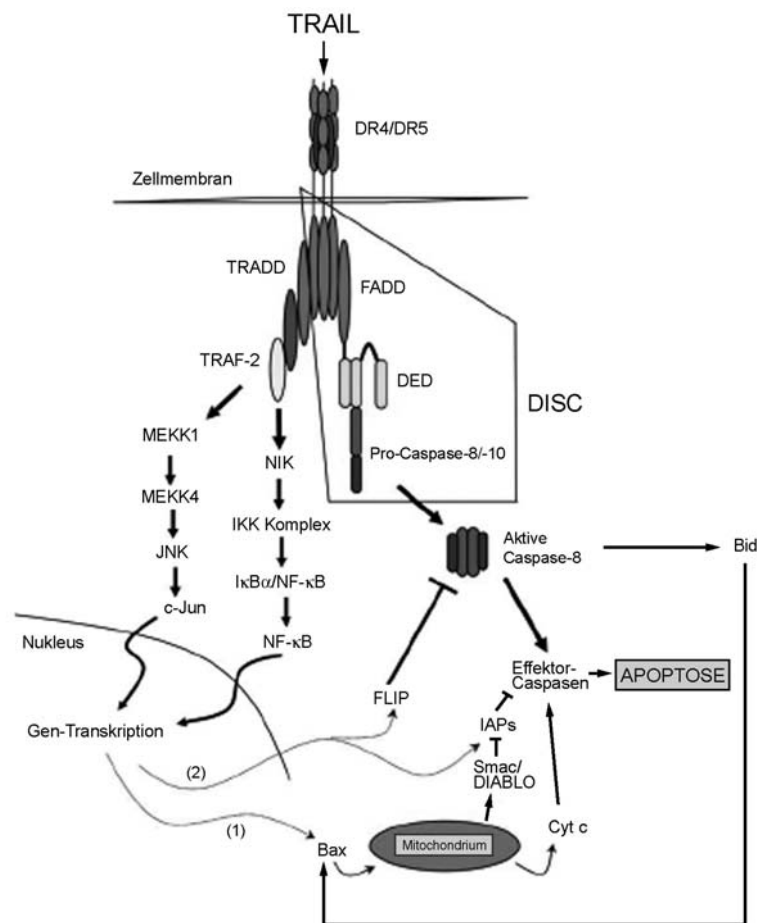


Abbildung 1.3: TRAIL-Rezeptor-vermittelte Signalwege. Über die TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 wird nach TRAIL-Bindung Apoptose über den extrinsischen Signalweg induziert. Dieser ist über Bid, das von Caspase-8 durch Spaltung aktiviert wird, mit dem mitochondrialen Signalweg gekoppelt. Zudem werden die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und c-Jun aktiviert. Während c-Jun das Apoptose-Signal über den mitochondrialen Signalweg verstärken kann (1) aktiviert NF- κ B in der Hauptsache anti-apoptotische Faktoren (2). Abbildung modifiziert nach Kimberly, 2004.

1.8 TRAIL in der Krebstherapie

Bislang konnte die biologische Rolle von TRAIL unter physiologischen Bedingungen nicht zweifelsfrei geklärt werden. Beispielsweise wurden Vermutungen, TRAIL sei ein Mediator der negativen Selektion unreifer Thymozyten ebenso kontrovers diskutiert (Cretney et al. 2003; Lamhamedi-Cherradi et al. 2003) wie die Hypothesen, TRAIL fungiere als negativer Regulator der Erythropoese (Zamai et al. 2000) oder sei an der Beseitigung von B-Zellen beteiligt (Ursini-Siegel et al. 2002; Kimberly and Screaton 2004). TRAIL^{-/-}-Mäuse entwickeln sich normal und zeigen keine spontane Tumorbildung. Nach Injektion von TRAIL-sensitiven Krebszellen entwickeln sie jedoch deutlich schneller Tumore (hauptsächlich in der Leber) als Wildtyp-Mäuse (Sedger et al. 2002). Die Tatsache, dass Mäuse nur einen einzigen DR5-homologen TRAIL-Rezeptor

exprimieren (Wu et al. 1999), limitiert jedoch nachhaltig die Aussagekraft von Mausmodellen und erschwert dementsprechend die Erforschung der physiologischen Rolle von TRAIL.

Zahlreiche präklinische Studien konnten demonstrieren, dass TRAIL in einer breit gefächerten Auswahl maligner Tumore Wachstums-inhibierend und zytotoxisch wirkt (Rieger et al. 1998a; Gazitt 1999; Keane et al. 1999), während die meisten nicht-transformierte Zellen offensichtlich resistent gegenüber TRAIL-Aktivierung sind (Fulda et al. 2002b; Shankar and Srivastava 2004; Song et al. 2006). Diese selektive Tumorzytotoxizität macht TRAIL zu einem vielversprechenden Kandidaten für neue Apoptose-induzierende Krebstherapien.

Die in einigen Studien beobachtete toxische Wirkung von rekombinatem TRAIL, welches mit terminalen FLAG- oder His-Sequenzen fusioniert wurde, auf normales Gewebe (Jo et al. 2000; Nitsch et al. 2000) scheint maßgeblich der molekularen Struktur der verwendeten TRAIL-Derivate geschuldet zu sein. So wurde gezeigt, dass rekombinante humane TRAIL-Moleküle (Apo2L/TRAIL.0) durch Zink stabilisiert effektiver trimerisieren und ohne exogene Aminosäuresequenz-Markierung weder in *in vitro* Modellen (Lawrence et al. 2001; Fulda et al. 2002b) noch in Primaten *in vivo* zytotoxisch wirken (de Vries et al. 2000; Lawrence et al. 2001). In diesem Zusammenhang rücken auch monoklonale TRAIL-Rezeptor-agonisierende Antikörper in den Fokus, die TRAIL nachahmen und eine Todesrezeptor-abhängige Apoptose aktivieren, ohne somatische Zellen zu beeinträchtigen (Ichikawa et al. 2001). Ihre Spezifität für einen Todesrezeptor schließt zudem den potentiell störenden Einfluss von Decoy-Rezeptoren aus. Erst kürzlich wurde berichtet, dass HGS-ETR1 und HGS-ETR2, zwei monoklonale agonistische DR4- bzw. DR5-Antikörper, Darmkrebszellen *in vitro* und *in vivo* signifikant für ionisierende Strahlung sensitivieren können (Marini et al. 2006).

Die Tatsache, dass einige Tumorzelltypen, darunter auch maligne Gliome (Song et al. 2003), eine ausgeprägte TRAIL-Resistenz zeigen, erfordert neue Krebstyp-abhängige Therapiestrategien. Entsprechend konzentrieren sich etliche Studien einschließlich dieser Arbeit auf die Sensitivierung resistenter Tumorzellen für TRAIL bzw. auf die Potenzierung der Effekte herkömmlicher Chemotherapien mit TRAIL (Kimberley and Screatton 2004).

1.9 Funktion und Rolle des Proteasoms

Zellen bedienen sich zahlreicher Mechanismen, um die Stabilität und Degradierung intrazellulärer Proteine zu regulieren. Obwohl noch weitere Mechanismen für die zytosolische Degradierung von Proteinen bekannt sind, stellen Lysosomen und Proteasomen die zentralen Mediatoren des zellulären Proteinabbaus dar. Vereinfacht ausgedrückt sind Lysosomen zelluläre Organellen, die für die Degradierung extrazellulärer und transmembranärer Proteine zuständig sind, während Proteasomen intrazelluläre Proteine degradieren (Ciechanover 1994).

Das 26S-Proteasom ist ein 2400 kDa großer, ATP-abhängiger proteolytischer Komplex, der sich im Zytosol und Nukleus eukaryotischer Zellen findet. Es setzt sich aus einem zylindrisch geformten, katalytischen 20S-Kernkomplex zusammen, der zu beiden Seiten von regulatorischen 19S-Untereinheiten abgeschlossen wird (Adams 2004) (Abbildung 1.4). Ubiquitin-markierte Proteine, vereinzelt auch unmarkierte Substrate wie z.B. Proteine aus der Retinoblastoma (RB)-Familie (Kalejta and Shenk 2003), werden von der regulatorischen 19S-Untereinheit erkannt und gebunden. Der 700 kDa große 19S-Proteinkomplex setzt sich aus zwei Untereinheiten, einem „Deckel“ („lid“) und einer „Basis“ („base“), zusammen. Letztere trägt sechs unterschiedliche ATPase-Untereinheiten, die energieaufwändige Prozesse wie Entfaltung des Substrates und Öffnen eines Kanals in das Innere der 20S-Untereinheit fördern.

Die 20S-Untereinheit besteht aus vier aufeinander liegenden Ringen: Die beiden β -Ringe, die die katalytischen Einheiten tragen, werden zu beiden Seiten von einem α -Ring flankiert. Da jeder Ring wiederum aus sieben Untereinheiten besteht, kommt der 20S-Untereinheit die Struktur $\alpha_{1-7}-\beta_{1-7}-\beta_{1-7}-\alpha_{1-7}$ zu (Ciechanover 2005). Die enzymatischen Aktivitäten der 20S-Untereinheit sind Chymotrypsin- und Trypsin-ähnlich, sowie post-Glutamyl-spaltend (DeMartino and Slaughter 1999; Kisselev et al. 1999).

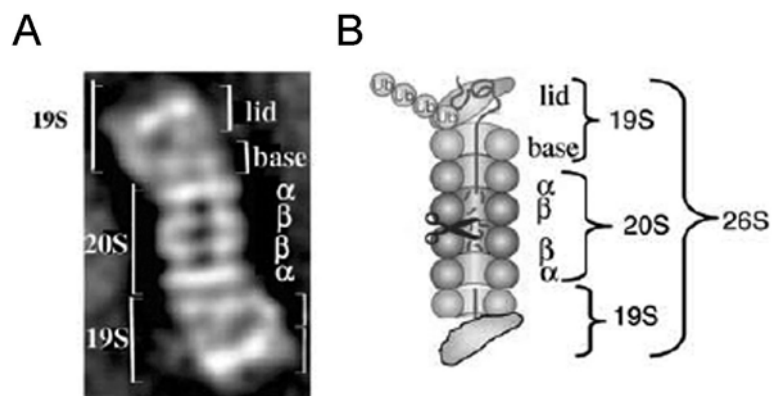


Abbildung 1.4: Struktur und Aufbau des Proteasoms. **A** Elektronenmikroskopische Aufnahme des 26S Proteasomes aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. **B** Schematische Darstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahme. Die regulatorischen 19S-Untereinheiten mit „Deckel“ („lid“) und „Basis“ („base“) flankieren die katalytische 20S-Untereinheit. Die beiden β -Ringe tragen die katalytischen Einheiten, die, wie in der Zeichnung angedeutet, ubiquitylierte (Ub) und von der 19S-Untereinheit entfaltete Proteine proteolytisch spalten. Abbildung entnommen aus Ciechanover, 2005.

Der Ubiquitin-Proteasomen-Signalweg ist essentiell für etliche zelluläre Prozesse, darunter Regulation von Genexpression, Zellzyklus und Apoptose. Auch bei Bewältigung von zellulärem Stress wie etwa Hitzeschock, oxidativem Stress oder Infektionen, spielt das Proteasom eine tragende Rolle (Adams 2004).

Interessanterweise sind besonders aktiv proliferierende maligne Zellen anfällig für eine Inhibition der Proteasomenfunktion (Drexler 1997; Hideshima et al. 2001), wie sie mit

verschiedenen Wirkstoffen erzielt werden kann. Die biologische Grundlage für dieses Phänomen ist noch nicht vollständig geklärt, man kann aber vermuten, dass sich in häufig teilenden Zellen defekte Proteine mit einer erhöhten Rate ansammeln. So wurde in einem Vergleich mit gesunden Zellen in leukämischen Lymphozyten eine um das dreifach erhöhte Chymotrypsin-ähnliche Proteasomenaktivität festgestellt (Masdehors et al. 2000). Desweiteren wird angenommen, dass die Blockade des Proteasoms und die daraus resultierende Anhäufung regulatorischer Proteine, die vor allem im Zellzyklus und der Apoptose eine Rolle spielen, eine Umkehrung verschiedener Mutations-abhängiger Effekte bewirkt (Adams 2004).

1.10 Proteasomeninhibitoren in der Tumortherapie

Bortezomib (PS-341/Velcade), der erste Proteasomeninhibitor, der zur klinischen Bekämpfung maligner Erkrankungen eingesetzt wird, wurde 2003 in den USA für die Therapie refraktöser Multipler Myelome zugelassen (Adams et al. 1998; Hideshima et al. 2001; Richardson et al. 2005). Derzeit sind zahlreiche Studien damit beschäftigt, den Wirkstoff alleine oder in verschiedenen Kombinationen an unterschiedlichen Tumorzelltypen zu testen (Adams 2004). Bereits seit Jahren in der klinischen Anwendung ist Ritonavir, ein synthetischer HIV1-Protease-Inhibitor, der u.a. selektiv die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms inhibiert (Andre et al. 1998). Mit PS-519 (MLN-519) befindet sich ein weiterer, anti-inflammatorisch wirkender Proteasomeninhibitor in der klinischen Phase (Shah et al. 2002). Beispiele für Proteasomeninhibitoren, die in der präklinischen Forschung eingesetzt werden, sind Lactacystin, ein Metabolit aus *Streptomyces lactacystinaeus* (Almond and Cohen 2002), Epoxomicin aus dem Actinomycetenstamm Q996-17 (Hanada et al. 1992) und das synthetische MG132 (Rock et al. 1994).

2 Zielsetzung der Arbeit

Genetisch konservierte Zelltodprogramme spielen eine fundamentale Rolle bei der Eliminierung von geschädigten und potentiell gefährlichen Zellen. Die Ansammlung von genetischen Defekten in Apoptose-relevanten Signaltransduktionswegen und die Überexpression anti-apoptotisch wirkender Faktoren spielen eine Schlüsselrolle für die Karzinogenese und die Therapieresistenz maligner Erkrankungen (Igney and Krammer 2002).

Anaplastische Astrozytome (Grad III) und Glioblastome (Grad IV) sind durch ausgeprägte Tumor-Hypoxie gekennzeichnet (Collins 2004). Die Anpassung an niedrige Sauerstoffverhältnisse stellt einen enormen Selektionsdruck für die Zellen dar und begünstigt einen Phänotyp, der sich durch hohe Resistenz gegenüber pro-apoptotischen Stimuli auszeichnet (Steinbach and Weller 2004). Entsprechend schwierig gestaltet sich die Therapie maligner Gliome, die gegenwärtig auf Tumorresektion, Bestrahlung und Gabe alkylierender Wirkstoffe (BNCU, Temozolomid) aufbaut, die Krankheit letztlich jedoch nicht heilen kann. Neue Therapiestrategien zur gezielten Überwindung der Apoptose- bzw. Therapieresistenz maligner Gliome sind angesichts dieser Tatsache dringen notwendig.

Der Todesligand TRAIL induziert durch Bindung an die TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 über den extrinsischen und intrinsischen Apoptose-Signalweg Zelltod. Interessantweise wirkt TRAIL selektiv auf Tumorzellen zytotoxisch, während nicht-transformierte somatische Zellen verschont werden. Diese Eigenschaft macht TRAIL zu einem vielversprechenden Kandidaten für künftige Krebstherapien. Einige Tumorzelltypen einschließlich maligner Gliome sind jedoch häufig resistent gegenüber TRAIL (Song et al. 2003). Zahlreiche Studien weisen aber darauf hin, dass maligne Zellen durch kombinatorische Therapieansätze für TRAIL sensitiviert werden können (Kimberley and Screaton 2004).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zunächst mehrere Gliomzelllinien in einem *in vitro*-Anoxiemodell auf ihre Hypoxie-Adaption hin untersucht und prototypische Zelllinien mit sensitivem oder resistentem Phänotyp identifiziert werden. Nach einer Charakterisierung des Anoxie-induzierten Zelltods sollten die molekularen Mechanismen der Anoxie-Resistenz mit BH3-Mimetika (einer neuen Wirkstoffklasse synthetischer Bcl-2-/Bcl-xL-Inhibitoren) und Mcl-1-RNA-Interferenz genauer analysiert und zu Befunden von Experimenten in Bezug gesetzt werden, die sich mit der Reaktivierung der TRAIL-induzierten Apoptose befassen.

In diesen Experimenten sollten unterschiedliche Therapiestrategien auf ihre Effizienz hin untersucht werden, Gliomzellen *in vitro* für TRAIL zu sensitivieren. Dazu sollten die Gamma-Bestrahlung als integraler Bestandteil der herkömmlichen Gliomtherapie mit BH3-Mimetika und Proteasomeninhibitoren (zwei neuen Wirkstoffklassen) verglichen und die molekularen Grundlagen der Apoptose-Reaktivierung analysiert werden.

3 Material

3.1 Zelllinien

Tabelle 3.1: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.

Name	Beschreibung
A172	humane Gliomzelllinie (Grad III/IV), p53-Mutante (Badie et al. 1999)
MZ-18	humane Gliomzelllinie (Grad IV), aus Explantat eines primären Glioblastoms ¹
MZ-51	humane Gliomzelllinie (Grad IV), aus Explantat eines primären Glioblastoms ¹
MZ-54	humane Gliomzelllinie (Grad IV), aus Explantat eines sekundären Glioblastoms ¹
MZ-159	humane Gliomzelllinie (Grad IV), aus Explantat eines sekundären Glioblastoms ¹
MZ-226	humane Gliomzelllinie (Grad IV), aus Explantat eines primären Glioblastoms ¹
MZ-256	humane Gliomzelllinie (Grad IV), aus Explantat eines sekundären Glioblastoms ¹
MZ-257	humane Gliomzelllinie (Grad IV), aus Explantat eines primären Glioblastoms ¹
MZ-290	humane Gliomzelllinie (Grad IV), aus Explantat eines primären Glioblastoms ¹
MZ-294	humane Gliomzelllinie (Grad IV), aus Explantat eines primären Glioblastoms ¹
MZ-304	humane Gliomzelllinie (Grad IV), aus Explantat eines sekundären Glioblastoms ¹
MZ-327	humane Gliomzelllinie (Grad IV), aus Explantat eines primären Glioblastoms ¹
MZ-348	humane Gliomzelllinie (Grad IV), aus Explantat eines primären Glioblastoms ¹
MZ-373	humane Gliomzelllinie (Grad IV), aus Explantat eines primären Glioblastoms ¹
U87	humane Gliomzelllinie (Grad III/IV), p53-Wildtyp (Asai et al. 1994)
U251	humane Gliomzelllinie (Grad III/IV), p53-Mutante (Asai et al. 1994)
U343	humane Gliomzelllinie (Grad III/IV), p53-Wildtyp (Asai et al. 1994)
U373	humane Gliomzelllinie (Grad III/IV), p53-Mutante (Badie et al. 1999)
HeLa	humane Zervix-Karzinom-Zelllinie (Scherer et al. 1953)

3.2 Zellkulturmaterial

Tabelle 3.2: In dieser Arbeit verwendete Zellkulturmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 1g/L D-Glc	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM 4,5 g/L D-Glc	Invitrogen
DMEM Pulver 1g/L D-Glc	Invitrogen
Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen
L-Glutamin	Invitrogen
Opti-MEM	Invitrogen
RPMI 1640	Invitrogen

¹ freundlicherweise bereitgestellt von Frau Dr. Horn, Abt. Neurochirurgie, Johannes Gutenberg-Universitätsklinikum, Mainz

Bezeichnung	Hersteller
Serologische Pipetten	Corning, Bodenheim
Streptomycin und Penicillin	Invitrogen
Trypsin-EDTA	Invitrogen
Zellkulturflaschen, -schalen und -platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen

3.3 Antikörper

3.3.1 Primär-Antikörper

Tabelle 3.3.1: In dieser Arbeit verwendete Primär-Antikörper.

Abkürzungen: WB = Western Blot, DFZ = Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Typ	Anwendung	Hersteller (Kat.-Nr.)
anti-Bcl-2	Maus monoklonal	WB	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (sc-509)
anti-Bcl-xL	Kaninchen polyklonal	WB	BD Biosciences, Heidelberg (#610211)
anti-CHOP	Maus monoklonal	WB	Santa Cruz Biotechnology, (sc-7351)
anti-DR4	Kaninchen polyklonal	WB	Axxora, Lörrach (PSC-1139-C100)
anti-DR5	Kaninchen polyklonal	WB	Biomol, Hamburg (IMG-5470)
anti-DR5	Ziege polyklonal	DFZ	Axxora (ALX-210-743-C200)
anti-FLIP S/L	Kaninchen polyklonal	WB	Santa Cruz Biotechnology (sc-8347)
anti-I κ -B α	Kaninchen polyklonal	WB	Santa Cruz Biotechnology (sc-371)
anti-Mcl-1	Kaninchen polyklonal	WB	Santa Cruz Biotechnology (sc-819)
anti-Phospho-c-Jun	Kaninchen polyklonal	WB	Cell Signaling Technology Danvers, USA (#9261)
anti-XIAP	Maus monoklonal	WB	BD Bioscience (H62120)
anti- α -tubulin	Maus monoklonal	WB	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (Klon DM 1A)

3.3.2 Sekundär-Antikörper und Isotyp-Kontrollen

Tabelle 3.3.2: In dieser Arbeit verwendete Sekundär-Antikörper und Isotyp-Kontrollen.

Abkürzungen: WB = Western Blot, DFZ = Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller (Kat.-Nr.)
anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	WB	Jackson Immuno Research/ Dianova, Hamburg (#111-035-045)
anti-Maus IgG, HRP-konjugiert	WB	Jackson Immuno Research/ Dianova (#115-035-062)
anti-Ziege IgG, FITC-konjugiert	DFZ	Abcam, Cambridge, USA (ab6881-1)
Ziege IgG Isotyp-Kontrolle	DFZ	Biozol, Eching (#0109-01)

3.4 Oligonukleotide

Tabelle 3.4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. Die Auswahl der verwendeten Primerpaare erfolgte mit Hilfe der Software „Primer3“. Sämtliche verwendeten Oligonukleotide wurden bei MWG Biotech, Ebersberg synthetisiert.

Bezeichnung	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')
Bax	agc tct gag cag atc atg aag ac	cca tct tct tcc aga tgg tga g
Bnip3	ctg gac gga gta gct cca ag	atc aaa agg tgc tgg tgg ag
Bnip3L/Nix	agt tcc aga ggc agt tct cac t	ggg cat gct tac aat ggt ctc a
CHOP	ggg cct gtc ttc aga tga aaa tg	cct ggt gca gat tca cca ttc
c-Jun	tga ctg caa aga tgg aaa cg	cct gct cat ctg tca cgt tc
DcR1	cac caa cgc ttc caa caa tg	gag agg taa tga gaa gag gc
DcR2	cct gta cca cga cca gag aca c	gaa ctc gtg aag gac atg aac g
DR4	aga gag aag tcc ctg cac ca	ttg tga gca ttg tcc tca gc
DR5	cag agg gat tgt gtc cac ct	tac ggc tgc aac tgt gac tc
GAPDH	cct gac ctg ccg tct aga aa	tta ctc ctt gga ggc cat gt-3
Noxa	agt cga gtg tgc tac tca act ca	tga tgt att cca tct tcc gtt tc
Puma	tca gcc ctc gct ctc g	cac cta att ggg ctc cat ctc

3.5 siRNA-Oligonukleotide

Tabelle 3.5: In dieser Arbeit verwendete siRNA-Oligonukleotide.

Bezeichnung	Hersteller	Kat.-Nr.
CHOP	Dharmacon, Chicago, USA	D-004819-01-0005
CHOP	Dharmacon	D-004819-02-0005
DR5	Dharmacon	D-004448-01-0005
DR5	Dharmacon	D-004448-03-0005
I κ -B α	Dharmacon	J-004765-05
I κ -B α	Dharmacon	J-004765-06
Mcl-1	Dharmacon	J-004501-14
Mcl-1	Dharmacon	J-004501-16
siCONTROL Non-Targeting siRNA #1	Dharmacon	D-001210-01-05
Silencer FAM labeled Negative Control #1 siRNA	Ambion, Darmstadt	AM4620

3.6 DNA-Marker

Tabelle 3.6: In dieser Arbeit verwendete DNA-Marker.

Bezeichnung	Hersteller (Kat.-Nr.)
GeneRuler 100bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot (SM0241)
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas (SM0311)
GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas (SM0331)

3.7 Proteingrößen-Marker

Tabelle 3.7: In dieser Arbeit verwendete Proteingrößen-Marker.

Bezeichnung	Hersteller (Kat.-Nr.)	Größen (kDa)
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Biorad, München (#161-0374)	250, 150, 100, 75 (rot), 50, 37, 25 (rot), 20, 15, 10
See Blue Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, Karlsruhe (LC5925)	250, 148 (orange), 98, 64, 50, 36, 22 (rot), 16, 6, 4

3.8 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in Analysequalität (*pro analysi*) von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. In Tabelle 3.8 sind die Hersteller bzw. Lieferanten spezieller Chemikalien und Verbrauchsmaterialien aufgeführt:

Tabelle 3.8: In dieser Arbeit verwendete spezielle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller /Lieferant
1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)	Eppendorf, Hamburg
3 MM-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Acrylamid 39 % und N,N'-Methylenbisacrylamid (37,5:1)	Serva, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Annexin-V-FLUOS	Roche Applied Science, Penzberg
BBL GasPak Anaerobic System Envelopes	BD Biosciences, Heidelberg
Biotin-UTP	Roche Applied Science
Coomassie Brilliant Blue	Serva
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Heidelberg
dNTP Mix [10 mM]	Eppendorf
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
FACS Sheath Solution	BD Biosciences
GasPak Disposable Anaerobic Indicator Strips	BD Biosciences
Metafectene	Biontex, München

Bezeichnung	Hersteller /Lieferant
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
N-Acetyl-DEVD-7-amino-4-methylcumarin	Bachem, Heidelberg
Nitrocellulose Membran (0,25 µM)	Schleicher & Schuell
Oligo GEArray Microarrays	Superarray/Biomol, Hamburg
Oligo GEArray Reagent Kit	Biomol, Hamburg
Ponceau S Certistain	Roth
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
Qiashredder	Qiagen, Hilden
RNaseZap R	Applied Biosystems, Darmstadt
Röntgenfilme, Hyperfilm ECL	Amersham, Braunschweig
Roti-Quant UN 1760	Roth, Heidelberg
Simply Blue Safe Stain	Invitrogen
Tetramethylrhodaminmethylester (TMRM)	MobiTec, Göttingen
Tween 20	AppliChem, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Fluka, Neu-Ulm

3.9 Zytokine, Inhibitoren und Pharmaka

Tabelle 3.9: In dieser Arbeit verwendete Zytokine, Inhibitoren und Pharmaka.

Bezeichnung	Hersteller /Lieferant
BH3I-2'	Calbiochem/Merck, Darmstadt
Epoxomicin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
HA14-1	Calbiochem/Merck
MG132	Sigma-Aldrich
Phosphatase-Inhibitor Cocktail I und II	Sigma-Aldrich
Protease-Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
SP600125	Calbiochem/Merck
Staurosporin (STS)	Axxora, Lörrach
TRAIL	PeptoTech Inc., Rocky Hill, USA

3.10 Kits

Tabelle 3.10: In dieser Arbeit verwendete Kits.

Bezeichnung (Kat.-Nr.)	Hersteller/Lieferant
BCA Protein Assay Kit (UP67251 bis 3)	Uptima/KMF, Köln
ECL Enhanced Chemiluminescence (#34080)	Pierce/Perbio Science, Bonn
Oligo GEArray Reagent Kit (GA-034)	Superarray/Biomol, Hamburg
RNase-Free DNase Set (#79254)	Qiagen, Hilden
RNeasy Midi Kit (#75142)	Qiagen
siIMPORTER Kit (#64-101)	Upstate, Heidelberg

3.11 Enzyme

Tabelle 3.11: In dieser Arbeit verwendete Enzyme.

Bezeichnung	Hersteller
Reverse Transkriptase (M-MLV)	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Eppendorf, Hamburg

3.12 Laborgeräte

Tabelle 3.12: In dieser Arbeit verwendete Laborgeräte.

Bezeichnung	Hersteller
Analytik-Waage BP61	Sartorius, Göttingen
Anoxiekammer (Gaspak 150 Large Anaerobic System)	BD Biosciences, Heidelberg
Blotkammer (Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell)	Biorad, München
Cleanbench (Heraeus)	Heraeus, Hanau
Cleanbench (Technoflow)	Integra Biosciences, Chur, Schweiz
Elektrophoresekammer für Agarose- Gelelektrophorese (Wide Mini Sub Cell GT)	Biorad
Elektrophoresekammer für PAGE (Protean II und IV)	Biorad
ELISA-Reader (HTS 7000)	Perkin Elmer, Langen
FACS (FACScan)	BD Biosciences
Gel-Dokumentationssystem	MWG Biotech, Ebersberg
Gelstand für SDS-PAGE Gelelektrophorese	Biorad
Geltrockner	Biorad
Hybridization Oven 640	Affymetrix, Santa Clara, Californien, USA
Inversmikroskop (Eclipse TE300)	Nikon, Düsseldorf
Laborwaage Universal (U 4600 P+)	Sartorius
Linearbeschleuniger für Strahlentherapie (Elekta SL75/5)	Elekta, Stockholm, Schweden
pH-Messgerät (pH 530)	Knick, Berlin
Reinstwasseranlage (Seralpur Delta UF)	Seral, Ransbach-Baumbach
Spannungsgerät (EPS300)	Pharmacia, Freiburg
Spannungsgerät (PowerPac HC Power Supply)	Biorad
Thermocycler (Mastercycler)	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge (Biofuge 13)	Heraeus
Tischzentrifuge (Biofuge fresco)	Kendro, Düsseldorf
UV Spektrometer (DNA Calculator)	Pharmacia
Wärmeschrank	WTB Binder, Tuttlingen
Wasserbad (10 L)	Minitüb, Tiefenbach
Zellkulturschrank (HeraCell)	Heraeus

3.13 Software

Tabelle 3.13: In dieser Arbeit verwendete Software.

Name	Funktion (Hersteller/Internetadresse)
Adobe Acrobat 7.0	Bearbeitung von PDF-Dateien (Adobe)
Adobe Illustrator 10.0	Erstellung von Abbildungen und Präsentationen (Adobe)
Adobe Photoshop CS2	Bildbearbeitung (Adobe)
EndNote 6.0	Literaturverwaltung (Thomson ISI ReasearchSoft)
GEArray Expression Analysis Suite	Auswertung von GEArray Expressionsanalysen (http://geasuite.superarray.com)
ImageJ	Quantitative Bildanalyse (http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html)
MS Office 2003	Textverarbeitung, Tabellenkalkulation, Erstellung von Präsentationen (Microsoft, Redmond, USA)
NCBI Blast N	Nukleotidsequenzanalyse und -alignment (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)
Primer3	Primerdesign- und Suche (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)
SPSS Version 11.0	Statistische Auswertung (SPSS, München)
WinMDI 2.8	Auswertung und Darstellung von FACS-Analysen (http://www.facs-lab.toxikologie.uni-mainz.de/Downloads.jsp)

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Arbeiten/Zellkultur

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden bei 37°C in einem Inkubator unter einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre und bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Die verschiedenen Kulturmedien wurden mit 10 % fötalem Kälberserum, 100 µg/mL Streptomycin, 100 U/mL Penicillin und 1 % L-Glutamin versetzt. Zuvor wurde das Serum für 30 min bei 56°C inaktiviert. Das gebrauchsfertige Medium wurde für max. 4 Wochen bei 4°C gelagert und vor der Anwendung auf 37°C erwärmt.

4.1.1 Humane Zelllinien

Die humanen Gliomzelllinien MZ-18, MZ-51, MZ-54, MZ-159, MZ-226, MZ-256, MZ-257, MZ-290, MZ-294, MZ-304, MZ-327, MZ-348 und MZ-373 wurden wie oben beschrieben in DMEM mit 4,5 g/L D-Glc kultiviert. MZ-18, MZ-54, MZ-294, MZ-304 und MZ-327 Zellen wurden im Abstand von 4 Tagen subkultiviert (Teilung 1:3), MZ-256, MZ-257, MZ-348 und MZ-373 Zellen im Abstand von 7 Tagen (Teilung 1:2). Die Zelllinien MZ-51, MZ-159, MZ-226 und MZ-290 wurden lediglich ca. jeden 10. Tag in neue Kulturgefäße passagiert (Teilung 1:2).

Die humanen Gliomzelllinien U87, U251, U343 und U373 wurden in DMEM mit 1,0 g/L D-Glc kultiviert und im Abstand von 3 Tagen subkultiviert (Teilung 1:4). Aufgrund ihres hohen Energiebedarfs und einer Unverträglichkeit gegenüber hohen Natriumhydrogencarbonat-Konzentrationen, wurden humane A172-Gliomzellen in DMEM mit 4,5 g/L D-Glc, 10 % FCS und nur 1,5 g/L NaHCO₃ kultiviert. Die Zellen wurden im Abstand von 3 Tagen in neue Kulturgefäße passagiert (Teilung 1:5). Die humane Zervixkarzinomzelllinie HeLa wurde in RPMI-Medium kultiviert und ca. jeden 3. Tag subkultiviert (Teilung 1:6).

4.1.2 Trypsinierung und Subkultivierung adhärent wachsender Zellen

Zur Subkultivierung adhärent wachsender Zellen wurde das alte Medium entfernt und die Zellen mit PBS (ohne Zusatz von Ca⁺ und Mg²⁺) gewaschen. Um die Zellen von ihrer Unterlage und aus dem Verband zu lösen, wurde ca. 1 mL Trypsin/EDTA auf 3000 mm² Kulturfläche gegeben und für ca. 3 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert, in ein 15-mL-Röhrchen überführt und für 3 min bei 200 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in einem definierten Volumen frischen Mediums resuspendiert und die Zellzahl mit einem Neubauer improved-Hämozytometer bestimmt. Abschließend wurden die Zellen in neue Kulturgefäße überführt.

4.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit einem Neubauer improved-Hämozytometer bestimmt. Dazu wurde aus einer suspendierten und entsprechend verdünnten Zellkultur steril ein Aliquot von ca. 20 μL entnommen und bei aufgelegtem Deckglas seitlich in die Zählkammer pipettiert. Unter dem Inversmikroskop wurden 4 Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Da ein Großquadrat eine Fläche von 1 mm^2 und bei plan aufliegendem Deckglas eine Kammerhöhe von 0,1 mm hat, ergibt sich ein Rauminhalt von $0,1\text{ mm}^3$. Zur Berechnung der Zellzahl pro Milliliter wird der Mittelwert der Zellzahl mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

4.1.4 Einfrieren von Zellen

Um Zellen längere Zeit aufzubewahren, werden diese eingefroren und in flüssigem Stickstoff (ca. -196°C) oder in dessen Gasphase (ca. -120°C) gelagert. Die Bildung von Eiskristallen verhindert man, indem man das Medium mit DMSO als Frostschutzmittel versetzt. Zwischen $5 \cdot 10^6$ und $1 \cdot 10^7$ Zellen wurden bei $200 \times g$ sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 1,5 mL Medium resuspendiert. Drei beschriftete Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) wurden mit 500 μL Einfriermedium (80 % FCS, 20 % DMSO) befüllt und jeweils 500 μL der resuspendierten Zellkultur in die Röhrchen überführt. Diese wurden sorgfältig verschlossen und in einer Kryobox (Mr Frosty, Nunc) bei -81°C eingefroren. Der Mantel der Kryobox ist mit Isopropanol gefüllt, was ein langsames Herunterkühlen der Zellsuspension (ca. 1°C pro Minute) auf -81°C gewährleistet. Nach einem Tag wurden die Kryoröhrchen in den Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

4.1.5 Auftauen von Zellen

Pro Kryoröhrchen wurde ein 15-mL-Röhrchen mit angewärmtem Medium vorbereitet. Das Kryoröhrchen wurde unter sterilen Bedingungen geöffnet und wiederholt ca. 1 mL frisches Medium auf das tiefgefrorene Zellsuspensat gegeben. Die flüssige Phase wurde abgenommen und umgehend in das 15 mL-Röhrchen überführt. Im Anschluss wurde die Suspension aufgetauter Zellen für 3 min bei $200 \times g$ zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Sediment in frischem Medium aufgenommen und die Zellen ausgesät.

4.1.6 *In vitro*-Anoxiemodell

Hypoxie beschreibt den pathologischen Zustand der Unterversorgung eines Gewebes mit Sauerstoff. Eine Hypoxie mit absoluter Sauerstoff-Deprivation wird als Anoxie bezeichnet. Zur gezielten Untersuchung von Gliomzelllinien unter anoxischen Bedingungen wurden die Kulturen über einen Zeitraum von 24 bis 72 h unter Ausschluss von Sauerstoff kultiviert. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert, sedimentiert, gezählt und gemäß ihrer Wachstumseigenschaften so ausgesät, dass sie innerhalb von 24 h eine vergleichbare optische Konfluenz erreichten. Nach 24 h wurden die Kulturen in eine Anoxiekammer (GasPak 150 Large Anaerobic System, BD Biosciences,

Heidelberg) überführt und über einen definierten Zeitraum einer Anoxie ausgesetzt. Unmittelbar nach Abschluss der Behandlung wurden die Zellen für nachfolgende Analyseschritte (z.B. Durchflusszytometrie, vgl. Abschnitt 4.3) vorbereitet.

In der geschlossenen Anoxiekammer wird der Sauerstoff durch GasPak-Hüllen (GasPak Anaerobic System Envelopes, BD Biosciences) eliminiert, die durch Zugabe von Wasser aktiviert werden. Dabei verbindet sich der aus einer Natriumborhydrid-Tablette freigesetzte Wasserstoff in Gegenwart eines Palladium-Katalysators mit dem Sauerstoff des Kammerinnenraums zu Wasser. Eine Natriumbicarbonat-/Zitronensäure-Tablette setzt zusätzlich CO₂ frei und erzeugt so eine 4- bis 10 %ige Kohlendioxidatmosphäre.

4.1.7 Bestrahlung von Zellkulturen

Zwischen $3,5 \cdot 10^6$ und $5 \cdot 10^6$ Zellen wurden in T175-Zellkulturflaschen ausgesät und für 24 h kultiviert. Daran anschließend wurden die Kulturflaschen im Zentrum der Radiologie des J.W. Goethe-Universitätsklinikums einzeln auf der Behandlungsfläche eines Elekta SL75/5 (Elekta, Stockholm, Schweden) ausgerichtet und die Zellen einmalig mit einer Dosis (10 oder 20 Gy) 6 MeV Photonenstrahlung behandelt. Nach 24-stündiger Kultur unter Standardbedingungen wurden die Zellen experimentell untersucht.

4.2 RNA-Interferenz

Bei der RNA-Interferenz (RNAi) wird die Regulation der Genexpression durch doppelsträngige RNA-Moleküle mit komplementärer Nukleotidsequenz kontrolliert. Der Signalweg ist in eukaryotischen Organismen hoch konserviert und spielt in der Entwicklung (Carrington and Ambros 2003), bei der Instandhaltung des Genoms (Holmquist and Ashley 2006) und, vermutlich hauptsächlich in Pflanzen, bei der Abwehr von Viren (Stram and Kuzntzova 2006) eine tragende Rolle. Doppelsträngige RNA (dsRNA) wird von dem Enzym Dicer (einer Ribonuclease aus der RNase III-Familie) in kleine doppelsträngige RNA-Fragmente, sogenannte small interfering RNAs (siRNAs), mit einer Länge von 21 bis 25 Basenpaaren prozessiert. Ein Strang wird geschnitten und entfernt. Der verbleibende Strang wird in den RNA-Induced Silencing Complex (RISC) eingebaut, wo er auf seine komplementäre Zielsequenz trifft. Handelt es sich dabei um eine messenger RNA (mRNA), so wird diese von Argonaut, der katalytischen Komponente des RISC, degradiert und man spricht von post-transkriptionellem „Gene-Silencing“. In der experimentellen Biologie macht man sich diesen Signalweg zu Nutze, um in Zellkulturen oder in Modellorganismen *in vivo* die Funktion von Genen zu studieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Transkripte von CHOP, DR5, IκBα und Mcl-1 in humanen Gliomzellen mit spezifischen siRNAs degradiert und so eine transiente Repression der betreffenden Gene erzielt. Die Zellen wurden mit einer angestrebten optischen Konfluenz von ca.

80 % in 6- oder 24-Lochplatten ausgesät und nach 24 h die jeweiligen siRNA/siIMPORTER-Lipid-Komplexe transfiziert. Die Transfektion wurde gemäß den Angaben des Herstellers (Upstate, Heidelberg) in serumfreiem Opti-MEM (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Dazu wurde ein äquimolares Gemisch zweier siRNAs mit unterschiedlichen Nukleotidsequenzen aber gleichem Zieltranskript in Konzentrationen zwischen 100 und 250 nM eingesetzt. Zur Beurteilung der Transfektionseffizienz wurde zusätzlich unspezifische, FAM-markierte siRNA (Ambion, Darmstadt) in Kontrollzellen transfiziert. Vier Stunden nach der Transfektion wurde das Opti-MEM entfernt und durch Vollmedium ersetzt. Nach 24 h wurden die Kontrollzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf grün-fluoreszierende, FAM-positive Zellen untersucht. Durch eine Anfärbung der lebenden Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst (die Nuclei fluoreszieren bei Anregung blau) wurde die Transfektionseffizienz anhand des Quotienten aus FAM-positiven und Hoechst-positiven Zellen errechnet.

4.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) genannt², ist eine Technik zum Zählen und Untersuchen suspendierter Zellen und erlaubt die simultane und multiparametrische Analyse ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften. Dazu werden die Zellen einzeln in einem hydrodynamisch fokussierten Flüssigkeitsstrom an einem Laserlichtstrahl ($\lambda=488$ nm) vorbeigeführt, und das von ihnen emittierte Licht von verschiedenen Detektoren gesammelt. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC), entsteht durch die Beugung des auftreffenden Lichts und dient als Maß für das Zellvolumen. Das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) wird durch die Brechung des Lichts an der Zelle hervorgerufen und dient als Maß für deren Granularität (Beschaffenheit der Membran, Form des Nukleus, etc.). Werden die Zellen zusätzlich mit intra- oder extrazellulären Fluorophoren markiert, emittieren diese nach Anregung Photonen einer höheren Wellenlänge, die von einem Photomultiplier verstärkt und schließlich von drei Detektoren für verschiedene Wellenlängen erfasst werden (FL1=530±30 nm, FL2=585±42 nm, FL3=650±30 nm). Sämtliche Parameter werden simultan aufgenommen und können graphisch eindimensional (Histogramm) und zwei- oder dreidimensional (Dot Plot) ausgewertet werden. Den Kriterien des jeweiligen Experimentes folgend, werden Regionen auf dem Dot Plot definiert und unter Verwendung boolescher Operatoren sogenannte Gates gebildet, die die separate Analyse einer Zellpopulation erlauben.

² Der Begriff „FACS“ ist eine geschützte Handelsmarke der Firma BD Biosciences.

4.3.1 Rezeptor-Oberflächenexpression

Eine Fragestellung in dieser Studie war die Regulation der Zelloberflächenexpression des TRAIL-Rezeptors DR5 in humanen Gliomzellen nach Proteasomeninhibition. Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern lassen sich Rezeptoren auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch quantifizieren. Dazu wurden $2,5 \cdot 10^5$ Zellen/Vertiefung in 6-Lochplatten ausplattiert und nach 24 h einer entsprechenden Behandlung unterzogen. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert, gezählt und nach einem Waschschrift mit PBS in eiskaltem 3 % BSA/PBS [$5 \cdot 10^5$ Zellen/mL] resuspendiert. Je 100 μ L der Zellsuspension wurden in FACS-Röhrchen (BD Biosciences, Heidelberg) überführt und für mindestens 30 min mit dem Primär-Antikörper [20 μ g/mL] bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen erneut in 100 μ L eiskaltem 3 % BSA/PBS aufgenommen und für mindestens 30 min mit dem Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten Sekundär-Antikörper [10 μ g/mL] bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

4.4 Nachweis von Zelltod und mitochondrialer Dysfunktion

4.4.1 Caspase-Aktivitätsmessung

Um die Aktivierung der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 in Gliomzellen *in vitro* nach diversen Stimuli zu analysieren, wurden Caspase-Aktivitätsmessungen durchgeführt. Dazu wurden zwischen $2,5 \cdot 10^4$ und $4 \cdot 10^4$ Zellen/Vertiefung in 24-Lochplatten ausgesät und nach 24 h einer potentiell Zelltod-induzierenden Behandlung unterzogen. Anschließend wurden die Zellen in den 24-Lochplatten mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 200 μ L Lysepuffer zytosolische Extrakte gewonnen. Jeweils 50 μ L Extrakt wurden in die Vertiefung einer schwarzen 96-Lochplatte überführt und in 150 μ L Reaktionspuffer aufgenommen. Dieser Reaktionsansatz wurde für 120 min mit dem fluorogenen Caspase-3, -6 und -7-Substrat N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcumarin [10 μ M] bei 37°C inkubiert.

Das Tetrapeptid Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) dient als Caspase-Spaltstelle. Daran ist der Fluorophor Aminomethylcumarin (AMC) gekoppelt. Die Caspase-Aktivität wird indirekt über die Fluoreszenzintensität von freiem AMC in Relation zum Proteingehalt des Extraktes bestimmt. Dazu wurde das AMC in 60 min-Intervallen angeregt ($\lambda=360$ nm) und das emittierte Fluoreszenzlicht des freien AMC ($\lambda=460$ nm) von einem ELISA-Reader erfasst. Mit Roti-Quant (Roth, Heidelberg) wurde parallel dazu eine Proteingehaltsbestimmung der Extrakte nach Bradford durchgeführt, um die gemessene Fluoreszenzintensität mit dem Proteingehalt zu verrechnen.

Tabelle 4.1: Für den Caspase-Aktivitätstest verwendete Lösungen.

Lysepuffer	Reaktionspuffer
10 mM HEPES pH 7,4	25 mM HEPES pH 7,5
0,5 % CHAPS	1 mM EDTA
42 mM KCl	10 % Sucrose
5 mM MgCl ₂	0,1 % CHAPS
0,1 mM EDTA	3 mM DTT
0,1 mM EGTA	N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcumarin
1 mM DTT	
5 µg/ml Aprotinin	
1 µg/ml Leupeptin	
1 µg/ml Pepstatin A	
1 mM PMSF	

4.4.3 Propidiumiodid-Färbung

Die Zellfärbung mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff Propidiumiodid³ (PI) eignet sich zur Diskriminierung von lebenden und toten Zellen und ermöglicht so die durchflusszytometrische Quantifizierung von nekrotischen und spät-apoptotischen (sekundär nekrotischen) Zellen. Der Farbstoff durchdringt die perforierte Plasma- bzw. Zellkernmembran nekrotischer Zellen und interkaliert in die DNA. Lebende Zellen mit intakter Plasmamembran schließen den Farbstoff aus. Zur Bestimmung des Anteils toter Zellen nach 48-stündiger Anoxie wurden die Zellen in 24-Lochplatten mit einer relativen optischen Dichte von 30 bis 40 % ausgesät. Nach der Inkubation in der Anoxiekammer wurden Überstand und Zellen in FACS-Röhrchen gesammelt, mit PBS gewaschen und in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) mit PI [0,15 µg/mL] aufgenommen. Die Zellen wurden für mindestens 15 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht.

4.4.4 Annexin-V-FLUOS-/Propidiumiodid-Doppelfärbung

Während PI ausschließlich nekrotische bzw. sekundär nekrotische Zellen anfärbt (siehe oben), kann man mit Annexin-V-FLUOS Zellen in einem frühen Apoptosestadium färben. In intakten Zellen ist die Plasmamembran asymmetrisch aufgebaut und Phosphatidylserin (PS) auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite lokalisiert. Bereits in einem frühen Stadium der Apoptose geht diese Asymmetrie verloren und PS tritt vermehrt in der nach außen gerichteten Membranseite auf (Zamzami et al. 1996). Annexin-V, ein kalziumabhängiges Phospholipid-bindendes Protein (ca. 36 kDa), hat eine hohe Affinität zu PS. Durch die Kopplung an einen Fluoreszenzfarbstoff, in

³ Die Absorptionsmaxima von freiem und DNA-gebundenem Propidiumiodid betragen 488 bzw. 535 nm, die Emissionsmaxima 590 und 617 nm.

diesem Fall den grünen 5(6)-Carboxy-fluorescein-N-hydroxysuccinimidester (FLUOS)⁴, können apoptotische Zellen durch spezifische Bindung von Annexin-V angefärbt werden. Nach Anregung können die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop oder durchflusszytometrisch untersucht werden. Allerdings muss gleichzeitig eine Ausschlussfärbung mit PI durchgeführt werden, da auch nekrotische Zellen mit permeabilisierter Membran Annexin-V binden.

Zur näheren Charakterisierung des Anoxie-induzierten Zelltods, sowie zur Quantifizierung des Anteils apoptotischer Zellen nach Behandlung mit TRAIL, wurden zwischen $3 \cdot 10^4$ und $4,5 \cdot 10^4$ Zellen in 24-Lochplatten ausgesät und nach 24 h einer Behandlung unterzogen. Im Anschluss wurden Zellüberstand und trypsinierte Zellen in FACS-Röhrchen überführt, mit PBS gewaschen und in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) mit PI [0,15 µg/mL] und Annexin-V-FLUOS (2,5 µL der gebrauchsfertigen Lösung pro Milliliter) aufgenommen. Nach mindestens 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunklen wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Bei der Auswertung der Daten mittels Dot Plot wurde der Anteil toter (d.h. apoptotischer und nekrotischer) Zellen über die Differenz zwischen 100 % (alle vier Quadranten) und dem Anteil lebender Zellen (ungefärbte Zellen im linken unteren Quadranten) ermittelt.

4.4.5 TMRM-Färbung

Das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) ist ein Indikator für die funktionelle Integrität des Mitochondriums. Es wird durch einen Protonengradienten über die innere mitochondriale Membran in Verbindung mit der Elektronentransportkette aufrechterhalten. Umgekehrt treibt $\Delta\Psi_m$ viele Schlüsselfunktionen des Mitochondriums an, z.B. ATP-Synthese, Kalzium-Akkumulierung oder Influx und Efflux von Substraten und Metaboliten. Tetramethylrhodaminmethylester (TMRM)⁵ ist ein Membran-permeierender kationischer Fluoreszenzfarbstoff, der sich der Nernst-Gleichung entsprechend über zelluläre Membranen verteilt und proportional zu $\Delta\Psi_m$ in der negativ geladenen Mitochondrienmatrix ansammelt (Ehrenberg et al. 1988). In nanomolaren Konzentrationen eingesetzt nimmt TMRM selbst keinen Einfluß auf die Aktivität der Elektronentransportkette (Scaduto and Grotyohann 1999). Infolge pro-apoptotischer Stimuli werden Bak und Bax aktiviert und oligomerisieren in der äußeren Mitochondrienmembran. Durch die so entstandenen Poren strömen Proteine aus dem Intermembranraum (darunter Cytochrom c) ins Zytosol, was in letzter Konsequenz zum Verlust von $\Delta\Psi_m$ führt. In diesem Fall wird TMRM nicht mehr von den Mitochondrien aufgenommen und verteilt sich im Zytoplasma. Der Farbstoff eignet sich somit hervorragend, um durchflusszytometrisch die funktionelle mitochondriale Integrität in einer Zellkultur zu untersuchen. Dazu wurden Zellen in 24-Lochplatten mit einer relativen optischen Konfluenz von 50 bis 60 % ausplattiert und einer 48-stündigen

⁴ Das Absorptionsmaximum von FLUOS liegt bei 488 nm, das Emissionsmaximum bei 515 nm.

⁵ Das Absorptionsmaximum von TMRM liegt bei 548 nm, das Emissionsmaximum bei 573 nm.

Anoxiebehandlung unterzogen. Danach wurden Überstand und Zellen in FACS-Röhrchen überführt, mit PBS gewaschen und in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) mit TMRM [30 nM] aufgenommen. Vor der Messung wurden die Zellen für mindestens 20 min bei 37°C im Dunklen inkubiert.

4.5 Nukleinsäure-Arbeitstechniken

Die Anwendung allgemein üblicher Nukleinsäure-Arbeitstechniken erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (Sambrook et al. 1989; Mülhardt 2000) oder, bei der Verwendung von Kits, nach Herstellerangaben.

4.5.1 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Ziel der Reversen Transkription (RT) von mRNA in cDNA und der anschließenden PCR-Amplifikation von Sequenzen mit spezifischen Primern ist es, semi-quantitative Aussagen über die Expressionshäufigkeit eines Transkripts treffen zu können. Zudem können RT-PCR-Produkte in weiteren Arbeitsschritten kloniert werden.

Zur Isolation von Gesamt-RNA wurden die Zellen trypsiniert, sedimentiert und mit PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte folgten den Herstellerangaben (Qiagen, Hilden) für den Qiashredder bzw. den RNeasy Midi Kit. Die RNA-Konzentration wurde UV-photometrisch bei 260 nm vermessen und die Reinheit der Präparation durch das Verhältnis A_{260}/A_{280} bestimmt. Die anschließende RT-PCR erfolgte in zwei Schritten unter Verwendung von „Moloney Murine Leukemia Virus“ (M-MLV) Reverser Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) und Taq-Polymerase (Eppendorf, Hamburg). Ein 20 μ L Reaktionsansatz enthielt 200 μ M dNTP, 0,45 μ M random hexamers, 1 μ g Gesamt-RNA und 200 Units M-MLV RT. Die RNA wurde für 50 min bei 42°C revers transkribiert und 1 μ L der gewonnenen cDNA in der anschließenden PCR (Tabelle 4.2) als Matrize eingesetzt. Soweit möglich wurden cDNA-spezifische Primer verwendet.

Im Falle der Amplifikation von Puma cDNA musste das PCR-Protokoll für die Amplifikation GC-reicher Sequenzen angepasst werden. Dazu wurde Betain (2 M) im Reaktionsansatz anstelle von Wasser verwendet. Um eine eventuelle Kontamination der RNA-Präparation mit genomischer DNA zu kontrollieren, wurden zusätzlich 0,1 μ g nicht revers transkribierter RNA in der PCR-Reaktion analysiert. Die Zyklenzahlen und Annealing-Temperaturen wurden an die verwendeten Primer angepasst und optimiert (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.2: Ein typischer PCR-Ansatz (20 μ L).**Zusammensetzung:**

1 μ L cDNA
 1 μ L Primer („sense“ und „anti-sense“, 25 μ M)
 10 μ L 2x Reaktionspuffer (einschließlich 10 mM dNTPs)
 0,8 μ L Taq-Polymerase (1 U/ μ L)
 add 20 μ L H₂O

Tabelle 4.3: Annealingtemperatur und Zyklenzahl der verwendeten Primerpaare.

Bezeichnung	Annealingtemperatur ($^{\circ}$ C)	Zyklenzahl
Bax	55	25
Bnip3	60	25
Bnip3L/Nix	58	30
DR4	55	28
DR5	55	25
DcR1	56	30
DcR2	58	30
CHOP	55	28
c-Jun/GAPDH	56	30/30
GAPDH	55	25
Noxa	58	30
Puma	54	38

4.5.2 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden Nukleinsäurestränge in einem Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt und qualitativ bzw. semi-quantitativ untersucht oder für weitere Aufgaben aus dem Gel präpariert. Nukleinsäurefragmente zwischen 0,1 und 10 kb wurden auf 2 %igen (w/v) Agarosegelen aufgetrennt. Dazu wurde die Agarose in TAE-Puffer angesetzt, in einer Mikrowelle aufgekocht und vor dem Gießen in vorbereitete Gießstationen mit Ethidiumbromid [2 mg/mL] versetzt. Den Ansätzen wurde vor der Auftrennung noch 1/6 6x-Ladepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot) hinzugegeben. Je nach Taschenvolumen wurden zwischen 10 und 15 μ L pro Ansatz aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in TAE-Puffer bei einer konstanten Spannung (5-6 V/cm² Gel) für mindestens 30 min durchgeführt. Im Anschluß wurden die Ethidiumbromid-gefärbten Nukleinsäurefragmente mit einem Geldokumentationssystem (MWG Biotech, Ebersberg) bei 254 nm sichtbar gemacht und digital fotografiert.

4.7 Oligo GEMicroarray-Analyse

DNA-Microarrays erlauben es, die Transkriptionsaktivität zahlreicher Gene parallel zu untersuchen. Die in dieser Arbeit eingesetzten Oligo GEMicroarrays (OHS-12, Superarray/Biomol, Hamburg) gestatten die simultane Untersuchung von 96 Apoptose- und Zelltod-relevanten Genen. Dazu sind synthetische Oligonukleotide, die als Sonden dienen, in einem Raster von Vierergruppen, sogenannten Oligonukleotid-Tetraspots, auf einer 3,8 x 4,8 cm großen Nylon-Membran angeordnet. Neben diesen Signalwegs-spezifischen Oligonukleotidsonden befinden sich zur Normalisierung weitere gegen Haushaltsgene gerichtete Sonden sowie leere Felder (Leerwert) auf der Membran.

4.7.1 Hybridisierung und Detektion

Die Präparation von Gesamt-RNA wurde wie in 4.5.1 beschrieben durchgeführt, jedoch wurde verstärkt auf die Reinheit ($A_{260}/A_{280} > 1,8$) und die Qualität der Präparation geachtet. Dazu wurde ein Aliquot entnommen und qualitativ mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Synthese von cDNA und in der Folge von Biotin-UPT-markierter cRNA richtete sich, wie auch die anschließenden Arbeitsschritte, nach den Angaben des Herstellers. Die cRNA wurde aufgereinigt und über Nacht mit der GEMicroarray-Membran hybridisiert. Anschließend wurde Streptavidin-konjugierte alkalische Phosphatase an die biotinylierten cRNA-Oligonukleotide gebunden. Nach mehreren Waschschritten wurde die Membran für 5 min mit CDP-Star-Lösung inkubiert, die von der alkalischen Phosphatase als Substrat in einer Chemilumineszenz-Reaktion umgesetzt wird. Schließlich wurde der Array vorsichtig in Frischhaltefolie eingeschlagen und in einer Entwicklerkassette deponiert. Darüber wurde ein Röntgenfilm exponiert und die Hybridisierungsereignisse als Schwärzung auf dem Film detektiert. Jedes Oligo GEMicroarray-Experiment wurde mindestens zweimal wiederholt.

4.7.2 Auswertung der Daten

Der belichtete Röntgenfilm wurde mit der Software „GEMicroarray Expression Analysis Suite“ ausgewertet. Dazu wurde der Film eingescannt und das digitalisierte Bild online in das Java-Script-basierte Programm geladen. Da die Schwärzung auf dem Film proportional zur Häufigkeit des untersuchten Transkriptes ist, ermöglicht die Software eine Quantifizierung der Genexpressionsaktivität nach unterschiedlichen Vorgaben. So können verschiedene Kombinationen von Haushaltsgenen und synthetischen internen Markern zur Normalisierung verwendet werden. Es erwies sich als zweckmäßig, die zu analysierenden Signale nach einem automatischen Hintergrundabgleich mit den Signalen von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Ribosomales Protein S27a (RPS27A), Beta-2-Microglobulin (B2M), Heat Shock 90 kDa Protein 1 (HSP90AB1), β -Actin (ACTB) und Biotinylated Artificial Sequence 2 Complementary Sequence (BAS2C) zu normalisieren. Pro untersuchter Zelllinie und Behandlung wurden drei unabhängige

Oligo GEArray-Analysen durchgeführt und mit der Software „GEArray Expression Analysis Suite“ ausgewertet. Abschließend wurden die Daten in MS Excel exportiert und dort überprüft bzw. formatiert und weiter bearbeitet.

4.8 Analyse von Proteinen

4.8.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden mindestens $2,5 \cdot 10^5$ Zellen/Vertiefung in 6-Lochplatten ausgesät. Nach Abschluß der jeweiligen Behandlung wurde der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen und ca. 80 μL SDS-Lysepuffer (Tabelle 4.4) pro Vertiefung hinzugegeben. Mit einem Zellschaber wurden die Extrakte in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, für 15 min bei 95°C aufgeköcht und schließlich für weitere 15 min bei 15.000 x g zentrifugiert.

Tabelle 4.4: SDS-Lysepuffer.

Zusammensetzung:	Ansatz für 10 mL
2 % SDS (w/v)	2 mL 10 % SDS-Stammlösung
68,5 mM Tris-HCl (pH 6,8)	685 μL
10 % Glycerin	1 g
dH ₂ O	add 10 mL

4.8.2 Proteingehaltsbestimmung von Gesamtzellextrakten

Der Proteingehalt von Gesamtzellextrakten wurde mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce/Perbio Science, Bonn) bestimmt. Im ersten Schritt des BCA-Assays, der sogenannten Biuret-Reaktion, werden unter alkalischen Bedingungen Cu^{2+} -Ionen durch die Peptidbindungen im Ansatz zu Cu^{1+} -Ionen reduziert. Im zweiten Schritt bilden jeweils zwei Bichinonsäure (BCA)-Moleküle mit einem Cu^{1+} -Ion einen tiefvioletten, wasserlöslichen Komplex, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm liegt (Wiechelman et al. 1988). Die Methode ermöglicht die Detektion von Proteinmengen zwischen 0,2 und 50 μg .

Die Zellextrakte wurden nach Herstellerangaben mit BCA inkubiert, photometrisch vermessen und der Proteingehalt anhand einer BSA-Standardkurve ermittelt.

4.8.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Bei der diskontinuierlichen Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine entsprechend ihrer Größe und Ladung in Polyacrylamidgelen nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970) aufgetrennt. Der Proteinansatz wird mit Natriumlaurylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) und β -Mercaptoethanol versetzt und bei 95°C erhitzt. Das

β -Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken. Das SDS bricht die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine auf und zwingt sie in eine ellipsoide Form. Im elektrischen Feld wandern die Proteine entsprechend ihrer Gesamtladung, die proportional zu ihrer Größe ist. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden zwei Gele, ein Sammel- (5 %, Tabelle 4.5) und ein Trenngel (10-15 %, Tabelle 4.6) übereinander geschichtet. An der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel entsteht eine scharfe Proteinbande, die ein reproduzierbares Einlaufen in das Trenngel gewährleistet. Die Polymerisierung der Gele erfolgt ausgehend von Acrylamid (Monomer) und Bisacrylamid (bifunktional) und wird durch Zugabe von 1/2000 TEMED (Katalysator) und 1/100 APS (Quervernetzer) gestartet.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich 12 %ige Trenngele mit einer Stärke von 1 mm verwendet. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit 1/6 Protein-Auftragspuffer (Tabelle 4.7) versetzt und für max. 5 min bei 95°C aufgekocht. Die Elektrophorese erfolgte in Western Blot-Elektrophoresepuffer (Tabelle 4.8) bei konstanter Spannung in zwei Phasen: Beim Einlaufen der Proben in das Sammelgel wurde eine Spannung von max. 90 V angelegt, bei der anschließenden Auftrennung im Trenngel max. 140 V. Nach dem Blotting (vgl. Abschnitt 4.8.4 Western Blot-Analyse) wurden die Gele mit Simply Blue Safe Stain (Invitrogen, Karlsruhe) für mindestens 2 h bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln gefärbt, und nach Spülen mit klarem Wasser für 2 h in destilliertem Wasser entfärbt. Im Anschluss wurden die Gele auf Whatman-Papier gelegt und unter Seranfolie auf einem Geltrockner (Biorad, München) getrocknet.

Tabelle 4.5: Sammelgel (5 %) nach Laemmli.

Zusammensetzung	Ansatz für 100 mL (mL)
40 % Acrylamid	12,5
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	12,5
10 % SDS	1,0
dH ₂ O	72,5

Tabelle 4.6: Trenngel (12 %ig) nach Laemmli.

Zusammensetzung	Ansatz für 10 mL (mL)
40 % Acrylamid	3,0
1 M Tris-HCl (pH 8,8)	3,75
10 % SDS	0,1
dH ₂ O	3,15

Tabelle 4.7: Protein-Auftragspuffer.

Zusammensetzung	Ansatz für 50 mL 6x Puffer
0,01 % ServaBlue G	30 mg
4 % SDS	12 g
10 % Glycerin	15 g
50 mM Tris/HCl (pH 6,8)	15 mL 1 M Tris/HCl (pH 6,8)-Stammlösung
2 % β -Mercaptoethanol	6 mL
dH ₂ O	add 50 mL

Tabelle 4.8: Western Blot-Elektrophoresepuffer (10x).

Zusammensetzung	Ansatz für 1 L 10x Puffer
25 mM Tris	30,3 g
192 mM Glycin	144 g
0,1 % SDS	10 g
dH ₂ O	add 1000 mL

4.8.4 Western Blot

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Western Blot-Protokoll werden Proteine elektrophoretisch im „semi-dry“-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und später mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht und analysiert. Dazu wurde ein Whatman-Papier auf die mit Transferpuffer (Tabelle 4.9.) befeuchtete Anodenplatte des Blotters gelegt. Die nächste Schicht bildete die Membran, auf die vorsichtig das Polyacrylamidgel mit den elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen gelegt und sorgsam glattgestrichen wurde. Die oberste, der Kathodenplatte zugewandte Schicht bildete eine weitere Lage Whatman-Papier. Sowohl das Whatman-Papier, als auch das Gel und die Membran wurden zuvor mindestens 10 min in eiskaltem Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 2 mA/cm² Gel für 90 min. Anschließend wurde die Membran mit destilliertem Wasser gewaschen und kurz in Ponceau S Certistain-Lösung geschwenkt, um die Qualität der Auftrennung und des Blots abzuschätzen.

Tabelle 4.9: Western Blot-Transferpuffer

Zusammensetzung	Ansatz für 1 L Puffer (mL)
10x Elektrophoresepuffer	50
Methanol	200
dH ₂ O	add 1 L

4.8.5 Immundetektion

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde diese mit 5 %iger Blocko-Lösung (Tabelle 4.10) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Primär-Antikörper wurde, seinen Hybridisierungseigenschaften entsprechend, in 3 %igem Blocko verdünnt (1:2000 bis 1:50) und mit der Membran über Nacht bei 4°C hybridisiert. Nach drei 5-minütigen Waschschritten mit TBS plus 0,05 % Tween 20 wurde die Membran mit dem Sekundär-Antikörper für weitere 120 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß folgten drei 15-minütige Waschschrritte bevor die Membran für 1 min mit ECL-Lösung (ECL Enhanced Chemiluminescence, Pierce/Perbio Science, Bonn) inkubiert wurde.

Das im ECL enthaltene Luminol wird in einer Chemilumineszenz-Reaktion von dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (Horseredish Peroxidase, HRP) gespalten, das an den Sekundär-Antikörper gekoppelt ist. Die dabei emittierten Photonen können über die Schwärzung eines Röntgenfilms detektiert werden.

Überschüssiges ECL wurde mit einem Papiertuch abgetupft und die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen. In einer handelsüblichen Entwicklerkassette wurde ein Röntgenfilm auf der Membran exponiert und in mehreren Schritten die Belichtung optimiert.

Tabelle 4.10: Blocko-Lösung zum Absättigen und Verdünnen von Antikörpern

Zusammensetzung	Ansatz für 500 mL Blocko
3-5 % Milchpulver (w/v)	15-25 g
50 mM Tris (pH 7,5)	3,0 g
150 mM NaCl	4,4 g
0,05 % Tween	250 µL
dH ₂ O	add 500 mL

4.8.6 Entfernen von Antikörpern („Stripping“)

Um Primär- und Sekundär-Antikörper von einer Membran zu entfernen, wurde diese für mindestens 5 min mit PBS gewaschen und dann für 25 min mit 0,01 mM HCl bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde dann für 10 min mit PBS neutralisiert und im Anschluß für weitere 25 min mit 0,01 mM NaOH inkubiert. Darauf folgte ein weiterer Waschschrtritt und eine Behandlung mit 5 %igem Blocko für 1 h. Im Anschluß daran wurde die Membran erneut mit einem Primär-Antikörper hybridisiert.

4.9 Statistik

Die gezeigten Daten sind, soweit nicht anders vermerkt, mit dem Standardfehler des Mittelwertes (\pm SEM) dargestellt. Für statistische Vergleiche wurden mit der Software SPSS

Version 11.0 (vgl. Abschnitt 3.13) T-Tests und ANOVA-Varianzanalysen in Kombination mit dem Tukey's-Test durchgeführt. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant definiert.

5 Ergebnisse

5.1 Funktionelle Analyse und Charakterisierung der Zelltod-Induktion in Gliomzelllinien

5.1.1 Gliomzelllinien zeigen eine hohe Variabilität bezüglich ihrer Anoxie-Toleranz

In zahlreichen Tumorzelllinien nicht-glialen Ursprungs (Amellem et al. 1997; Araya et al. 1998) und nicht-transformierten Zellen (Saikumar et al. 1998b) zeichnet sich der Hypoxie-induzierte Zelltod *in vitro* durch einen apoptotischen Phänotyp aus. Im Gegensatz dazu ist der Zelltod von Gliomzellen *in vivo* trotz massiver Hypoxie hauptsächlich nekrotisch (Tohma et al. 1998; Steinbach et al. 2005), was u.a. auf eine Adaption an niedrige Sauerstoffkonzentrationen durch Veränderungen des intrinsischen Apoptose-Signalwegs schließen lässt. Um Zelllinien mit einer möglichst großen Variabilität hinsichtlich ihrer Anoxie-Toleranz zu identifizieren, wurden 17 Gliomzelllinien einer 48-stündigen Anoxie ausgesetzt. In Vorversuchen mit 24-, 48- und 72-stündiger Anoxie-Exposition hatte sich dieser Zeitraum als optimal erwiesen (Daten nicht gezeigt).

In diesen Vorversuchen wurde zudem das Wachstumsverhalten der Zelllinien untersucht, um zum Zeitpunkt t_0 der Anoxie-Exposition Kulturen mit vergleichbarer Zelldichte (30-40 % relative optische Konfluenz) zu erhalten. (Daten nicht gezeigt). Durch Färbung der Zellen mit Propidiumiodid (PI) und anschließende durchflusszytometrische Untersuchung der PI-Aufnahme konnten sehr unterschiedliche Reaktionen auf lange anhaltenden Sauerstoffmangel bestimmt werden (Tabelle 5.1). Dazu wurde jeweils der Quotient aus dem Anteil PI-positiver Zellen nach 48-stündiger Anoxie und dem Anteil PI-positiver Kontrollzellen ermittelt. Die Ergebnisse wurden der Größe nach aufsteigend geordnet und kategorisiert. Erstaunlicherweise wurde für drei Zelllinien, darunter U343 (Abbildung 5.1), ein Quotient $\leq 1,3$ („Anoxie-resistent“) und für fünf Zelllinien ein Quotient $\leq 2,0$ („Anoxie-tolerant“) ermittelt. Für fünf weitere Zelllinien wurde ein Quotient zwischen 2,1 und 3,4 („Anoxie-anfällig“) errechnet. Bei vier Zelllinien, darunter U373 (Abbildung 5.1), lag der Quotient über 3,9 („Anoxie-sensitiv“).

Tabelle 5.1: Vergleichende Untersuchung der Anoxie-Toleranz von 17 Gliomzelllinien. Nach 48-stündiger Anoxie wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) gefärbt und der Zelltod durchflusszytometrisch anhand der Aufnahme von PI analysiert. Die Daten entsprechen Mittelwerten \pm SEM von $n = 4$ unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten erzielt.

Zelllinie	Zelltod Anoxie/ Zelltod Normoxie	SEM	Zelllinie	Zelltod Anoxie/ Zelltod Normoxie	SEM
MZ-18	1,0	0,12	MZ-257	2,4	0,08
U343	1,2	0,14	MZ-304	2,6	0,31
MZ-348	1,3	0,17	U87	3,0	0,28
MZ-290	1,5	0,13	U251	3,4	0,41
MZ-256	1,7	0,20	U373	3,9	0,75
MZ-373	1,7	0,24	MZ-54	3,9	0,23
MZ-159	2,0	0,30	MZ-51	4,6	0,69
MZ-294	2,0	0,28	MZ-226	4,8	0,68
MZ-327	2,1	0,31			

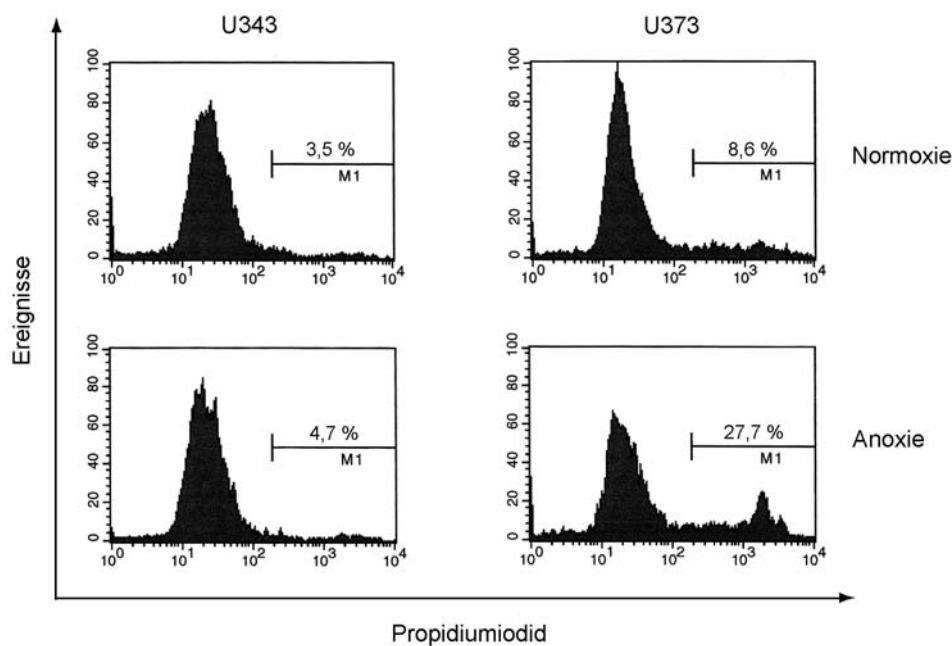


Abbildung 5.1: PI-Aufnahme nach 48 h Anoxie. Nach 48-stündiger Anoxie-Exposition wurden die Zellen mit PI gefärbt und durchflusszytometrisch auf PI-Aufnahme hin untersucht. Die abgebildeten Histogramme wurden mit WinMDI 2.8 erstellt und sind repräsentative Ergebnisse aus Analysen von jeweils $n = 4$ unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erzielt.

5.1.2 Anoxie induziert einen nekrotischen Zelltod in Gliomzellen

Als prototypische Vertreter Anoxie-resistenter und Anoxie-sensitiver Zelllinien wurden U343 und MZ-54 nach Anoxie-Exposition durchflusszytometrisch auf die Bindung von Annexin-V und die Aufnahme von PI hin untersucht. Nach 24 h Anoxie konnte in keiner der beiden Zelllinien spezifische Annexin-V-Bindung oder PI-Aufnahme nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Auch nach 48 h Anoxie wurde in U343-Kulturen keine signifikante Zunahme gefärbter Zellen im Vergleich zur Kontrolle verzeichnet (Abbildung 5.2 A). In MZ-54-Kulturen hatten dagegen über 60 % der Zellen PI aufgenommen, jedoch weniger als 11 % Annexin-V spezifisch gebunden. Ähnliche Ergebnisse wurden in Anoxie-sensitiven U373- und Anoxie-anfälligen U87- bzw. U251-Zellen erzielt. In der Anoxie-resistenten Zelllinie MZ-18 konnte wie in U343 weder Annexin-V-Bindung noch PI-Aufnahme nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die durchflusszytometrische Analyse des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) in den sechs genannten Zelllinien nach TMRM-Färbung zeigte, dass Anoxie-Toleranz und das Vermögen $\Delta\Psi_m$ aufrecht zu erhalten, eng miteinander korrelieren (Abbildung 5.2 B): Während die resistenten Zelllinien U343 und MZ-18 $\Delta\Psi_m$ nahezu unbeeinträchtigt aufrecht erhielten, zeigte sich in den sensitiven MZ-54-Zellen während der 48-stündigen Anoxie ein fast vollständiger Verlust von $\Delta\Psi_m$. Trotz dessen wurde in keiner der sechs Zelllinien nach 48 h Anoxie eine detektierbare Aktivierung von Caspasen festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Diese Befunde deuten an, dass 1) Gliomzellen unter anoxischen Bedingungen die Apoptoseaktivierung über den intrinsischen Apoptose-Signalweg potent unterdrücken können und 2) dass durch Anoxie in Gliomzellen ein Caspase-unabhängiger, nekrotischer Zelltodtyp induziert wird.

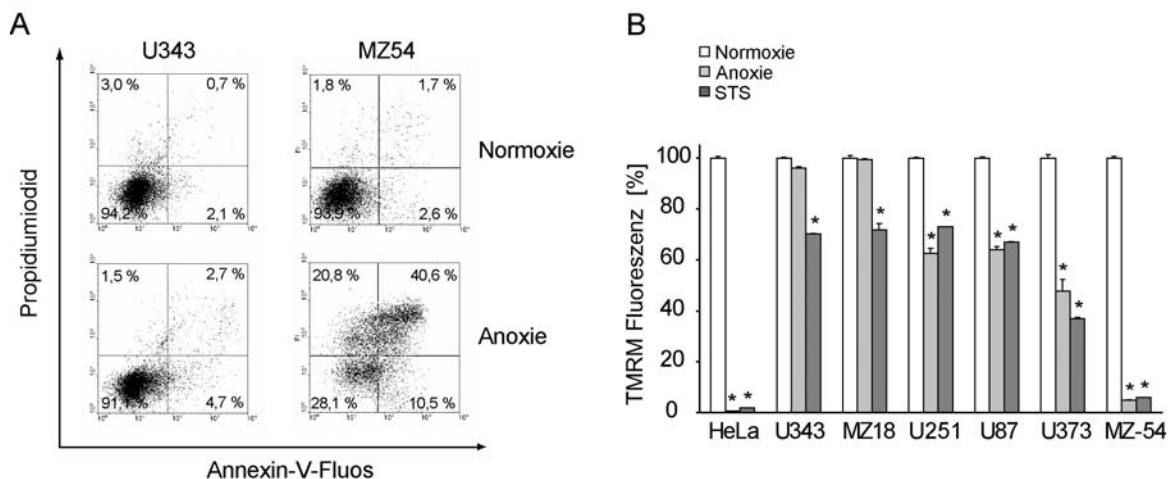


Abbildung 5.2: Charakterisierung des Anoxie-induzierten Zelltods. **A** U343- und MZ-54-Zellen wurden nach 48 h Anoxie mit Annexin-V-Fluos und PI gefärbt und durchflusszytometrisch auf Annexin-V-Bindung und PI-Aufnahme hin analysiert. Die abgebildeten Dot-Plots sind repräsentative Ergebnisse aus Analysen von jeweils $n = 4$ unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erzielt. **B** Sechs Zelllinien mit unterschiedlichen Anoxie-Toleranzen wurden nach 48 h Anoxie oder 24-stündiger Behandlung mit $5 \mu\text{M}$ STS mit 30 nM TMRM gefärbt und $\Delta\Psi_m$ durchflusszytometrisch untersucht. HeLa-Zellen dienen als Kontrolle. Die Daten entsprechen Mittelwerten \pm SEM von $n = 4$ unabhängigen Kulturen. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur jeweiligen normoxischen Kontrolle. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erzielt.

5.1.3 Die Expression Zelltod-promovierender Gene des intrinsischen Signalwegs der Apoptose korreliert nicht mit der Anoxie-Adaption von Gliomzellen

Um der Frage nachzugehen, ob möglicherweise die fehlende Expression Zelltod-promovierender Gene an der Anoxie-Adaption von Gliomen beteiligt ist, wurde die basale transkriptionelle Expression von Bax und den zur BH3-only-Gruppe zählenden Bcl-2-Genfamilienmitgliedern Bnip3, Bnip3L/Nix, Noxa und Puma in 10 Gliomzelllinien untersucht. Unter anoxischen Bedingungen stehen Bnip3, Bnip3L/Nix und Noxa unter der transkriptionellen Kontrolle von HIF-1 (Greijer and van der Wall 2004; Kim et al. 2004a). Zudem werden Noxa und Puma durch p53-reguliert, das unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert wird und in der Zelle akkumuliert (Oda et al. 2000; Yu and Zhang 2003).

Während in sämtlichen untersuchten Zelllinien keine mit dem Grad ihrer Anoxie-Adaption korrelierbaren Auffälligkeiten festgestellt wurden, zeigten die Anoxie-resistenten U343-Zellen eine signifikant reduzierte Expression von Bax und Noxa (Abbildung 5.3). Zudem wurde Bnip3 nur schwach exprimiert. Ein direkter Vergleich mit den Anoxie-resistenten Zelllinien MZ-18 und MZ-348 (vgl. Tabelle 5.1) ließ jedoch keine Übereinstimmung in den Expressionsprofilen der betreffenden Gene erkennen. Dieser Befund deutet darauf hin, dass es sich im Falle von U343 um individuelle Aberrationen der Genexpression handelt, die möglicherweise zur ausgeprägten Apoptose-Resistenz der Zellen beitragen, aber offensichtlich kein allgemeinverbindliches Merkmal Anoxie-resistenter Gliomzellen darstellen.

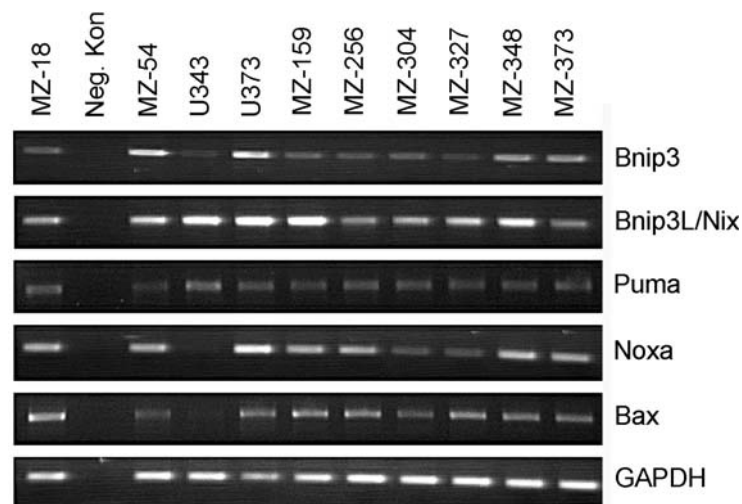


Abbildung 5.3: Die Expression Zelltod-promovierender Faktoren des intrinsischen Signalwegs der Apoptose korreliert nicht mit der Anoxie-Adaption von Gliomzellen. Aus Kulturen von 10 Gliomzelllinien wurde die Gesamt-RNA 24 h nach Aussaat extrahiert und mittels semi-quantitativer RT-PCR auf das Expressionsniveau von Bnip3 (25 Zyklen), Bnip3L/Nix (30 Zyklen), Noxa (30 Zyklen), Puma (38 Zyklen) und Bax (25 Zyklen) hin untersucht. GAPDH (25 Zyklen) diente als Kontrolle. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. (M = Marker, Neg. Kon = Negativkontrolle)

5.1.4 Die Resistenz gegen den Todesliganden TRAIL ist ein häufiges Phänomen in Gliomzelllinien

Die in Abschnitt 5.2 näher untersuchten sechs Zelllinien (U343, MZ-18, U251, U87, U373 und MZ-54) wurden in einem Zeitverlaufs-Experiment auf ihre Sensitivität gegenüber dem Todesliganden TRAIL hin untersucht. Dazu wurden die Zellen bis zu 48 h mit 250 ng/mL TRAIL inkubiert. Diese Konzentration hatte sich in Vorversuchen als optimal erwiesen (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise konnte TRAIL nur in zwei der sechs Zelllinien Zelltod induzieren: Frühestens 36 h nach Behandlungsbeginn wurde ein signifikant erhöhter Anteil toter Zellen in U87 und U251 gemessen (Abbildung 5.4 A, Zusammenfassung in Tabelle 5.2). In den Zelllinien U343, U373, MZ-18 und MZ-54 hingegen wurde auch nach 72 h keine Reaktion auf TRAIL verzeichnet (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Resistenz gegen TRAIL in malignen Gliomen ein häufiges Phänomen darstellt.

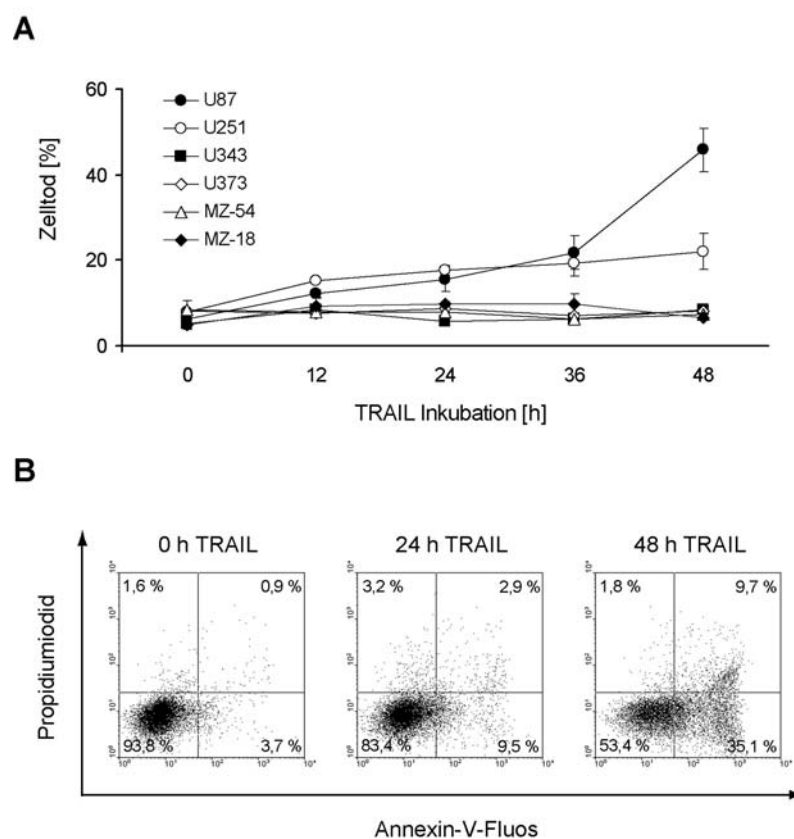


Abbildung 5.4: Untersuchung des TRAIL-induzierten Zelltods. **A** Die Zelllinien U87, U251, U343, U373, MZ-54 und MZ-18 wurden zwischen 12 und 48 h mit 250 ng/mL TRAIL behandelt, mit Annexin-V-Fluos und PI gefärbt und der Anteil toter Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Daten entsprechen Mittelwerten \pm SEM von $n = 4$ unabhängigen Kulturen in mindestens drei unabhängigen Experimenten. **B** U87-Zellen wurden wie oben beschrieben gefärbt und analysiert. Die abgebildeten Dot-Plots sind repräsentative Ergebnisse aus Analysen von jeweils $n = 4$ Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erzielt.

5.1.5 TRAIL induziert einen apoptotischen Zelltod in Gliomzellen

Im Gegensatz zum Anoxie-induzierten Zelltod, der, wie oben beschrieben, Nekrose-typische Merkmale aufweist, aktivierte TRAIL in der TRAIL-sensitiven Zelllinie U87 einen apoptotischen Zelltod mit charakteristischen Merkmalen wie Caspase-Aktivierung und spezifischer Annexin-V-Bindung (Abbildung 5.4 B). Ähnliche Ergebnisse wurden mit der Zelllinie U251 erzielt (Daten nicht gezeigt).

5.1.6 Die TRAIL-Sensitivität korreliert nicht mit der Expression von TRAIL-assoziierten Todes- und Decoy-Rezeptoren

TRAIL aktiviert über die Bindung an die Todesrezeptoren DR4 und DR5 eine Apoptose-einleitende Signalkaskade (Walczak and Krammer 2000). Die sogenannten Decoy-Rezeptoren DcR1 und DcR2 binden TRAIL zwar, leiten aufgrund einer fehlenden (DcR1) oder unvollständigen (DcR2) intrazellulären Todesdomäne das Signal jedoch nicht weiter (Kimberley and Screaton 2004). Mögliche Erklärungen für die verbreitete TRAIL-Resistenz von Gliomzellen wären eine zu niedrige Expression von Todesrezeptoren oder eine zu starke Expression von Decoy-Rezeptoren. Aus diesem Anlass wurden 16 Zelllinien, darunter die in den vorigen Abschnitten genauer charakterisierten U87, U251, MZ-18, MZ-54, U343 und U373, auf die basale transkriptionelle Expression der vier TRAIL-Rezeptoren hin untersucht.

In allen Zelllinien konnte die Expression von DR5 nachgewiesen werden, auch wenn deutliche Unterschiede des Expressionsniveaus festgestellt wurden (Abbildung 5.5). DR4, DcR1 und DcR2 wurden in zehn (63 %) bzw. elf (69 %) und fünf Zelllinien (31 %) exprimiert. Ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen der Zelltodanalyse (Abschnitt 5.1.4) erlaubte jedoch keine Korrelation zwischen TRAIL-Resistenz und erniedrigter Todesrezeptor-Expression oder erhöhter Decoy-Rezeptorexpression (Tabelle 5.2). Dies legt den Schluß nahe, dass die TRAIL-Resistenz ihre Ursachen in einer Deregulierung des Signalwegs stromabwärts der Rezeptoren hat.

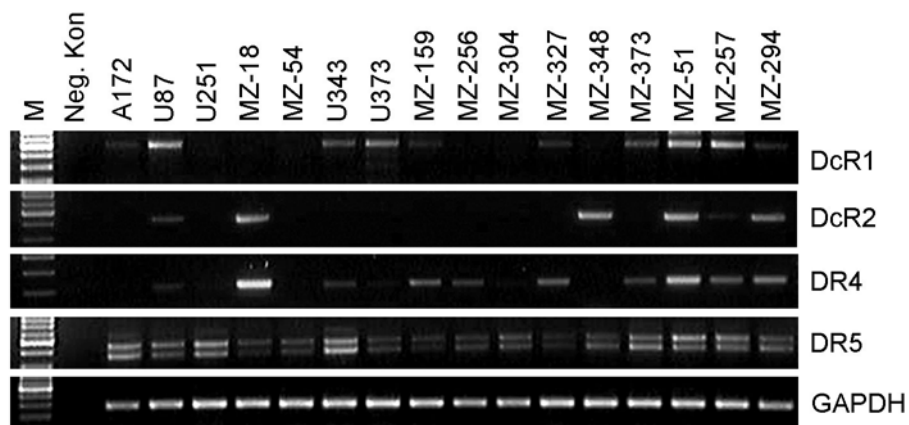


Abbildung 5.5: Basale transkriptionelle Expression von TRAIL-Rezeptoren in Gliomzellen. Aus Kulturen aller 16 Zelllinien wurde 24 h nach Aussaat die Gesamt-RNA extrahiert und mittels semi-quantitativer RT-PCR auf das Expressionsniveau von DcR1 (30 Zyklen), DcR2 (30 Zyklen), DR4 (28 Zyklen) und DR5 (25 Zyklen) hin untersucht. GAPDH (25 Zyklen) diente als Kontrolle. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. (M = Marker, Neg. Kon = Negativkontrolle)

Tabelle 5.2: Zusammenfassung der Daten aus den Abbildung 5.4 A und 5.5. „TRAIL-sensitiv“ bezieht sich auf einen statistisch signifikant erhöhten Anteil toter Zellen zu mindestens einem Zeitpunkt der Messung, verglichen mit der jeweiligen unbehandelten Kontrolle.

Transkript	U87	U251	MZ-18	MZ-54	U343	U373
DcR1	+	-	-	-	+	+
DcR2	+	-	+	-	-	-
DR4	+	-	+	-	+	+
DR5	+	+	+	+	+	+
TRAIL-sensitiv	ja	ja	nein	nein	nein	nein

5.2 Strategien zur Apoptose-Reaktivierung in Gliomzellen

5.2.1 Synergistische Wirkung von Gammastrahlung und TRAIL

Durch seine selektive Zytotoxizität gilt TRAIL als das vielversprechendste Zytokin für die Krebstherapie (Shankar and Srivastava 2004). Jedoch macht die Resistenz einiger Tumortypen, darunter maligne Gliome (siehe Abschnitt 5.1.3), neue kombinatorische Ansätze notwendig, um die Effektivität von TRAIL zu steigern. In Prostata- und Darmkarzinomzelllinien konnten mit Gammastrahlen-induzierter DNA-Schädigung und TRAIL synergistische Effekte erzielt werden (Wendt et al. 2005). Da Gamma-Bestrahlung gegenwärtig eine tragende Säule der Gliomtherapie ist (Chamberlain 2006), stellte sich die Frage, ob ihre Wirkung auch in Gliomen das therapeutische Potential von TRAIL steigern kann.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden die TRAIL-resistenten Zelllinien U343 und U373 und die TRAIL-sensitive Zelllinie U87 im Zentrum der Radiologie des J.W. Goethe-Universitätsklinikums in Einzeldosen mit je 10 und 20 Gy bestrahlt und nach 24 h mit 250 ng/mL

TRAIL für weitere 24 h inkubiert. Die Bestrahlung mit 10 Gy hatte keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen, auch nicht in Kombination mit TRAIL (Daten nicht gezeigt). Hingegen induzierten 20 Gy in allen drei Zelllinien signifikant Zelltod zwischen 20 und 30 % und potenzierten den TRAIL-induzierten Zelltod in der Zelllinie U87 (Abbildung 5.5). In U343 und U373 konnte hingegen kein synergistischer Effekt von Gammastrahlung und TRAIL festgestellt werden. Da U87 und U343-Zellen funktionelles p53 exprimieren, U373-Zellen jedoch nicht (Asai et al. 1994; Badie et al. 1999), kann der p53-Status als Erklärung für diesen Befund ausgeschlossen werden. Vielmehr muss angenommen werden, dass die Blockade der apoptotischen Signaltransduktionskaskaden stromabwärts der TRAIL-Rezeptoren in den TRAIL-resistenten Zelllinien so massiv ist, dass auch die durch DNA-Schädigung aktivierten Signale keine TRAIL-Sensitivierung induzieren können.

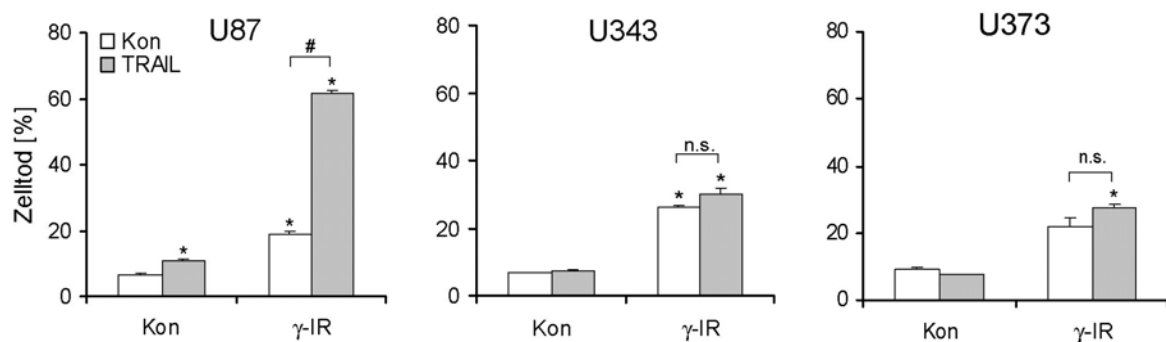


Abbildung 5.5: Synergistische Wirkung von TRAIL und Gamma-Bestrahlung. Die Zelllinien U87 (TRAIL-sensitiv), U343 und U373 (beide TRAIL-resistent) wurden 24 h nach einer Einzeldosis Gammastrahlung [20 Gy] für 24 h mit TRAIL [250 ng/mL] inkubiert und durchflusszytometrisch auf Annexin-V-Bindung und PI-Aufnahme hin untersucht. Die Daten entsprechen Mittelwerten \pm SEM von $n = 4$ unabhängigen Kulturen. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. #, $p < 0,05$ im Vergleich zur angegebenen Behandlung. Ähnliche Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Experimenten erzielt. (γ -IR = Gamma-Bestrahlung)

5.2.2 BH3-Mimetika

Die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie, darunter Bcl-2, Bcl-xL, A1/Bfl-1, Bcl-w, Bcl2L12 und Mcl-1, sind wichtige Regulatoren des Zellüberlebens. Sie halten die pro-apoptotischen Multidomänen-Proteine Bak und Bax durch Heterodimerisierung in Schach und hindern sie an der Permeabilisierung der Mitochondrienmembran, die unwiderruflich zur Freisetzung von pro-apoptotischen Molekülen aus dem mitochondrialen Intermembranraum und zur Ausführung der Apoptose-Programme führt (Jaattela 2004; Kroemer et al. 2007).

Aus diesem Zusammenhang ergab sich die Frage, ob möglicherweise die Überexpression von Bcl-2 oder Bcl-2-verwandten Proteinen für die ausgeprägte Anoxie-Toleranz bzw. TRAIL-Resistenz mancher Gliomzelllinien mitverantwortlich ist. Dazu wurde zunächst die basale Proteinexpression von Bcl-2 und Bcl-xL in fünf Zelllinien mittels Western Blot-Analyse untersucht

(Abbildung 5.6 A). Als interne Kontrolle dienten U87-Zellen, die Bcl-2 und Bcl-xL massiv überexprimieren, wie ein Vergleich mit nicht-transformierten humanen Astrozytenzellen zeigte (Jiang et al. 2003). Bcl-2 und Bcl-xL wurden, mit Ausnahme von U373, in allen Zelllinien auf einem Niveau überexprimiert, das mit dem Expressionslevel in U87-Zellen vergleichbar ist oder diesen übersteigt. In U373 war das Expressionsniveau beider Proteine deutlich niedriger als in U87, in MZ-54 lag es knapp darunter. U373 und MZ-54 waren im Vorfeld beide als Anoxie-sensitive Zelllinien identifiziert worden (vgl. Abschnitt 5.1.1). Auffallend hoch exprimiert wurde Bcl-2 in den Zelllinien MZ-18 und U343, die schon durch ihre hohe Anoxie-Resistenz aufgefallen waren und auch zu den TRAIL-resistenten Zelllinien zählen (vgl. Abschnitt 5.1.1 und 5.1.3).

Um gezielt der Frage nach einer Verbindung zwischen der Überexpression von Bcl-2 und Bcl-xL und der gestörten Apoptose-Induktion bei Anoxie-Exposition bzw. TRAIL-Behandlung nachzugehen, wurden spezifische synthetische Inhibitoren eingesetzt. Diese sogenannten BH3-Mimetika konkurrieren mit der BH3-Domäne pro-apoptotischer Multidomänen- oder BH3-only-Proteine um die Bindetasche von Bcl-2 und/oder Bcl-xL. HA14-1 (Abbildung 5.6 B) inhibiert spezifisch Bcl-2 (Wang et al. 2000b) während BH3I-2' (Abbildung 5.6 B) sowohl an Bcl-2 als auch an Bcl-xL binden kann (Degterev et al. 2001; Feng et al. 2003).

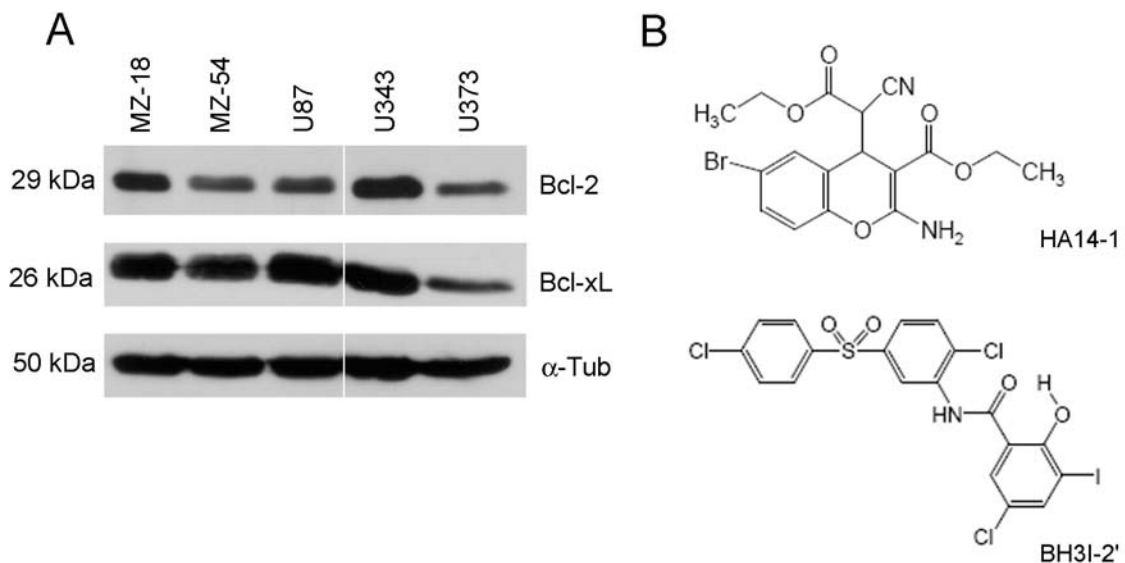


Abbildung 5.6: Western Blot-Analyse der basalen Bcl-2 und Bcl-xL Expression. A Aus MZ-18-, MZ-54-, U87-, U343- und U373-Zellen wurden Gesamtzellextrakte gewonnen und mittels Western Blot auf die basale Expression von Bcl-2 und Bcl-xL hin analysiert. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. B Strukturformeln der BH3-Mimetika BH3I-2' und HA14-1.

5.2.2.1 BH3-Mimetika und TRAIL wirken synergistisch

In Dosis-Wirkungs-Experimenten (Abbildung 5.7 A) wurde in U87-Zellen die Zytotoxizität der beiden Verbindungen untersucht, und in Kombination mit TRAIL die Konzentration mit dem besten synergistischen Effekt bestimmt. Jeweils in Konzentrationen von 30 μ M eingesetzt, konnten

BH3I-2' und HA14-1 in den beiden TRAIL-sensitiven Zelllinien U87 und U251 den TRAIL-induzierten Zelltod signifikant potenzieren (Abbildung 5.7). Darüber hinaus wurde die TRAIL-resistente Zelllinie U343 durch HA14-1 signifikant für TRAIL sensitiviert. Es muss angemerkt werden, dass 30 μ M BH3I-2' in zwei Zelllinien (U251 und U373) auch in Abwesenheit von TRAIL zytotoxisch wirkte, während HA14-1 in keiner der untersuchten Zelllinien eine zellschädigende Wirkung zeigte.

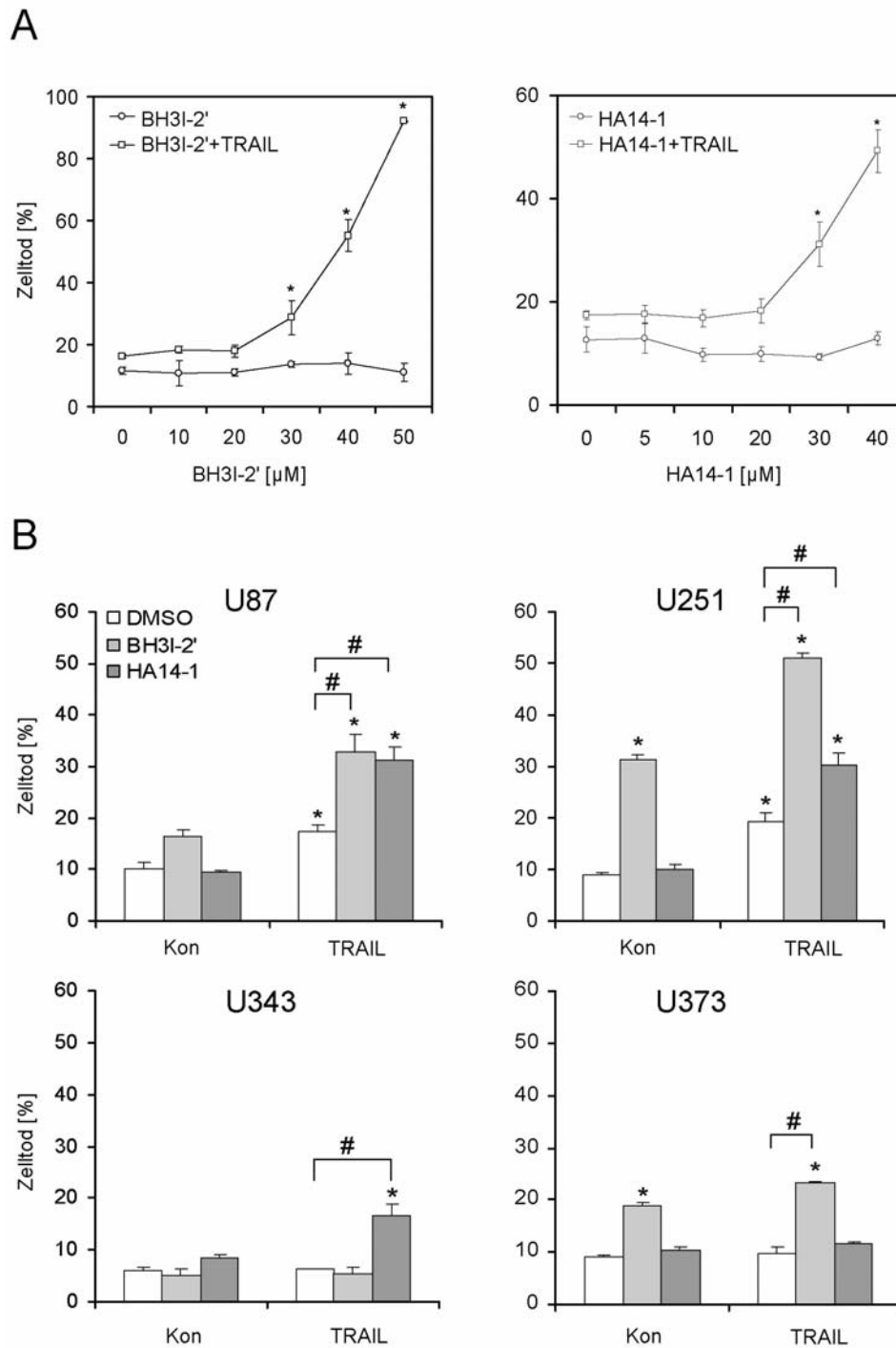


Abbildung 5.7: Synergistische Wirkung von TRAIL und BH3I-2' bzw. HA14-1. **A** Dosis-Wirkungs-Beziehung von BH3I-2' und HA14-1 allein und in Kombination mit TRAIL auf U87-Zellen. Nach 1-stündiger Vorbehandlung mit BH3I-2' oder HA14-1 wurden die Zellen für 36 h mit TRAIL [250 ng/mL] und der angegebenen Inhibitor-Konzentration inkubiert, und der Zelltod anhand durchflusszytometrischer Analyse der Annexin-V-Bindung und PI-Aufnahme bestimmt. **B** Die Zellen wurden für 1 h mit BH3I-2' oder HA14-1 vorbehandelt und für 36 h mit TRAIL [250 ng/nL] und BH3I-2' oder HA14-1 [jeweils 30 μM] inkubiert. Der Zelltod wurde durchflusszytometrisch wie oben beschrieben quantifiziert. Die Daten entsprechen Mittelwerten \pm SEM von $n=4$ unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in mindestens zwei unabhängigen Experimenten erzielt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. #, $p < 0,05$ im Vergleich zur angegebenen Behandlung.

5.2.2.2 BH3-Mimetika steigern den Anoxie-induzierten Zelltod

Um zu klären, ob die Überexpression von Bcl-2 und/oder Bcl-xL zur Apoptosedefizienz von Gliomzellen unter anoxischen Bedingungen beiträgt, wurde die Zelltod-induzierende Wirkung der beiden Inhibitoren BH3I-2' und HA14-1 unter Anoxie an den Zelllinien U343 (Anoxie-resistent) und MZ-54 (Anoxie-sensitiv) untersucht. Durch den Einsatz von BH3I-2' konnte in beiden Zelllinien eine signifikante Zunahme Anoxie-induzierten Zelltods erreicht werden (Abbildung 5.8 A). Darüber hinaus potenzierte HA14-1 den Anoxie-induzierten Zelltod sowohl in den Anoxie-sensitiven MZ-54-Zellen als auch in den Anoxie-resistenten U343-Zellen (Abbildung 5.8 B). Vergleichbare Ergebnisse wurden in U373-Zellen erzielt (Daten nicht gezeigt). Unter Kontrollbedingungen wirkten weder BH3I-2' [20 μ M] noch HA14-1 [30 μ M] zellschädigend.

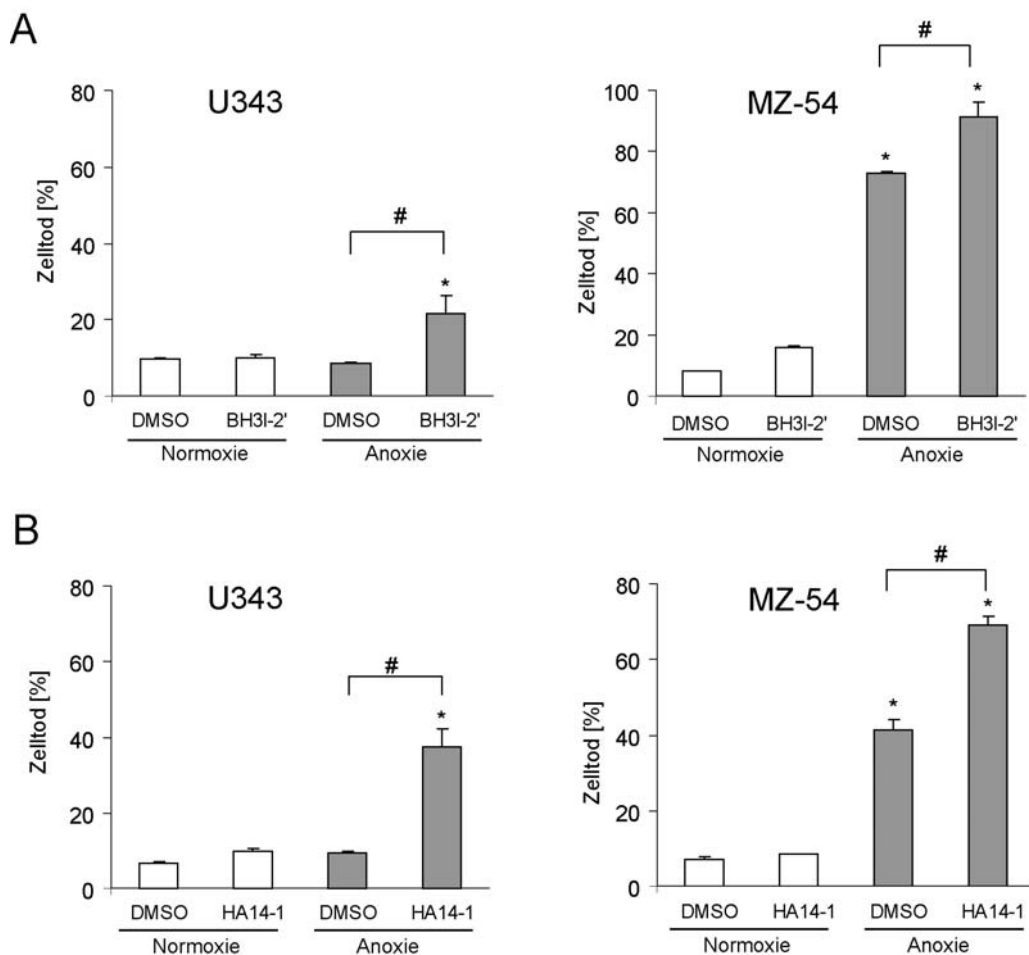


Abbildung 5.8: BH3-Mimetika steigern den Anoxie-induzierten Zelltod in Gliomzellen.

A Synergistische Wirkung von Anoxie und BH3I-2' in U343- und MZ-54-Zellen. Nach 1-stündiger Vorbehandlung mit BH3I-2' wurden die Zellen für 48 h unter anoxischen Bedingungen mit BH3I-2' [20 μ M] inkubiert. Der Anteil toter Zellen in den Kulturen wurde anhand durchflusszytometrischer Analysen der Annexin-V-Bindung und PI-Aufnahme bestimmt. **B** Synergistische Wirkung von Anoxie und HA14-1 in U343- und MZ-54-Zellen. Die Zellen wurden 1 h mit HA14-1 vorbehandelt und für 48 h mit HA14-1 [30 μ M] einer Anoxie ausgesetzt. Der Zelltod wurde wie oben beschrieben ermittelt. Die Daten entsprechen Mittelwerten \pm SEM von $n=4$ unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in mindestens zwei unabhängigen Experimenten erzielt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. #, $p < 0,05$ im Vergleich zur angegebenen Behandlung.

5.2.3 Transienter Knockdown von Mcl-1 durch RNA-Interferenz

Mcl-1 ist neben Bcl-2 und Bcl-xL ein weiteres anti-apoptotisches Regulatorprotein aus der Bcl-2-Familie, das sehr häufig in Astrozytomen überexprimiert wird (Krajewski et al. 1997). Zudem ist die Expression von Mcl-1 in malignen Gliomen mit einer frühen Tumor-Rekurrenz und einer verkürzten Überlebensrate der Patienten verknüpft (Rieger et al. 1998b). Um zu untersuchen, ob Mcl-1, ähnlich wie Bcl-2 und Bcl-xL, zur Apoptosedefizienz in Gliomzelllinien beiträgt, wurden RNA-Interferenz (RNAi)-Experimente mit spezifisch gegen Mcl-1 gerichteten doppelsträngigen siRNA-Oligonukleotiden durchgeführt.

In Vorversuchen wurde der transiente Knockdown von Mcl-1 zunächst in der Zelllinie U343 (TRAIL- und Anoxie-resistent) etabliert (Abbildung 5.9 A). Trotz einer siRNA-Konzentration von 250 nM und einer hohen Transfektionseffizienz von ca. 90 % konnte auf Proteinebene erst nach 120 h eine zufriedenstellende Repression von Mcl-1 verzeichnet werden. In der Folge wurde der Knockdown von Mcl-1 auch in den Zelllinien U87 (TRAIL-sensitiv und Anoxie-anfällig), MZ-54 (TRAIL-resistent und Anoxie-sensitiv) und U373 (TRAIL-resistent und Anoxie-sensitiv) etabliert (Abbildung 5.9 B). In U87- und MZ-54-Zellen wurde die Expression von Mcl-1 bereits 96 h nach der Transfektion mit siRNA-Oligonukleotiden auf das anvisierte Niveau abgesenkt, in U373 hingegen erst nach 120 h.

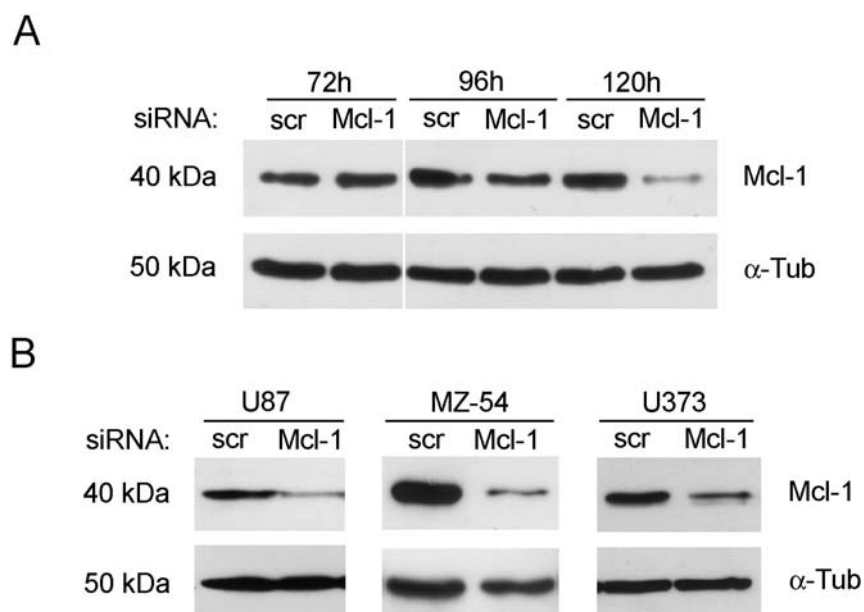


Abbildung 5.9: Etablierung des transienten Knockdowns von Mcl-1. **A** U343-Zellen wurden mit 250 nM Mcl-1-siRNA bzw. ungerichteter „scrambled“ Kontroll-siRNA (scr) transfiziert. Nach 72, 96 und 120 h wurden Gesamtzellextrakte von den Kulturen hergestellt und der Knockdown von Mcl-1 mittels Western Blot-Analyse überprüft. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. **B** U87-, MZ-54- und U373-Zellen wurden wie oben beschrieben transfiziert und nach 72 h subkultiviert. Nach insgesamt 96 h (U87, MZ-54) bzw. 120 h (U343, U373) wurden Gesamtzellextrakte von den Kulturen hergestellt und der Knockdown wie oben beschrieben überprüft.

5.2.3.1 Mcl-1 trägt nicht zur TRAIL-Resistenz von Gliomzellen bei

In HeLa-Zellen wurde nachgewiesen, dass Mcl-1 die Amplifikation Rezeptor-aktivierter Apoptosesignale über die Mitochondrien durch direkte Interaktion mit tBid reguliert. Des Weiteren führte die exogene Überexpression von Mcl-1 zu einer Inhibition von TRAIL-induzierter Apoptose (Clohessy et al. 2006). Um zu prüfen, ob Mcl-1 auch in Gliomzellen einen Einfluss auf die Apoptose-Aktivierung durch TRAIL nimmt, wurde Mcl-1 in den Zelllinien U87 und U343 durch RNAi auf Proteinebene herunterreguliert und die Kulturen für 36 h mit TRAIL oder einer Kombination aus TRAIL und dem Bcl-2-spezifischen Inhibitor HA14-1 behandelt (Abbildung 5.10). Dabei konnte weder in den TRAIL-sensitiven U87-Zellen, noch in den TRAIL-resistenten U343-Zellen eine Auswirkung des Mcl-1-Knockdowns auf die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber TRAIL festgestellt werden.

In Übereinstimmung mit vorausgegangen Befunden (vgl. Abschnitt 5.2.2.1) potenzierte HA14-1 zwar den durch TRAIL induzierten Zelltod in beiden Zelllinien. Eine synergistische Wirkung wurde durch die Inhibition von Bcl-2 und die Repression von Mcl-1 jedoch nicht erzielt. Es muss deshalb davon ausgegangen werden, dass Mcl-1 in humanen Gliomzelllinien im Gegensatz zu Bcl-2 und Bcl-xL keine tragende Rolle bei der Unterdrückung TRAIL-Rezeptor-vermittelter proapoptischer Signale spielt.

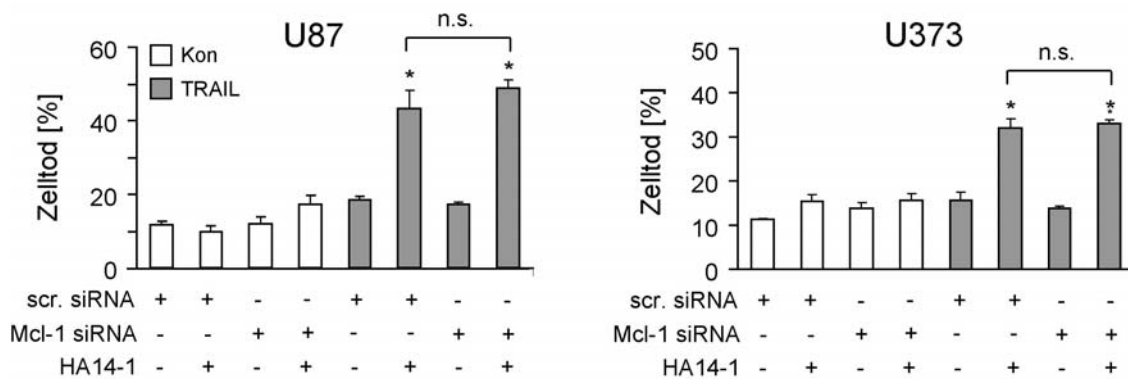


Abbildung 5.10: Mcl-1 trägt nicht zur TRAIL-Resistenz von Gliomzellen bei. U87- und U373-Zellen wurden mit 250 nM Mcl-1-siRNA-Oligonukleotiden bzw. ungerichteter „scrambled“ Kontroll-siRNA (scr) transfiziert. 96 h (U87) bzw. 120 h (U373) nach Transfektion wurden die Kulturen für 36 h mit 250 ng/mL TRAIL oder 30 μ M HA14-1 oder einer Kombination aus beidem inkubiert. Der HA14-1 Behandlung ging eine 1-stündige Vorbehandlung mit HA14-1 voraus. Der Zelltod wurde durchflusszytometrisch durch Annexin-V-Bindung bzw. PI-Aufnahme ermittelt. Die Daten entsprechen Mittelwerten \pm SEM von $n = 4$ unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in mindestens zwei unabhängigen Experimenten erzielt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontroll-siRNA transfizierten Kontrolle.

5.2.3.2 Mcl-1 nimmt keinen Einfluß auf den Anoxie-induzierten Zelltod in Gliomzellen

In murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) wird Mcl-1 unter anoxischen Bedingungen innerhalb von 24 h posttranslational nahezu vollständig degradiert (Brunelle et al. 2007). Die

Autoren schlagen ein Modell vor, in dem der Rückgang von Mcl-1 in Synergie mit der Inaktivierung von Bcl-2 oder Bcl-xL durch Inhibition der Elektronentransportkette zur Aktivierung von Apoptose beiträgt. Eine Untersuchung der Mcl-1-Regulation in den Zelllinien U343, U87 und MZ-54 ergab jedoch überraschenderweise, dass 48-stündige Anoxie in Gliomzellen nur eine geringfügige Degradation von Mcl-1 auslöst (Abbildung 5.11 A). Deshalb wurde überlegt, ob möglicherweise der ungenügende Abbau bzw. der zu hohe Protein-Level von Mcl-1 unter Anoxie zur Apoptose-Resistenz von Gliomzellen beiträgt.

Mit spezifischen doppelsträngigen siRNA-Oligonukleotiden wurde Mcl-1 in den Zelllinien U343 (Anoxie-resistent) und U373 (Anoxie-sensitiv) auf Proteinebene herunterreguliert (Abbildung 5.9) und in 48-stündigen Anoxie-Experimenten untersucht, ob die signifikant verminderte Expression von Mcl-1 mit einem erhöhten Zelltod einhergeht (Abbildung 5.11 B). In keiner der beiden Zelllinien konnte eine Zunahme des Anoxie-induzierten Zelltods durch die Repression von Mcl-1 festgestellt werden. Auch wurde durch die zusätzliche Inhibierung von Bcl-2 mit HA14-1 keine synergistische Wirkung erzielt (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Mcl-1 auch bei der Regulierung des Anoxie-iduzierten Zelltods in Gliomzellen keine tragende Rolle spielt.

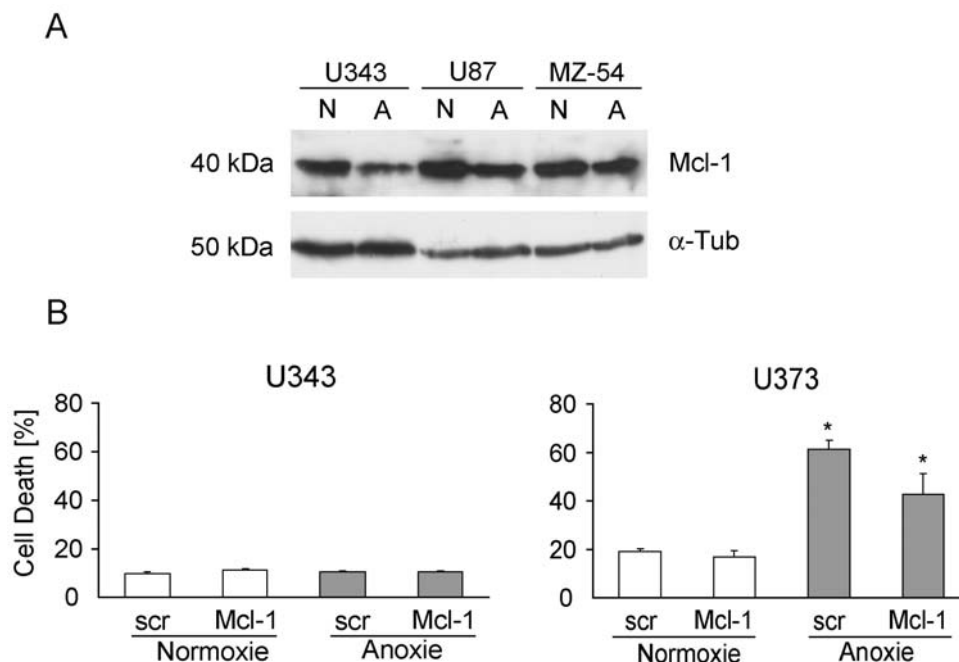


Abbildung 5.11: Mcl-1 nimmt keinen Einfluß auf den Anoxie-induzierten Zelltod. **A** U343-, U87- und MZ-54-Zellen wurden einer 48-stündigen Anoxie ausgesetzt und die Gesamtzellextrakte auf Mcl-1 hin untersucht. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. **B** U343- und U373-Zellen wurden mit 250 nM Mcl-1-siRNA-Oligonukleotiden bzw. ungerichteter „scrambled“ Kontroll-siRNA (scr) transfiziert und 120 h nach der Transfektion für 48 h bei Anoxie kultiviert. Der Anteil toter Zellen wurde durchflusszytometrisch durch die Bindung von Annexin-V und die Aufnahme von PI bestimmt. Die Daten entsprechen Mittelwerten \pm SEM von $n = 4$ unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Experimenten erzielt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontroll-siRNA-transfizierten Kontrolle.

5.2.4 Proteasomeninhibitoren reaktivieren effektiv TRAIL-induzierte Apoptose

Nachdem die Wirkung von TRAIL in Kombination mit Gamma-Bestrahlung und BH3-Mimetika einschließlich Mcl-1-RNA-Interferenz untersucht worden war, richtete sich der Fokus auf die kombinatorische Behandlung von Gliomzellen mit TRAIL und Proteasomeninhibitoren, einer neuen Klasse vielversprechender Chemotherapeutika zur Krebsbekämpfung. Unlängst wurde in den USA mit Bortezomib (PS-341/Velcade) erstmals ein Proteasomeninhibitor zur Behandlung multipler Myelome freigegeben (Adams et al. 1998; Richardson et al. 2005).

In dieser Arbeit kamen die beiden zellpermeablen Proteasomeninhibitoren MG132 und Epoxomicin (Abbildung 5.12 A) zum Einsatz: MG132 ist ein potenter und reversibler Inhibitor des 26 S Proteasoms (Rock et al. 1994), während Epoxomicin hochspezifisch und irreversibel zahlreiche Hydrolyseaktivitäten der 20 S Unterheit inhibiert (Hanada et al. 1992).

MG132 und Epoxomicin, in Konzentrationen von 2,5 μ M bzw. 50 nM eingesetzt, potenzierten den TRAIL-induzierten Zelltod in den TRAIL-sensitiven Zelllinien U87 und U251 (Abbildung 5.12 A). Darüber hinaus reaktivierten sie potent die TRAIL-induzierte Apoptose in den resistenten Zelllinien U343 und U373. Da U373- und U251-Zellen eine mutierte Form von p53 exprimieren, unterliegt die Proteasomeninhibitor-vermittelte TRAIL-Sensitivierung offenbar einem p53-unabhängigen Mechanismus. Anzumerken bleibt, dass zwei Zelllinien (U87 und U373) moderat zytotoxisch auf MG132 reagierten, während in nur einer aus vier Zelllinien (U373) eine signifikante Zellschädigung durch Epoxomicin festgestellt wurde.

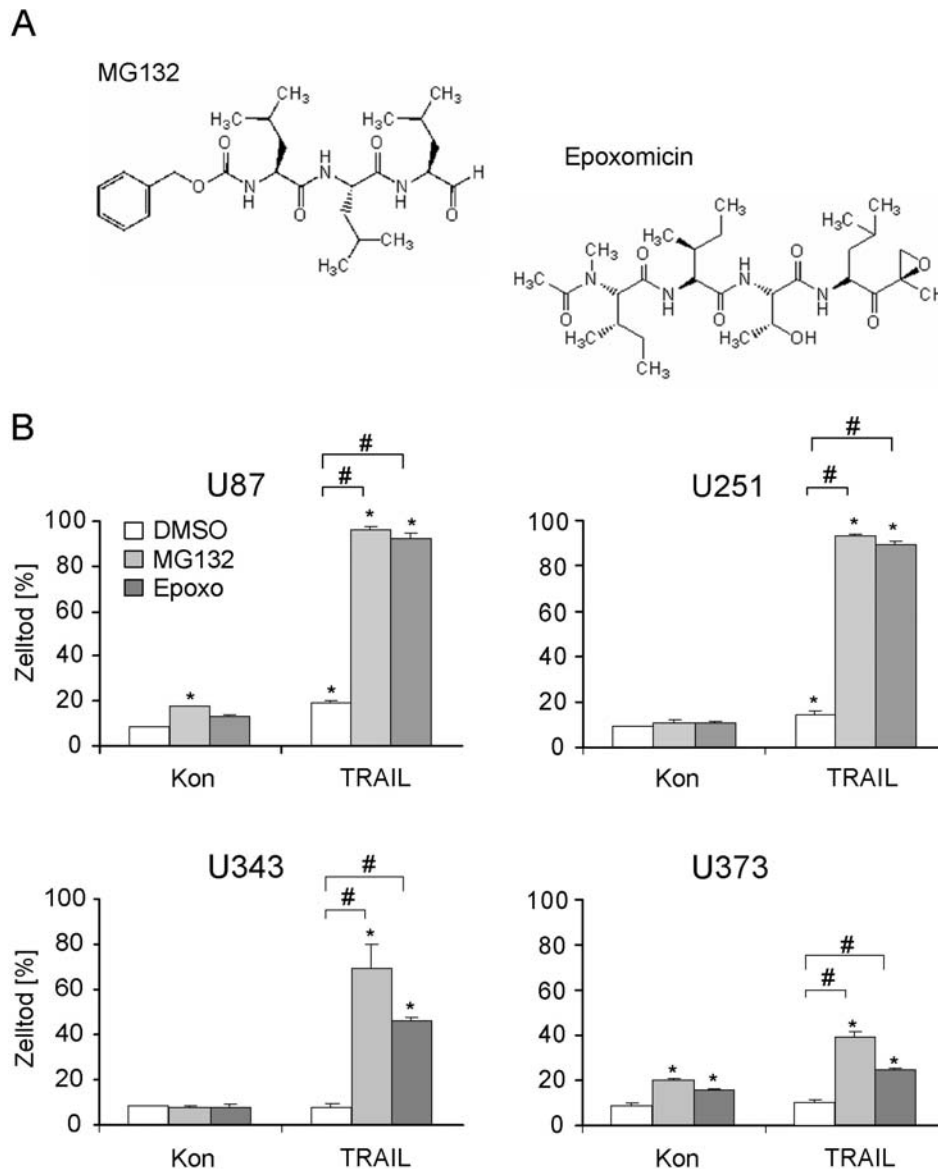


Abbildung 5.12: Proteasomeninhibitoren reaktivieren effektiv TRAIL-induzierte Apoptose. **A** Strukturformeln der Proteasomeninhibitoren MG132 und Epoxomicin. **B** TRAIL-sensitive U87- und U251-Zellen und TRAIL-resistente U343- und U373-Zellen wurden für 1 h mit MG132 oder Epoxomicin vorbehandelt und anschließend für 36 h mit einer Kombination aus TRAIL [250 ng/mL] und MG132 [2,5 μ M] oder TRAIL und Epoxomicin [50 nM] inkubiert. Zur Bestimmung des Anteils toter Zellen wurden die Kulturen mit Annexin-V-Fluos und PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Daten entsprechen Mittelwerten \pm SEM von $n = 4$ unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erzielt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. #, $p < 0,05$ im Vergleich zur angezeigten Behandlung.

5.3 Molekulare Mechanismen der TRAIL-Sensitivierung durch Proteasomeninhibitoren

Von allen untersuchten kombinatorischen Ansätzen zeigte die Variante bestehend aus TRAIL und einem Proteasomeninhibitor (MG132 oder Epoxomicin) den besten Synergieeffekt mit bis zu 70 % TRAIL-induzierter Apoptose in per se TRAIL-resistenten Zelllinien. Deshalb richtete sich

das Interesse in den folgenden Untersuchungen auf die molekularen Mechanismen, die der Proteasomeninhibitor-vermittelten TRAIL-Sensitivierung in Gliomzellen zu Grunde liegen.

5.3.1 Oligo GEArray-Analyse Proteasomeninhibitor-induzierter Genexpression

Mit dem Ziel, Apoptose-relevante Gene zu identifizieren, die an der TRAIL-Sensitivierung von Gliomzellen durch Proteasomeninhibitoren beteiligt sind, wurden TRAIL-sensitive U87- und TRAIL-resistente U373-Zellen für 36 h mit 50 nM Epoxomicin bzw. dem äquivalenten Volumen an DMSO behandelt. Die im Anschluß isolierte Gesamt-RNA wurde mittels Oligo GEArray Microarray-Analyse auf das Expressionsniveau von 96 Apoptose- bzw. Zelltod-spezifischen Genen hin untersucht.

Die Auswertung mit Hilfe der Software „GEArray Expression Analysis Suite“ ergab, dass ein Teil der Rohdaten, trotz erfolgter Hybridisierung der korrespondierenden Oligonukleotid-Tetraspots auf dem Array, als „nicht vorhanden“ ausgeschlossen worden war. Umgekehrt waren einige nicht-hybridisierte Oligonukleotid-Tetraspots falsch-positiv identifiziert worden. Die Software-generierte Auswertung wurde deshalb manuell durch einen Abgleich mit den tatsächlich detektierten Signalen auf den Röntgenfilmen korrigiert. Die Tabellen A.1 und A.2 im Anhang dieser Arbeit zeigen die normalisierten Rohdaten einschließlich Markierung der ursprünglich als falsch-negativ bzw. falsch-positiv gewerteten Gene.

Epoxomicin aktivierte in beiden Zelllinien die pro-apoptotischen Gene TNFRSF10B/DR5, RIPK2, TP53BP2, BID, CASP4 und CASP7, die für den TRAIL-Todesrezeptor DR5, die Rezeptor-interagierende Serin-Threonin Kinase RICK/RIP2, das p53-bindende Protein 53BP2, den Zelltodregulator Bid und Caspase-4 und -7 kodieren (Tabelle 5.3). Zudem wurden die Gene für die Tyrosinkinase ABL, das Hsc70-bindende Protein BAG3 und das stressinduzierte Protein GADD45A hochreguliert. Herunterreguliert wurden in beiden Zelllinien BCL2L12 und BIRC5, Mitglieder der Bcl-2- bzw. Inhibitor of Apoptosis (IAP)- Genfamilie, die für die anti-apoptotischen Proteine Bcl2L12 und Survivin kodieren, sowie TNFSF7 und TRAF4, die den CD27-Ligand bzw. das TNF-Rezeptor-assoziierte Protein TRAF4 verschlüsseln.

Weitere interessante pro-apoptotische Gene, die in U87-Zellen aktiviert wurden, waren BAK, BNIP3L/NIX, BCLAF1, CASP2, CASP9 sowie TRADD und FADD, die für Todesrezeptor-Adapterproteine mit Todesdomäne kodieren. Hochreguliert wurden außerdem MCL-1, BIRC2/cIAP1 und BCL2L13. Dagegen wurde BCL2L1/BCL-XL und AKT1 in U87-Zellen durch Epoxomicin transkriptionell nicht reguliert.

In U373-Zellen, die durch Proteasomeninhibitoren mäßiger für TRAIL sensitiviert werden als U87-Zellen (vgl. Abschnitt 5.2.4), wurden durch Epoxomicin insgesamt weniger Gene und auch weniger pro-apoptotische Gene (TNFRSF10B/DR5, BID, CASP4, CASP7, TP53BP2) als in U87 aktiviert. Zusätzlich angehoben wurde das Expressionsniveau von BAG1, das für ein Protein kodiert, dessen direkte Interaktion mit Bcl-2 die anti-apoptotische Wirkung von Bcl-2 steigert. BIRC2/cIAP1 und BCLAF1 wurden durch Epoxomicin nicht reguliert, während BCL2L1/BCL-

XL, MCL-1, BCL2L13 und AKT1 herunterreguliert wurden. Zudem wurden überraschenderweise zahlreiche pro-apoptotische Gene wie BNIP3, BNIP3L/NIX, CASP2, CASP9, FADD und TRADD, herunterreguliert.

Tabelle 5.3: Oligo GEArray-Analyse Proteasomeninhibitor-induzierter Genexpression. U87- und U373-Zellen wurden für 36 h mit 50 nM Epoxomicin bzw. einem äquivalenten Volumen DMSO behandelt. Nach Präparation der Gesamt-RNA wurde nach Angaben des Herstellers UTP-markierte cRNA synthetisiert und mit den synthetischen Oligonukleotid-Tetraspots auf dem Oligo GEArray Microarray OHS-12 hybridisiert. Die auf einem Röntgenfilm detektierten Signale wurden eingescannt, mit der Software „GEArray Expression Analysis Suite“ ausgewertet und gegebenenfalls manuell korrigiert (siehe Text). In der Auswertung wurden nur solche Gene berücksichtigt, deren Expression nach Behandlung mit Epoxomicin nachweisbar war. Als hochreguliert (+) eingestuft wurde ein Gen, wenn der Quotient aus dem Expressionsniveau nach Epoxomicin-Behandlung und dem Expressionsniveau nach Kontrollbehandlung größer als 1,1 war. Als herunterreguliert (-) wurde ein Gen eingestuft, wenn dieser Quotient kleiner als 0,9 war und als nicht-reguliert (=), wenn der Quotient zwischen 0,9 und 1,1 lag (vgl. Tabelle A1 und A2). Die gezeigten Daten sind Ergebnisse eines repräsentativen Experiments. Ähnliche Ergebnisse wurden in zwei weiteren unabhängigen Experimenten erzielt.

U87			U373		
RefSeq Nr.	Gen-Name	+/-	RefSeq Nr.	Gen-Name	+/-
NM_005157	ABL1	+	NM_005157	ABL1	+
NM_004281	BAG3	+	NM_004323	BAG1	+
NM_001188	BAK1	+	NM_004281	BAG3	+
NM_015367	BCL2L13	+	NM_001196	BID	+
NM_014739	BCLAF1	+	NM_001225	CASP4	+
NM_001196	BID	+	NM_001227	CASP7	+
NM_004330	BNIP3	+	NM_004401	DFFA	+
NM_004331	BNIP3L/NIX	+	NM_001924	GADD45A	+
NM_001166	BIRC2/cIAP1	+	NM_003821	RIPK2	+
NM_032982	CASP2	+	NM_005426	TP53BP2	+
NM_001225	CASP4	+	NM_003842	TNFRSF10B/DR5	+
NM_001227	CASP7	+			
NM_001229	CASP9	+	NM_014739	BCLAF1	=
NM_003824	FADD	+	NM_001166	BIRC2/cIAP1	=
NM_001924	GADD45A	+	NM_005658	TRAF1	=
NM_021960	MCL-1	+			
NM_003946	NOL3	+	NM_005163	AKT1	-
NM_003821	RIPK2	+	NM_001188	BAK1	-
NM_003842	TNFRSF10B/DR5	+	NM_052842	BCL2L12	-
NM_003790	TNFRSF25/APO3	+	NM_015367	BCL2L13	-
NM_005426	TP53BP2	+	NM_138578	BCL2L1/BCL-XL	-
NM_003789	TRADD	+	NM_001168	BIRC5	-
			NM_004330	BNIP2	-
NM_005163	AKT1	=	NM_004052	BNIP3	-
NM_138578	BCL2L1/BCL-XL	=	NM_004331	BNIP3L/NIX	-
NM_004052	BNIP3	=	NM_032982	CASP2	-
NM_001065	TNFRSF1A	=	NM_001229	CASP9	-
NM_016639	TNFRSF12A/TWEAKR	=	NM_003805	CRADD	-
			NM_014326	DAPK2	-
NM_052842	BCL2L12	-	NM_003824	FADD	-
NM_014550	CARD10	-	NM_002342	LTBR	-
NM_001168	BIRC5	-	NM_021960	MCL-1	-
NM_001252	TNFSF7	-	NM_003946	NOL3	-
NM_001066	TNFRSF1B	-	NM_001252	TNFSF7	-
NM_004295	TRAF4	-	NM_001065	TNFRSF1A	-
			NM_016639	TNFRSF12A/TWEAKR	-
			NM_000546	TP53	-
			NM_003789	TRADD	-
			NM_004295	TRAF4	-

5.3.2 Proteasomeninhibitoren induzieren potent die Expression von DR5

Durch die Oligo GEArray-Expressionsanalyse konnte keine Korrelation zwischen der transkriptionellen Regulation anti-apoptotischer Gene aus der Bcl-2- und IAP-Familie und der Anfälligkeit von U87- bzw. U373-Zellen für TRAIL nach Epoxomicin-Behandlung festgestellt werden. In der Summe wurden aber in U87-Zellen deutlich mehr pro-apoptotische Gene als in U373-Zellen aktiviert. Auffällig war in diesem Zusammenhang auch, dass die Death Inducing Signalling Complex (DISC)-Adapterproteine FADD und TRADD in U87-, jedoch nicht in U373-Zellen hochreguliert wurden. Der TRAIL-Todesrezeptor DR5 wurde in beiden Zelllinien transkriptionell aktiviert, über die Regulierung von DR4 konnten jedoch keine Informationen gewonnen werden. Aus diesem Grund richtete sich die Aufmerksamkeit in den folgenden Experimenten auf die Proteasomeninhibitor-induzierte Regulierung der Todesrezeptoren DR4 und DR5, als zentrale Komponenten des DISC. Zusätzlich wurden die beiden stress-aktivierten pro-apoptotischen Transkriptionsfaktoren C/EBP homologes Protein (CHOP) und c-Jun (beide nicht auf dem Oligo GEArray Micorarray vertreten) untersucht.

Zu diesem Zweck wurden U87-, U343- und U373-Zellen mit MG132 und Epoxomicin behandelt und die präparierte Gesamt-RNA mittels semi-quantitativer RT-PCR auf die Expression der jeweiligen Gene hin untersucht. Als Kontrolle für p53-abhängige Genaktivierung diente RNA von Zellen, die einer Einzeldosis Gammastrahlung [20 Gy] ausgesetzt worden waren (Abbildung 5.13 A). Während DR5 durch beide Proteasomeninhibitoren und Gamma-Bestrahlung potent transkriptionell aktiviert wurde, ließ sich in keiner der drei Zelllinien eine Aktivierung von DR4 nachweisen. Auch die beiden Transkriptionsfaktoren CHOP und c-Jun wurden durch Proteasomeninhibition transkriptionell aktiviert, sowie CHOP in zwei von drei Zelllinien (U343 und U373) durch Gamma-Bestrahlung. Western Blot-Analysen bestätigten, dass das Expressionsniveau von DR4 auch auf Proteinebene weder durch Proteasomeninhibitoren noch durch Gamma-Bestrahlung beeinflusst wird (Abbildung 5.13 B).

Dahingegen wurden in allen Zelllinien nach Proteasomeninhibition deutlich erhöhte DR5- und CHOP-Proteinlevel festgestellt. Besonders in U343 wurden prägnant erhöhte DR5- und CHOP-Proteinmengen nach MG132- und Epoxomicin-Behandlung detektiert. Nach Gamma-Bestrahlung indessen wurden in den drei Zelllinien nur moderat erhöhte Mengen an DR5-Protein nachgewiesen und ausschließlich U87-Zellen zeigten leicht erhöhte CHOP-Proteinlevel.

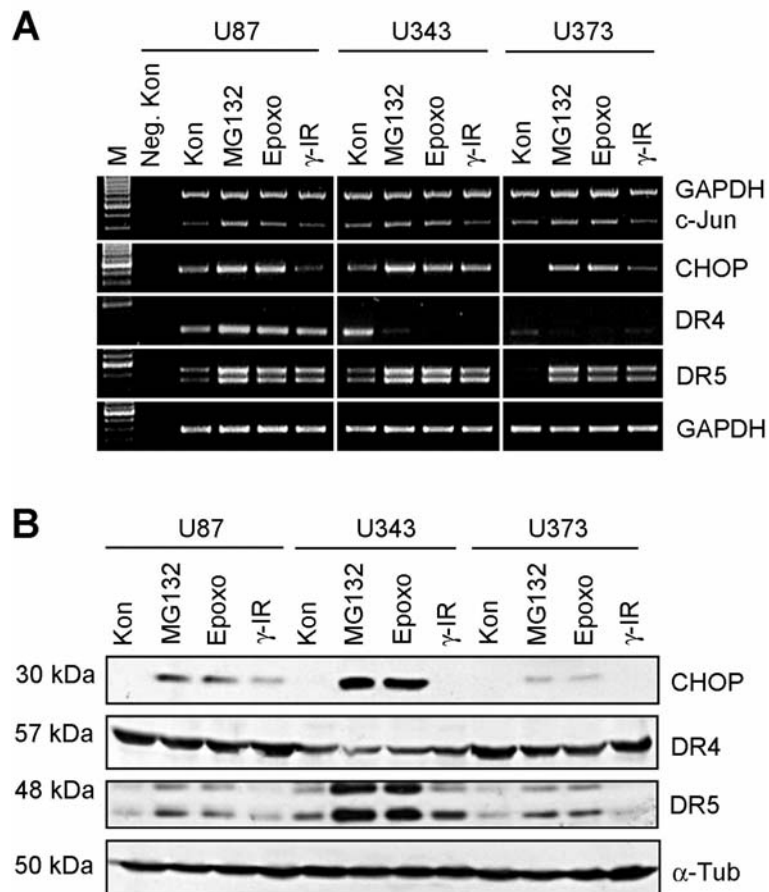


Abbildung 5.13: Proteasomeninhibitoren induzieren potent die Expression von DR5. U87-, U343- und U373-Zellen wurden für 16 h mit MG132 [2,5 µM] oder Epoxomicin [50 nM] behandelt oder einer Einzeldosis Gamma-Bestrahlung [20 Gy] ausgesetzt und für 24 h unter normalen Bedingungen weiterkultiviert. **A** Die Gesamt-RNA der Zellen wurde isoliert und mittels semi-quantitativer RT-PCR auf die transkriptionelle Aktivierung von c-Jun/GAPDH (30/30 Zyklen), CHOP (28 Zyklen), DR4 (28 Zyklen) und DR5 (25 Zyklen) hin analysiert. GAPDH (25 Zyklen) diente als Kontrolle. **B** Gesamtzellextrakte der Proteasomeninhibitor-behandelten oder bestrahlten Kulturen wurden mittels Western Blot-Analyse auf CHOP, DR4 und DR5 hin untersucht. α-Tubulin diente als Ladekontrolle. Ähnliche Ergebnisse wurden in mindestens zwei unabhängigen Experimenten erzielt.

5.3.3 Effekte der Proteasomeninhibition auf die Level anti-apoptotischer Schlüsselfaktoren

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt (vgl. Abschnitt 5.2.2.1) und in früheren Studien berichtet wurde, können anti-apoptotische Proteine aus den Bcl-2- und IAP-Genfamilien Einfluss auf die Sensitivität von Zellen gegenüber TRAIL nehmen (Fulda et al. 2002a; Fulda et al. 2002b).

Da die durchgeführten Oligo GEArray-Expressionsanalysen nur ein unvollständiges Bild über die transkriptionelle Regulierung dieser und weiterer in diesem Zusammenhang wichtiger anti-apoptotischen Kandidaten geben konnte (Bcl-2 und das X-linkend Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) wurden in keinem der Microarray-Experiment detektiert, ebensowenig das FLICE-inhibierende Protein FLIP), wurde die Expression einer Auswahl anti-apoptotischer Schlüsselpoteine in Western Blot-Analysen untersucht. Dazu wurden die Zelllinien U87 und U343

mit TRAIL, einer Kombination aus TRAIL und MG132 oder MG132 in vierfach erhöhter Konzentration behandelt und auf die Proteinlevel von XIAP, FLIP S, Mcl-1, Bcl-2 und Bcl-xL hin untersucht (Abbildung 5.14). Interessanterweise wurde der Proteinlevel von XIAP, einem selektiven Inhibitor der Caspasen-3, -7 und -9 (Schimmer et al. 2006), weder durch TRAIL alleine, noch durch MG132 beeinflusst. Die Kombination von TRAIL und MG132 jedoch führte zu einer ausgeprägten Degradierung des Proteins. Ebenso überraschend war die massive dosisabhängige Anhäufung von FLIP S, einer Caspase-8 blockierenden FLIP-Splicevariante (Krueger et al. 2001), nach MG132-Behandlung der Zellen. Die Proteinmengen von Bcl-2 und Mcl-1 blieben unabhängig von der Behandlung der Zellen in beiden Zelllinien konstant, mit Ausnahme von U343-Zellen, in denen der Mcl-1-Proteinlevel dosisabhängig durch MG132 erhöht wurde. Die Bcl-xL-Proteinmengen hingegen wurden durch Behandlung der Zellen mit TRAIL in U87 leicht, in U343-Zellen dagegen ausgeprägter, reduziert.

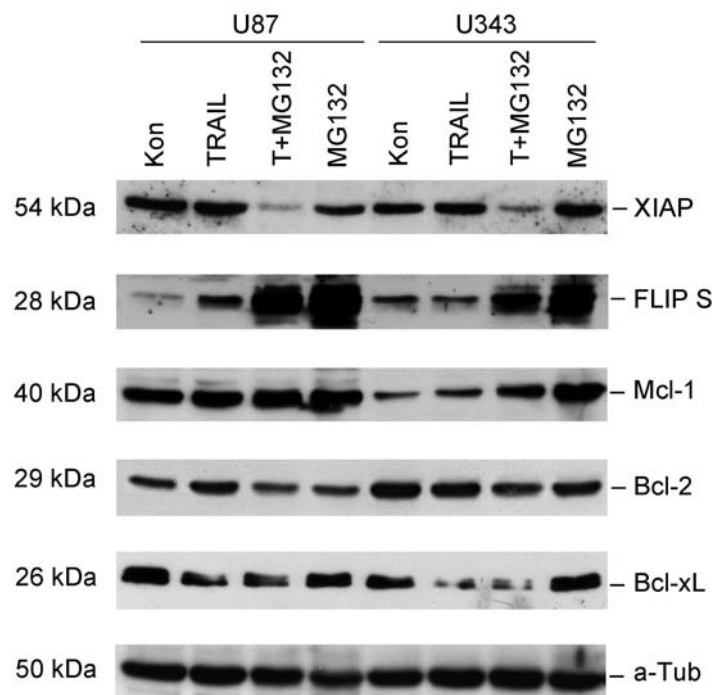


Abbildung 5.14: Untersuchung anti-apoptotischer Schlüsselproteine nach Proteasomeninhibition. U87- und U343-Zellen wurden für 16 h mit TRAIL [250 ng/mL], einer Kombination aus TRAIL und MG132 [2,5 μ M] oder MG132 [10 μ M] behandelt. Die Gesamtzellextrakte wurden mittels Western Blot auf die Proteinlevel von XIAP, FLIP S, Mcl-1, Bcl-2 und Bcl-xL hin untersucht. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. Ähnliche Ergebnisse wurden in mindestens zwei unabhängigen Experimenten erzielt.

5.3.4 Die Proteasomeninhibitor-induzierte Aktivierung von DR5 trägt zur Sensitivierung von Gliomzellen für TRAIL bei

Die potente transkriptionelle Aktivierung und der deutlich erhöhte DR5-Proteinlevel nach Proteasomeninhibition (Abschnitt 5.3.2) warfen die Frage auf, ob DR5 an der prägnanten

Sensitivierung von Gliomzellen für TRAIL durch Proteasomeninhibition beteiligt ist. Deshalb wurde DR5 mit doppelsträngigen siRNA-Oligonukleotiden transient reprimiert, und der Effekt auf TRAIL-induzierte Apoptose nach Applikation von MG132 studiert.

Zunächst wurden DR5- und „scrambled“-siRNA-transfizierte U343-Zellen mit MG132 behandelt und mittels Western Blot-Analyse auf DR5-Proteinlevel hin untersucht (Abbildung 5.15 A). Durch die Transfektion mit DR5-siRNA wurde nach Proteasomeninhibition, im Vergleich zur Kontrolltransfektion, eine ca. 2,5-fache Reduktion der DR5-Proteinmenge erzielt. Das Expressionsniveau von DR4 indessen wurde durch die Transfektion mit den siRNA-Oligonukleotiden nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis wurde in U251-Zellen bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Um zu ermitteln, ob die in den Gesamtzellextrakten detektierten DR5-Proteinmengen auch tatsächlich die Zelloberflächenexpression des Rezeptors wiedergeben, wurden durchflusszytometrische Analysen mit U343-Zellen durchgeführt (Abbildung 5.15 B). Diese bestätigten eine erhöhte Expression von DR5 auf der Zelloberfläche nach Applikation von MG132. In Übereinstimmung mit den Befunden der Western Blot-Analyse wurde ferner festgestellt, dass die Oberflächenexpression von DR5 durch die Transfektion mit DR5-siRNA-Oligonukleotiden zwar nicht vollständig unterdrückt, aber annähernd auf das basale Expressionsniveau von „scrambled“-siRNA-transfizierten Kontrollzellen reduziert wurde. Auch dieser Befund wurde in U251-Zellen bestätigt (Daten nicht gezeigt).

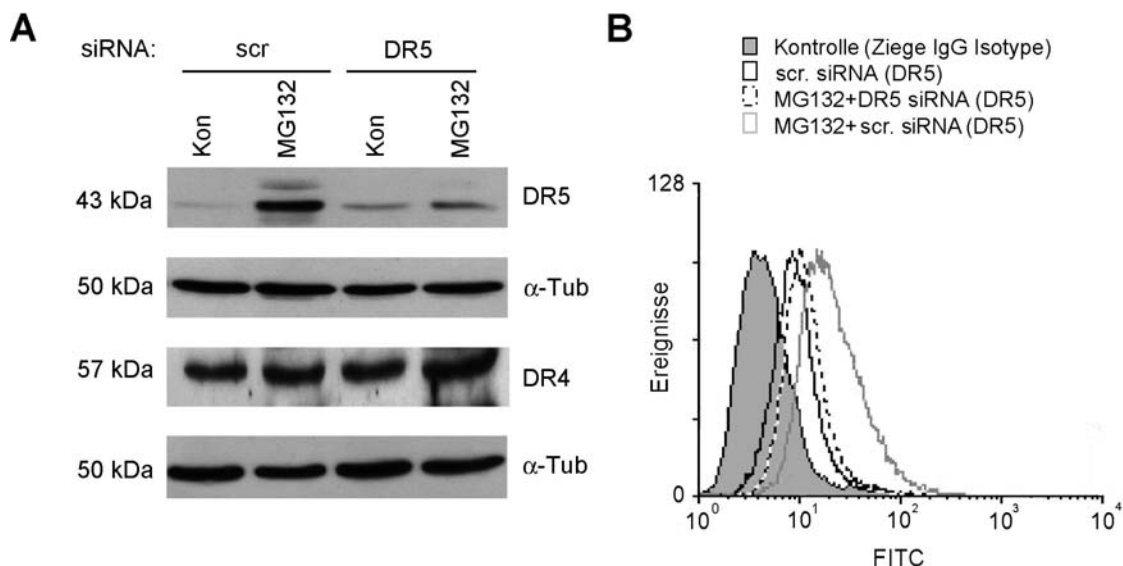


Abbildung 5.15: Die Transfektion mit DR5-siRNA-Oligonukleotiden führt zu einer Inhibition der DR5-Oberflächenexpression. **A** U343-Zellen wurden mit 100 nm DR5-siRNA-Oligonukleotiden bzw. „scrambled“ Kontroll-siRNA (scr) transfiziert und 24 h nach Transfektion für 16 h mit MG132 [2,5 μ M] behandelt. Im Anschluß wurden die Gesamtzellextrakte der Kulturen mittels Western Blot auf das Expressionsniveau von DR5 und DR4 hin analysiert. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. **B** U343-Zellen wurden wie oben beschrieben transfiziert und im Anschluss durchflusszytometrisch auf die Zelloberflächen-Expression von DR5 hin untersucht. Ein Ziegen IgG-Isotyp-Antikörper diente als Kontrolle für unspezifische Antikörperbindungen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erzielt.

Der Effekt der RNAi-vermittelten Inhibition von DR5 auf Proteasomeninhibitor-induzierte TRAIL-Sensitivierung wurde in den Zelllinien U343 und U251 durch Caspase-Aktivitätsmessungen untersucht (Abbildung 5.16). Dabei wurde sowohl in den TRAIL-sensitiven U251-Zellen als auch in den TRAIL-resistenten U343-Zellen nach der Repression von DR5 auf das annähernd basale Expressionsniveau eine signifikante Abschwächung der TRAIL- und MG132-induzierten Caspase-Aktivität festgestellt. Diese Befunde legen nahe, dass die erhöhte Oberflächenexpression von DR5 eine tragende Rolle bei der Sensitivierung von Gliomzellen für TRAIL-induzierte Apoptose durch Proteasomeninhibitoren spielt.

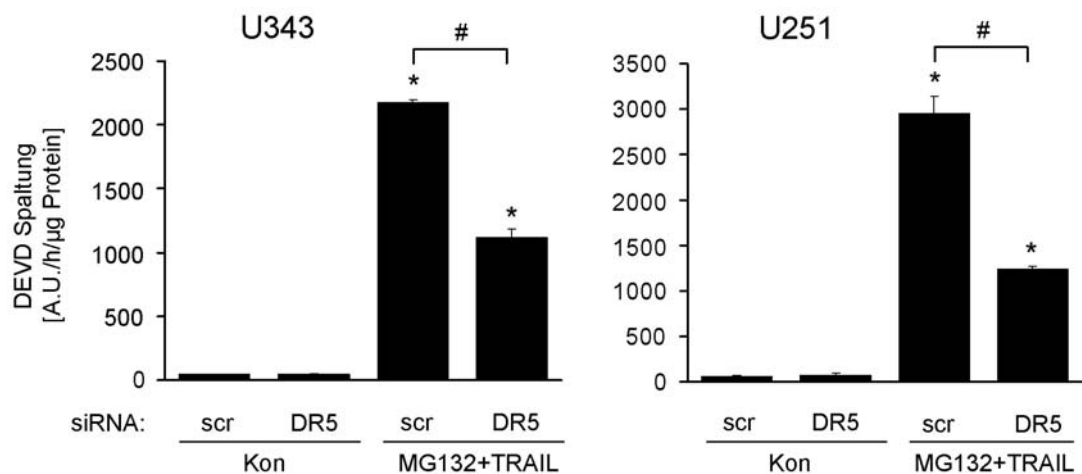


Abbildung 5.16: Die Proteasomeninhibitor-induzierte Hochregulierung von DR5 trägt zur Sensitivierung von Gliomzellen für TRAIL bei. U343- und U251-Zellen wurden mit 100 nM DR5-siRNA-Oligonukleotiden bzw. „scrambled“ Kontroll-siRNA (scr) transfiziert und nach 24 h für 16 h mit MG132 [2,5 µM] inkubiert. Die Gesamtzellextrakte der Kulturen wurden anschließend durch Spaltung des fluorogenen Substrats Ac-DEVD-AMC [10 µM] auf Caspase-3-ähnliche Aktivität hin untersucht. Die Daten entsprechen Mittelwerten ± SEM von n = 4 unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erzielt. *, p < 0,05 im Vergleich zur „scrambled“-siRNA transfizierten Kontrolle. #, p < 0,05 im Vergleich zu angezeigter Behandlung.

5.3.5 CHOP ist nicht an der Aktivierung von DR5 und der Sensitivierung für TRAIL nach Proteasomeninhibition beteiligt

Wie kürzlich gezeigt werden konnte, ist CHOP, ein ER-Stress-induzierter Transkriptionsfaktor aus der CCAAT/Enhancer Binding Protein-Familie, in HeLa-Zellen und DU145-Prostatakrebszellen an der transkriptionellen Aktivierung von DR5 beteiligt (Yamaguchi and Wang 2004; Yoshida et al. 2005). Um herauszufinden, ob CHOP in Gliomzellen nach Proteasomeninhibition eine ähnliche Rolle zufällt, wurde CHOP auf Proteinebene transient mittels RNA-Interferenz herunterreguliert, und das Expressionsniveau von DR5 nach Proteasomeninhibition mittels Western Blot analysiert (Abbildung 5.17 A). Durch die Transfektion mit spezifischen siRNA-Oligonukleotiden wurde die CHOP-Proteinmenge in U343-Zellen nach Applikation von MG132 im Vergleich zur Transfektion mit „scrambled“-siRNA effektiv auf 1/5

reduziert. Das Expressionsniveau von DR5 hingegen wurde durch die unterdrückte CHOP-Aktivierung nicht beeinflusst. Auch die Aktivierung von Caspasen durch die kombinierte Behandlung mit TRAIL und MG132 wurde durch die RNAi-induzierte CHOP-Inhibition nicht beeinträchtigt (Abbildung 5.17 B). Es muss deshalb angenommen werden, dass CHOP in Gliomzellen nicht an der Regulierung von DR5 und der Sensitivierung gegenüber TRAIL nach Proteasomeninhibition beteiligt ist.

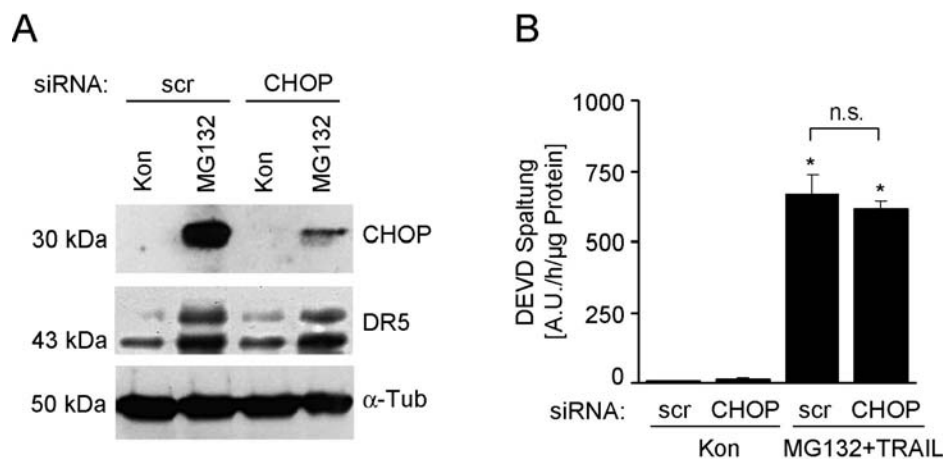


Abbildung 5.17: CHOP ist nicht an der Aktivierung von DR5 und der Sensitivierung für TRAIL nach Proteasomeninhibition beteiligt. **A** U433-Zellen wurden mit 100 nM CHOP-siRNA-Oligonukleotiden bzw. ungerichteter „scrambled“ Kontroll-siRNA (scr) transfiziert und 4 h nach der Transfektion mit MG132 [2,5 µM] inkubiert. Im Anschluss daran wurden Gesamtzellextrakte der Kulturen hergestellt und mittels Western Blot-Analyse auf das Expressionsniveau von CHOP und DR5 hin untersucht. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. **B** U433-Zellen wurden wie oben beschrieben transfiziert und 4 h nach der Transfektion für 16 h mit einer Kombination aus TRAIL [250 ng/mL] und MG132 [2,5 µM] inkubiert. Im Anschluß daran wurden die Gesamtzellextrakte der Kulturen auf Caspase-3-ähnlicheAktivität hin untersucht. Die Daten entsprechen Mittelwerten \pm SEM von $n = 4$ unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erzielt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

5.3.6 Untersuchungen zur möglichen Rolle von NF- κ B bei der Aktivierung von DR5 nach Proteasomeninhibition

Nachdem die Beteiligung von CHOP an der transkriptionellen Aktivierung von DR5 nach Hemmung der Proteasomen ausgeschlossen werden konnte, richtete sich die Aufmerksamkeit auf die Untersuchung der Rolle von Nuclear Factor-kappaB (NF- κ B), einem Stress-aktivierten Transkriptionsfaktor und Regulator von Genen, die hauptsächlich Inflammation, Zellproliferation und Zellüberleben kontrollieren. Die Proteine der NF- κ B Familie, darunter NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB und c-Rel haben die sogenannte Rel-Homologie-Domäne gemeinsam. Die Rel-Proteine RelA, RelB und c-Rel verfügen zusätzlich über noch mindestens eine Transaktivierungsdomäne (Karin and Ben-Neriah 2000).

Die NF- κ B -Proteine liegen funktionsbereit im Zytoplasma vor. Angeregt durch einen Stress-Stimulus bilden sie Dimere (das klassische Beispiel für ein aktivierendes NF- κ B -Heterodimer ist

die Kombination p50/RelA) und translozieren in den Nukleus. Voraussetzung für diesen Ablauf ist in den meisten Fällen jedoch der Proteasomen-abhängige Abbau der Inhibitor of KappaB (IκB)-Proteine, die in unstimulierten Zellen NF-κB-Dimere binden und inaktivieren. Das am besten studierte IκB-Protein ist IκBα. Angeregt durch ein Stress-induziertes Signal phosphoryliert die IκB Kinase (IKK) zwei Serin-Reste der regulatorischen IκB-Domäne und leitet damit die Ubiquitinylierung von IκBα durch das Proteasom ein (Luo et al. 2005).

Es ist hinlänglich bekannt, dass Proteasomeninhibitoren wie MG132 zu einer Stabilisierung von IκBα und damit zu einer Inhibierung der NF-κB-Aktivität beitragen (Matsui et al. 1997; Palombella et al. 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese Inhibierung von NF-κB an der Proteasomeninhibitor-induzierten Aktivierung von DR5 beteiligt sein könnte. Ein denkbarer Mechanismus wäre, dass NF-κB selbst die Expression von DR5 reprimiert oder konstitutiv einen DR5 antagonisierenden Repressor aktiviert. Die abgesenkte NF-κB-Aktivität würde unter diesen Umständen indirekt zu einer Aktivierung von DR5 nach Proteasomeninhibition beitragen. Durch die transiente RNAi-vermittelte Repression von IκBα sollte der Effekt der trotz Proteasomeninhibition unverminderten NF-κB-Aktivität auf die Aktivierung von DR5 untersucht werden. Durch die Transfektion mit spezifischen doppelsträngigen siRNA-Oligonukleotiden wurde die IκBα Proteinmenge in U343 prägnant reduziert (Abbildung 5.18 A). Weiterhin zeigte eine Caspase-Aktivitätsmessung, dass der transiente Knockdown von IκBα zu einer signifikanten Protektion von Gliomzellen gegenüber TRAIL- und MG132-induzierter Apoptose beiträgt (Abbildung 5.18 B).

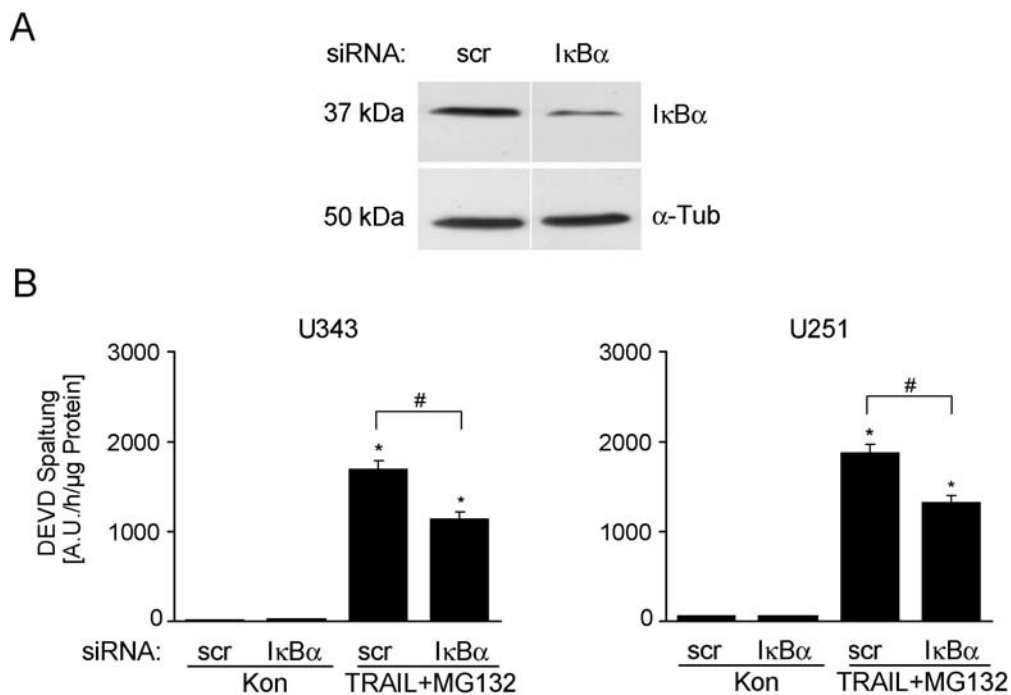


Abbildung 5.18: Die Inhibition von IκBα schützt Gliomzellen vor der durch TRAIL- und MG132-induzierten Apoptose. **A** U343-Zellen wurden mit 100 nM IκBα-siRNA-Oligonukleotiden bzw. ungerichteter „scrambled“ Kontroll-siRNA (scr) transfiziert und 48 h nach der Transfektion mittels Western Blot-Analyse auf das Expressionsniveau von IκBα hin untersucht. α-Tubulin diente als Ladekontrolle. **B** U343- und U251-Zellen wurden wie oben beschrieben transfiziert. Nach 48 h wurden die Kulturen mit einer Kombination aus TRAIL [250 ng/mL] und MG132 [2,5 μM] für 16 h behandelt und Gesamtzellextrakte der Kulturen im Anschluss auf Caspase-3-ähnliche Aktivität hin untersucht. Die Daten entsprechen Mittelwerten ± SEM von n = 4 unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erzielt. *, p < 0,05 im Vergleich zur „scrambled“-siRNA transfizierten Kontrolle. #, p < 0,05 im Vergleich zur angezeigten Behandlung.

Diese Daten lassen den Schluß zu, dass die Repression des IκBα-Proteinlevels zu einem Anstieg der NF-κB-Aktivität und damit einer Aktivierung von Genen führt, die das Zellüberleben fördern. In der Tat wurden zwei Tage nach Transfektion der IκBα-siRNA-Oligonukleotide erhöhte Proteinmengen von Bcl-2 in U343-Zellen gefunden (vgl. Abbildung 5.20). Die Expression von Bcl-xL und XIAP hingegen blieb unbeeinflusst.

Um den Effekt von MG132 und TRAIL auf die Stabilisierung von IκBα eingehender zu untersuchen, wurden Zeitverlaufs-Experimente in U343-Zellen durchgeführt (Abbildung 5.19). Überraschenderweise zeigte sich bei diesen Untersuchungen, dass IκBα nur in den ersten 60 min nach Behandlung mit MG132 stabilisiert und das Protein wie erwartet akkumuliert wird. Schon nach 120 min war die IκBα-Proteinmenge mit dem basalen Expressionsniveau vergleichbar und nahm dann kontinuierlich ab. Nach 16 h war IκBα in U343-Zellen nahezu vollständig abgebaut. Ähnliche Ergebnisse wurden in U251-Zellen erzielt (Daten nicht gezeigt). In TRAIL-behandelten Zellen wurde ein kurzfristiger Abbau von IκBα in den ersten 60 min verzeichnet. Jedoch war der IκBα-Proteinlevel bereits nach 2 h wieder angestiegen und blieb dann bis zu 16 h nach

Behandlungsbeginn auf einem vergleichbaren Niveau. Die kombinierte Behandlung mit TRAIL und MG132 führte zu einer kontinuierlichen Abnahme der I κ B α -Proteinmenge in U343-Zellen beginnend 8 h nach Behandlungsbeginn.

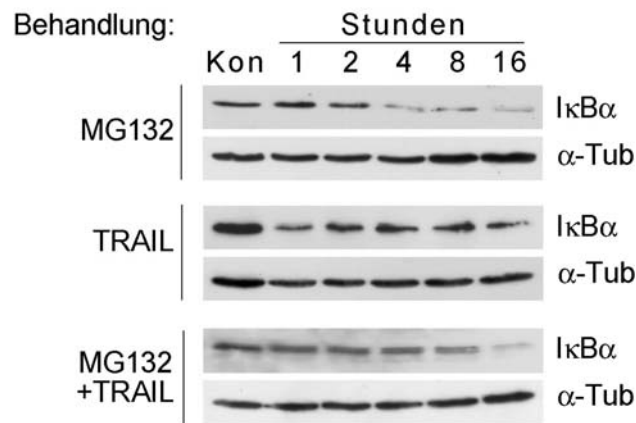


Abbildung 5.19: Kinetik der Degradation von I κ B α nach Applikation von MG132. U343-Zellen wurden mit 100 nM I κ B α -siRNA-Oligonukleotiden bzw. „scrambled“ Kontroll-siRNA (scr) transfiziert. Nach 48 h wurden die Kulturen für die angegebenen Zeiten mit MG132 [2,5 μ M], TRAIL [250 ng/mL] oder einer Kombination aus beidem inkubiert. Die Gesamtzellextrakte der Kulturen wurden anschließend mittels Western Blot auf die Proteinmengen von I κ B α hin analysiert. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erzielt.

Die äußerst kurze MG132-induzierte Stabilisierung bzw. rasche Degradierung von I κ B α steht in direktem Widerspruch zu einer Vielzahl publizierter Daten hinsichtlich der Inhibierung von NF- κ B durch I κ B α -Stabilisierung nach Proteasomeninhibition (siehe oben).

Deshalb wurde der indirekte Einfluß der I κ B α -Inhibition auf DR5 lediglich nach 1 h, also zum einzigen Zeitpunkt einer MG132-induzierten I κ B α -Stabilisierung, untersucht (Abbildung 5.20). Innerhalb dieses kurzen Zeitraums ließ sich jedoch auch in den „scrambled“-siRNA-transfizierten Kontrollzellen keine Aktivierung von DR5 durch MG132 nachweisen. Es muss aber angemerkt werden, dass der mutmaßliche Anstieg der NF- κ B Aktivität während der 48-stündigen Repression von I κ B α durch RNA-Interferenz zwar zu einer Aktivierung von Bcl-2, jedoch zu keiner Regulierung des basalen DR5-Expressionsniveaus beitrug. Aus diesen Gründen wurde der Ansatz, die Beteiligung von NF- κ B an der Proteasomeninhibitor-induzierten DR5-Aktivierung mittels Repression von I κ B α zu untersuchen, verworfen. Es bleibt aber die theoretische Möglichkeit, dass zukünftigen Studien mit alternativen Proteasomeninhibitoren wie Epoxomicin, Lactacystin oder PS-341 die Rolle von NF- κ B bei der Proteasomeninhibitor-induzierten Aktivierung von DR5 näher beleuchtet werden.

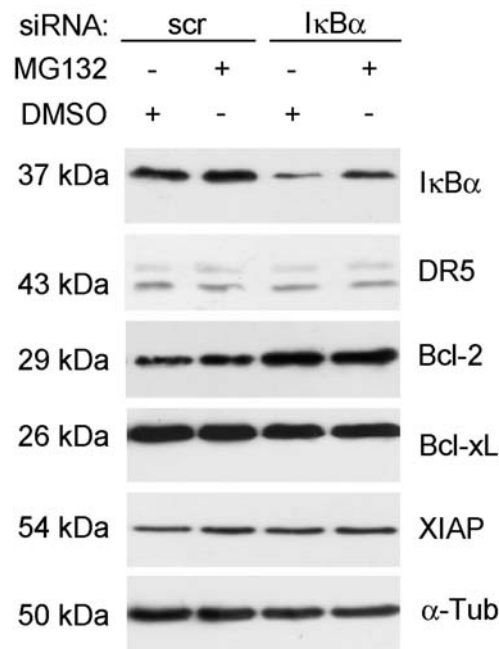


Abbildung 5.20: Die Expressionslevel von DR5 werden nicht durch Inhibition von I κ B α beeinflusst. U343-Zellen wurden mit 100 nM I κ B α -siRNA-Oligonukleotiden bzw. „scrambled“ Kontroll-siRNA (scr) transfiziert. Nach 48 h wurden die Kulturen für 1 h mit MG132 [2,5 μ M] oder dem entsprechenden Volumen an DMSO inkubiert und anschließend Gesamtzellextrakte der Kulturen mittels Western Blot auf I κ B α , DR5, Bcl-2, Bcl-xL und XIAP hin untersucht. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. Ähnliche Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Experimenten erzielt.

5.3.7 Der JNK/c-Jun-Signalweg ist maßgeblich an der Proteasomeninhibitor-induzierten DR5-Aktivierung und der Sensitivierung gegenüber TRAIL beteiligt

Als vierter potentieller Regulator der Proteasomeninhibitor-induzierten DR5-Aktivierung wurde nach p53, CHOP und NF- κ B c-Jun bzw. der N-terminale Kinasen (JNK)/c-Jun Stress-Signalweg ins Auge gefasst. JNK sind Mitglieder der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Superfamilie und umfassen die drei Isoformen JNK1, JNK2 und JNK3. Angeregt durch die MAPK-Kaskade translozieren die JNK in den Nukleus und phosphorylieren c-Jun an den Aminosäureresten Ser63 und Ser73 seiner N-terminalen Transaktivierungsdomäne (Davis 2000). Wie die anderen Mitglieder der Jun-Familie bildet c-Jun Homo- oder Heterodimere, letztere mit Mitgliedern der Fos-, ATF- oder JDP-Proteinfamilien. Diese als Aktivierendes Protein-1 (AP-1) bezeichneten Transkriptionsfaktoren regulieren Gene mit einer AP-1 Konsensus-Sequenz, auch als TPA-responsives Element (TRE) bekannt (Hess et al. 2004).

Es ist bekannt, dass Proteasomeninhibitoren wie MG132 den JNK/c-Jun-Signalweg aktivieren (Meriin et al. 1998). Um der Frage nachzugehen, ob JNK und c-Jun an der Proteasomeninhibitor-abhängigen DR5-Aktivierung in Gliomzellen beteiligt sind, wurde der Effekt von MG132 auf die Regulierung von DR5 in Gegenwart von SP600125 (Abbildung 5.21 A) untersucht, einem reversiblen, mit ATP kompetierenden Inhibitor von JNK1, -2 und -3 (Bennett et al. 2001). In Konzentrationen von 10 bis 30 μ M eingesetzt, reduzierte SP600125 signifikant die MG132-

induzierte Phosphorylierung von c-Jun in U251-Zellen (Abbildung 5.21 B). Obwohl SP600125 ab einer Konzentration von 20 μM selbst zu einer moderaten Steigerung der DR5-Proteinlevel beitrug, wurde die MG132-induzierte DR5-Expression in Abhängigkeit von der eingesetzten Inhibitor-Dosis deutlich gesenkt. In der Folge wurde dieser Befund in U343-Zellen mit der höchsten untersuchten Konzentration an SP600125 [30 μM] bestätigt (Abbildung 5.21 C).

Es konnte kein Effekt von SP600125 auf die MG132-induzierte Aktivierung von CHOP festgestellt werden (Abbildung 5.21 C). Dies legt die Vermutung nahe, dass das TRE in der CHOP-Promotorregion (Guyton et al. 1996) für die Proteasomeninhibitor-induzierte Hochregulierung von CHOP nicht zwingend benötigt wird und unterstützt den Befund, dass DR5 nach Proteasomeninhibition unabhängig von CHOP aktiviert wird.

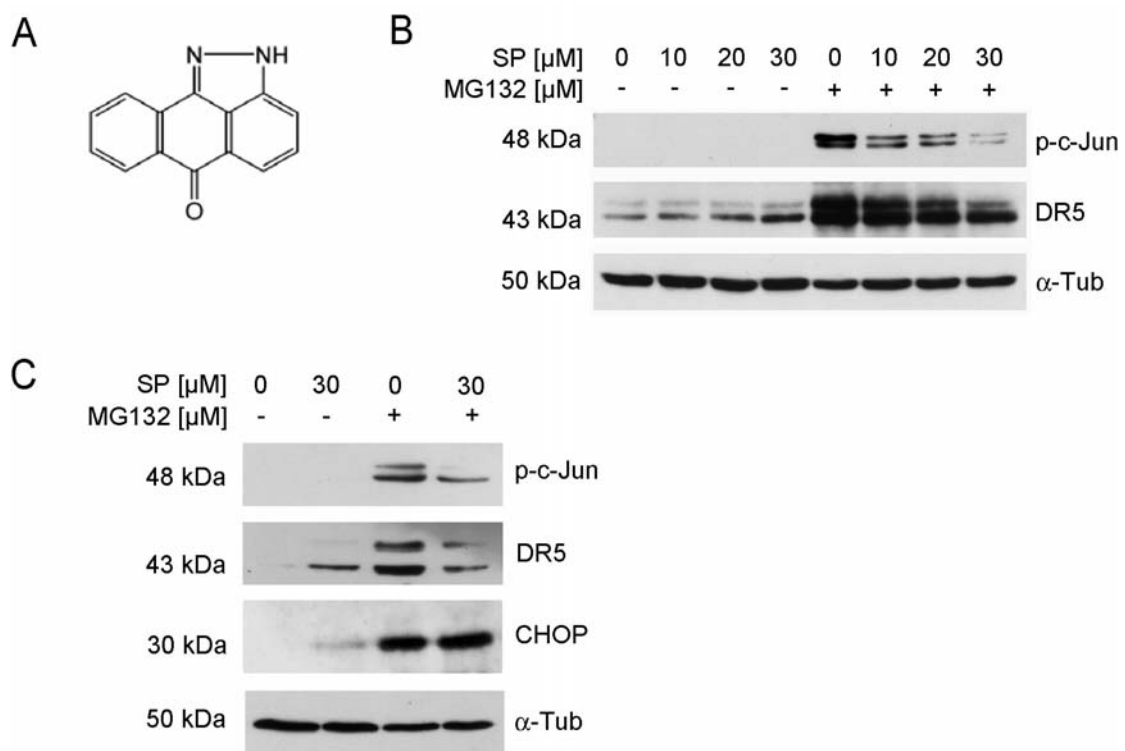


Abbildung 5.21: Der JNK/c-Jun-Signalweg ist entscheidend an der Aktivierung von DR5 nach Proteasomeninhibition beteiligt. **A** Strukturformel des JNK-Inhibitors SP600125. **B** U251-Zellen wurden für 2 h mit SP600125 (SP) vorbehandelt und für weitere 16 h mit den angegebenen Konzentrationen an SP600125 und MG132 [2,5 μM] inkubiert. Die Gesamtzelllextrakte der Kulturen wurden mittels Western Blot-Analyse auf die Proteinlevel von phosphoryliertem c-Jun (p-c-Jun) und DR5 hin untersucht. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. **C** U343-Zellen wurden wie oben beschrieben vorbehandelt und für 16 h mit 30 μM SP600125 oder einer Kombination aus SP600125 und MG132 [2,5 μM] inkubiert. Das Expressionsniveau von p-c-Jun, DR5 und CHOP wurde mittels Western Blot analysiert. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erzielt.

Um die Relevanz der JNK/c-Jun-abhängigen DR5-Regulierung für die TRAIL- und MG132-induzierte Apoptose zu beleuchten, wurden Caspase-Aktivitätstests durchgeführt (Abbildung 5.22). Die Blockierung des JNK/c-Jun-Signalwegs mit SP600125 führte zu einer signifikanten

Absenkung der TRAIL- und MG132-induzierten Caspase-3-ähnlichen Aktivität, sowohl in TRAIL-sensitiven (U87 und U251) als auch in TRAIL-resistenten Zelllinien (U343). Zusammengenommen deuten diese Daten auf eine maßgebliche Beteiligung des JNK/c-Jun-Signalwegs an der Regulierung von DR5 und der Reaktivierung TRAIL-induzierter Apoptose nach Proteasomeninhibition hin.

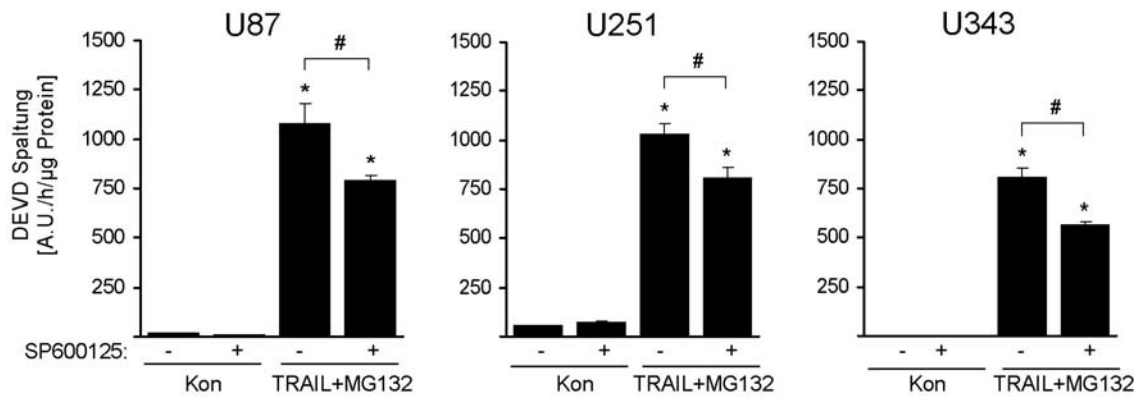


Abbildung 5.22: Der JNK/c-Jun-Signalweg ist maßgeblich an der Reaktivierung der TRAIL-induzierten Apoptose nach Proteasomeninhibition beteiligt. Die TRAIL-sensitiven Zelllinien U87 und U251, sowie die TRAIL-resistente Zelllinie U343 wurden für 2 h mit SP600125 vorbehandelt und im Anschluß mit 30 µM SP600125 und einer Kombination aus TRAIL [250 ng/mL] und MG132 [2,5 µM] für 16 h inkubiert. Schließlich wurden Gesamtzellextrakte der Kulturen auf Caspase-3-ähnliche Aktivität hin untersucht. Die Daten entsprechen Mittelwerten ± SEM von n = 4 unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erzielt. *, p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. #, p < 0,05 im Vergleich zur angezeigten Behandlung.

6 Diskussion

Anaplastische Astrozytome (WHO Grad III) und Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV) sind zusammengenommen die häufigsten primären Gliome und darüber hinaus die häufigsten malignen Tumore des ZNS (Hulleman and Helin 2005; Ashby and Ryken 2006). Ihr aggressives Wachstumsverhalten und ihre ausgeprägte Resistenz gegenüber den gegenwärtig verfügbaren Therapiemöglichkeiten, einschließlich Radio- und Chemotherapie, sind dafür verantwortlich, dass sich die Prognose für die betroffenen Patienten in den letzten Jahrzehnten nur unwesentlich verbessert hat. Neben der Erprobung von multimodalen Therapieansätzen (Ashby and Ryken 2006) konzentrieren sich deshalb die Bemühungen darauf, mehr über die molekularen Mechanismen zu lernen, die der Apoptose-Resistenz maligner Gliome zugrunde liegen, und darauf aufbauend neue Therapiestrategien zu entwickeln, die über die gegenwärtigen palliativen Maßnahmen hinausgehen.

6.1 Die Anoxie-Resistenz von Gliomzellen

Trotz starker Vaskularisierung sind maligne Gliome vermutlich infolge ineffizienter Mikrozirkulation (Jensen 2006) extrem hypoxische Tumore. Es ist bekannt, dass der Grad der Gewebshypoxie in soliden Tumoren mit der Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie korreliert (Jensen 2006). Da die erhöhte Anoxie-Toleranz von Tumorzellen mit einer Kreuzresistenz gegen andere apoptotische Stimuli korreliert (Weinmann et al. 2004), wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypoxie-Adaption von insgesamt 17 Gliomzelllinien mit dem Ziel untersucht, den Anoxie-induzierten Zelltod näher zu charakterisieren und die molekularen Mechanismen, die zur Apoptose- und Therapieresistenz von Gliomen beitragen, zu beleuchten.

Unter den Zelllinien wurde ein breites Spektrum an Reaktionen auf 48-stündige Anoxie festgestellt. Interessanterweise erwiesen sich 8 der 17 Zelllinien (47 %) als äußerst gut an lange anhaltenden Sauerstoffentzug adaptiert, drei davon (18 %) als nahezu Anoxie-resistent. Fünf Zelllinien (29 %) wurden als Anoxie-anfällig eingestuft und vier (24 %) als Anoxie-sensitiv.

In den folgenden Experimenten wurden Zellen aus den Gruppen der Anoxie-resistenten (U343, MZ-18), -anfälligen (U87, U251) und -sensitiven (MZ-54, U373) Zelllinien einander gegenübergestellt und vergleichend untersucht. In Einklang mit den Befunden vorhergehender Studien (Steinbach et al. 2003) wurde in sämtlichen Anoxie-sensitiven Zelllinien ein hauptsächlich nekrotischer Zelltod festgestellt. Spezifische Annexin-V-Bindung, ein Indikator für Apoptose, wurde nur in sehr geringem Umfang (max. 11 % in MZ-54-Zellen) nachgewiesen, Caspasen wurden nicht aktiviert. Messungen des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) ergaben eine enge Korrelation von Anoxie-Adaption und der Aufrechterhaltung von $\Delta\Psi_m$. Diese Daten belegen, dass Gliomzellen, im Gegensatz zu nicht-transformierten Zellen (Saikumar et al. 1998b) und etlichen Tumorzelllinien nicht-glialen Ursprungs (Amellem et al. 1997; Araya et al. 1998), unter

hypoxischen Bedingungen hauptsächlich eines Caspase-unabhängigen, Nekrose-ähnlichen Zelltods sterben. Dieser kann letzten Endes vermutlich auf eine Erschöpfung der ATP-Vorräte (Steinbach et al. 2003) zurückgeführt werden, wobei die Blockade von Effektor-Caspasen durch IAPs nach Aktivierung des intrinsischen Signalwegs eine zusätzliche Rolle bei der Inhibition der Apoptose spielen könnte. Da Caspasen in sämtlichen untersuchten Gliomzelllinien mit Staurosporin oder einer Kombination aus Proteasomeninhibitoren und TRAIL aktiviert werden konnten, müssen spezifische Mechanismen für die Unterdrückung der Anoxie-induzierten Apoptose in Betracht gezogen werden.

Solange die Zellen über ausreichende Energieressourcen bzw. ATP verfügen, käme dafür die verminderte Expression bzw. Induktion pro-apoptotischer Faktoren in Frage. Zwar deuten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen der basalen transkriptionellen Expression von Bax und einigen Vertretern der pro-apoptotischen BH3-only-Proteinfamilie an, dass eine niedrige Expression von Bax, Bnip3 und Noxa an der ausgeprägten Anoxie-Resistenz von U343-Zellen beteiligt sein könnte, in den anderen Anoxie-resistenten Zelllinien (MZ-18 und MZ-348) wurden jedoch keine Auffälligkeiten im Expressionsprofil der betreffenden Gene festgestellt. Eine kürzlich erschienene Studie ergab zudem, dass der individuelle Verlust einer Reihe von BH3-only Proteinen, darunter Puma und Noxa, in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) die Aktivierung Anoxie-induzierten Zelltods nicht verhindern kann (Brunelle et al. 2007). Eine parallel zu dieser Arbeit in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Studie (Hetschko et al., Manuskript in Vorbereitung) zeigt darüber hinaus, dass die Expression des Hypoxie-induzierten BH3-only-Proteins Bnip3 und seines Homologs Bnip3L/Nix keinen signifikanten Einfluss auf die Hypoxie-Adaption von Gliomzellen hat. In Hinblick auf das Potential von BH3-Mimetika, Gliomzellen für Anoxie zu sensitivieren, scheint daher der auch im Rahmen dieser Arbeit demonstrierten massiven Überexpression von anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern in malignen Gliomen in diesem Zusammenhang eine zentrale Bedeutung zuzukommen.

6.2 Expression von TRAIL-Rezeptoren und TRAIL-Sensitivität von Gliomzellen

Die Mitglieder der Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Superfamilie spielen eine zentrale Rolle bei der Aktivierung Rezeptor-vermittelter Apoptose. Durch Bindung an ihre zugehörigen Rezeptoren können z.B. TNF und Fas Ligand (FasL) in einer begrenzten Anzahl von Tumorzelllinien Caspase-abhängige Apoptose induzieren. Da ihre Verabreichung jedoch mit einer ausgeprägten Zytotoxizität verbunden ist, scheiden beide als potentielle Krebstherapeutika aus (Cretney et al. 2006). Der TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) hingegen induziert selektiv in einer Vielzahl von Krebszellen Apoptose, während die meisten nicht-transformierten Zellen unbeeinträchtigt bleiben. Entsprechend gelten TRAIL und agonistische TRAIL-Rezeptor-bindende

Antikörper als vielversprechende potentielle Therapeutika zur Behandlung von hämatologischen Krebserkrankungen und soliden Tumoren. In einigen Krebszelllinien, darunter auch solche aus malignen Gliomen (Song et al. 2003), ist die alleinige Behandlung der Zellen mit TRAIL jedoch nicht hinreichend, um erfolgreich Apoptose zu induzieren. Damit übereinstimmend wurden in dieser Studie nur zwei von sechs Gliomzelllinien als TRAIL-sensitiv identifiziert, was die Vermutung nahelegt, dass TRAIL-Resistenz ein weit verbreitetes Phänomen in malignen Gliomen ist. Anders als der Anoxie-induzierte Zelltod, der sich durch Nekrose-typische Merkmale auszeichnete, wurde in den beiden TRAIL-sensitiven Zelllinien U87 und U251 ein Caspase-abhängiger Zelltod induziert. Interessanterweise wurden beide Zelllinien als Anoxie-anfällig charakterisiert. Zudem zeigten die beiden extrem Anoxie-adaptierten Zelllinien U343 und MZ-18 eine vollständige TRAIL-Resistenz, was die Hypothese einer ausgeprägten Kreuzresistenz stärkt.

Als mögliche Ursache für die Resistenz von Krebszellen gegen TRAIL müssen die Überexpression von Decoy-Rezeptoren und/oder der Verlust oder die Repression von TRAIL-Todesrezeptoren in Betracht gezogen werden. Tatsächlich scheint der Verlust der Heterozygotie von Region 8p, einem Chromosomabschnitt auf dem die TRAIL-Rezeptorgene lokalisiert sind, ein häufiges Phänomen in Krebszellen zu sein (LeBlanc and Ashkenazi 2003). Ebenso käme eine Hypermethylierung der betreffenden Promotorregionen, wie sie z.B. in Neuroblastomzellen vorkommt, in Frage (van Noesel et al. 2003).

Übereinstimmend mit früheren Arbeiten (Rieger et al. 1998a; Hao et al. 2001) wurde jedoch in allen 16 untersuchten Gliomzelllinien die transkriptionelle Expression von DR5, dem wichtigsten TRAIL-Rezeptor (Kimberley and Screaton 2004), nachgewiesen. In den sechs genauer charakterisierten Zelllinien konnte kein Zusammenhang zwischen der Menge an DR5-Transkripten und der Sensitivität für TRAIL hergestellt werden. Auch die transkriptionelle Expression von DR4 und DcR1 und -2 korrelierte nicht mit der TRAIL-Sensitivität der Zelllinien. Daraus muss geschlossen werden, dass die Resistenz für TRAIL in Gliomen unabhängig vom transkriptionellen Expressionsprofil der Rezeptoren ist und durch Störungen der Signaltransduktion am DISC bzw. der stromabwärts gelegenen Signalkaskaden bedingt wird. Dafür spricht auch die ausbleibende Effektor-Caspasen-Aktivierung in TRAIL-resistenten Zelllinien.

6.3 Reaktivierung der Apoptose in Gliomzellen: Einsatz von BH3-Mimetika

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten demonstrieren eindrucksvoll, dass eine Monotherapie von malignen Gliomen mit TRAIL als wenig erfolgversprechend eingestuft werden muss. Zahlreiche Studien an verschiedenen Krebszelltypen belegen jedoch, dass die Resistenz gegen TRAIL durch kombinierte Therapieansätze mit Chemotherapie oder UV-Bestrahlung

überwunden werden kann (Jazirehi et al. 2001; Evdokiou et al. 2002; Vignati et al. 2002; Wendt et al. 2005). Diese Behandlungen stimulieren zusätzlich zu dem durch TRAIL angeregten extrinsischen Apoptose-Signalweg den intrinsischen, mitochondrialen Signalweg über die Aktivierung von p53 als zelluläre Antwort auf DNA-Schädigung (Duiker et al. 2006). Um kombinatorische Behandlungsmöglichkeiten zu identifizieren, die die TRAIL-Sensitivität von malignen Gliomzellen synergistisch steigern, wurden in dieser Arbeit die Effekte von Gamma-Bestrahlung mit Proteasomeninhibitoren (MG132 und Epoxomicin) und synthetischen BH3-Mimetika (BH3I-2' und HA14-1) verglichen.

Gamma-Bestrahlung spielt nach wie vor eine tragende Rolle in der postchirurgischen Behandlung von anaplastischen Astrozytomen (Grad III) (Salcman 1990; Burton and Prados 2000) und Glioblastomen (Grad IV) (Chamberlain 2006). Von insgesamt drei untersuchten Zelllinien (U87, U343 und U373) konnte jedoch nur die TRAIL-sensitive Zelllinie U87 durch Bestrahlung für TRAIL sensitiviert werden. In U343 und U373 wurde keine synergistische Wirkung festgestellt. Da U373-Zellen per se TRAIL-resistent sind und zudem über kein funktionelles p53 verfügen (Badie et al. 1999), überrascht dieser Befund nicht. U343-Zellen exprimieren hingegen wie U87-Zellen Wildtyp-p53.

Dies impliziert, dass der p53-Status (Wildtyp oder mutiert) nicht alleine darüber entscheidet, ob Gliomzellen durch Gamma-Bestrahlung für TRAIL sensitiviert werden können. Die Integrität der Apoptose-Signalwege bzw. das Ausmaß der Antagonisierung scheint dafür ebenso ausschlaggebend zu sein. Angesichts der potenten TRAIL-Sensitivierung von U343-Zellen durch den Bcl-2-Inhibitor HA14-1 kann spekuliert werden, dass die Überexpression von Bcl-2, und die dadurch induzierte Blockade des mitochondrialen Signalwegs, p53-induzierte Signalkaskaden unterbricht und so das synergistische Zusammenwirken von mitochondrialem und extrinsischem Signalweg nach kombinierter Behandlung mit TRAIL und Gammastrahlung verhindert.

Die Aktivierung der pro-apoptotischen Multidomänen-Bcl-2-Familienmitglieder Bak und Bax ist der entscheidende Schritt zur Initiierung der mitochondrial gesteuerten Apoptose. Ihm folgt die Freisetzung von Cytochrom c, AIF, Smac/DIABLO oder EndoG aus dem mitochondrialen Intermembranraum ins umgebende Cytosol und schließlich die Bildung des Apoptosoms (Kroemer et al. 2007). Die Überexpression von Bcl-2 und anderen Mitgliedern der Bcl-2-Familie, die diesen Vorgang antagonisieren, wurde in zahlreichen Krebs-Zelllinien und primären Tumoren, darunter maligne Gliome, nachgewiesen (Kroemer 1997; Fels et al. 2000). Gegenwärtig richtet sich ein immenses Interesse auf die Untersuchung von Substanzen, die der Blockade durch anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder entgegenwirken und so zu einer Reaktivierung des intrinsischen Apoptose-Signalwegs führen. Im Vordergrund stehen dabei synthetische Peptid-freie Moleküle (sogenannte BH3-Mimetika), die die BH3-Bindetasche von Bcl-2 und/oder Bcl-xL

kompetitiv blockieren und so die BH3-Domänen-vermittelte Heterodimerisierung mit proapoptischen Bcl-2-Familienmitgliedern verhindern. Erste vielversprechende Studien räumen Vertretern dieser neuen Wirkstoffklasse gute Perspektiven als Krebstherapeutika bzw. als Tumorsensitivierende Adjuvantien für herkömmliche Therapieformen ein (Cory and Adams 2005; Shoemaker et al. 2006; Kroemer et al. 2007).

Die Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs durch die Caspase-8-vermittelte Spaltung von Bid spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung TRAIL-Rezeptor-induzierter Apoptose (Yamada et al. 1999). In Übereinstimmung mit früheren Studien (Fels et al. 2000; Jiang et al. 2003) konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Bcl-2 und Bcl-xL in malignen Gliomzellen massiv überexprimiert werden. Da zudem bekannt ist, dass die exogene Überexpression von Bcl-2 zu einer Inhibierung der TRAIL-induzierten Apoptose beiträgt (Fulda et al. 2002a), wurden in der vorliegenden Arbeit die Bcl-2- bzw. Bcl-2- und Bcl-xL-spezifischen Inhibitoren HA14-1 (Wang et al. 2000b) und BH3I-2' (Degterev et al. 2001; Feng et al. 2003) eingesetzt. Die kombinatorische Behandlung mit TRAIL führte in beiden Fällen zu einer signifikanten Potenzierung der TRAIL-Sensitivität in den per se TRAIL-sensitiven Gliomzelllinien U87 und U251, wobei HA14-1 interessanterweise auch TRAIL-resistente U343-Zellen statistisch signifikant für TRAIL sensitivierte.

Diese Ergebnisse stärken die Hypothese, dass die Überexpression anti-apoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder in Gliomzellen die mitochondriale Amplifikation TRAIL-induzierter Apoptose-Signale einschränkt und die Toleranz der Zellen gegenüber TRAIL steigert. Voraussetzung für eine effektive TRAIL-Sensitivierung von Gliomzellen mit BH3-Mimetika scheint jedoch wie vermutet die TRAIL-induzierte Bid-Spaltung zu sein, die eine Transduktion der TRAIL-Rezeptor-vermittelten Signale über den DISC und die Aktivierung von Caspase-8 voraussetzt. Dies wird am Beispiel von U373-Zellen deutlich, die nicht auf die kombinierte BH3-Mimetika- und TRAIL-Behandlung ansprechen. Es wurde beschrieben, dass TRAIL in diesen Zellen keine Spaltung von Pro-Caspase-8 induzieren kann (Panner et al. 2005).

Bcl-2- und Bcl-xL zeigten in einem Großteil der untersuchten Zelllinien deutlich erhöhte basale Proteinlevel. Besonders auffällig war in diesem Zusammenhang, dass Bcl-2 in den TRAIL- und Anoxie-resistenten Zelllinien U343 und MZ-18 außergewöhnlich hoch exprimiert wird. Da zudem beschrieben ist, dass die Überexpressions von Bcl-2 unter hypoxischen Bedingungen einen starken protektiven Einfluss auf die mitochondriale Integrität nimmt (Saikumar et al. 1998a), wurden die beiden Inhibitoren HA14-1 und BH3I-2' in Anoxie-Experimenten eingesetzt. Beide Substanzen wirkten sowohl in Vertretern Anoxie-sensitiver als auch Anoxie-resistenter Gliomzellen signifikant Zelltod-promovierend. Besonders HA14-1, welches spezifisch an Bcl-2 bindet, potenzierte den Anoxie-induzierten Zelltod. Dieser Befund unterstreicht die Rolle der anti-apoptotischen Bcl-2-

Familienmitglieder bei der Unterdrückung Anoxie-induzierter Apoptose-Signale und hebt insbesondere die prominente Stellung von Bcl-2 für die Apoptose-Resistenz von Gliomen (Fulda et al. 2002a) hervor.

Mit Mcl-1 wurde ein weiteres Mitglied aus der Familie anti-apoptotischer Bcl-2-verwandter Proteine näher untersucht. Sein hohes Expressionsniveau in Astrozytomen (Krajewski et al. 1997) lässt es denkbar erscheinen, dass Mcl-1 eine ähnliche Rolle bei der Inhibition des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs zukommt wie Bcl-2 und Bcl-xL, oder dass die Proteine synergistisch wirken. Tatsächlich wurde unlängst beschrieben, dass die Repression von Mcl-1 durch RNAi oder Roscovitin die pro-apoptotischen Effekte des Bcl-2-/Bcl-xL-Inhibitors ABT-737 in Leukämie- und Lymphom-Zellen signifikant potenziert (van Delft et al. 2006; Chen et al. 2007). Im Zuge dieser Überlegungen wurde der transiente RNAi-vermittelte Knockdown von Mcl-1 in vier Gliomzelllinien etabliert. Erstaunlicherweise konnte trotz vergleichsweise hoher siRNA-Konzentrationen und einer guten Transfektionseffizienz erst nach frühestens 96 h eine signifikante Abnahme der Mcl-1-Proteinlevel verzeichnet werden. Auch parallel dazu durchgeführte Experimente mit Roscovitin, einem potenten CDK1-, CDK2- und CDK5-Inhibitor (Meijer et al. 1997), der indirekt die Transkription von Mcl-1 reprimiert (Chen et al. 2007), zeigten erst nach frühestens 96 h einen Rückgang der Mcl-1-Proteinlevel (Daten nicht gezeigt).

Dies ist insofern überraschend, als dass das Mcl-1-Protein über einen Aminosäure-Sequenzabschnitt mit einer hohen Anzahl an Prolin (P)-, Glutamat (E)-, Serin (S)- und Threonin (T)-Resten verfügt (Le Gouill et al. 2004). Diese sogenannte PEST-Sequenz bewirkt für gewöhnlich den raschen proteolytischen Abbau intrazellulärer Proteine (Rechsteiner and Rogers 1996). Allerdings wurde auch berichtet, dass die alleinige Phosphorylierung von Thr¹⁶³ über den ERK-Signalweg den Umsatz des Mcl-1-Proteins deutlich verlangsamt und das Zellüberleben fördert (Domina et al. 2004). Über die posttranslationale Stabilisierung von Mcl-1 durch die Interaktion mit anderen Proteinen ist hingegen nichts bekannt, jedoch käme auch dieser Mechanismus als Erklärung für die ungewöhnlich lange Halbwertszeit von Mcl-1 in Frage.

Trotz signifikanter Reduzierung der Mcl-1-Proteinlevel durch RNAi konnten die untersuchten Gliomzelllinien nicht für TRAIL sensitiviert werden, und auch die zusätzliche Inhibition von Bcl-2 mit HA14-1 bewirkte keine synergistische Steigerung des TRAIL-induzierten Zelltods.

In murinen embryonalen Fibroblasten wurde gezeigt, dass die Repression von Mcl-1 bei gleichzeitiger Inhibition von Bcl-2 und Bcl-xL (durch Inaktivierung der Elektronentransportkette) unerlässlich für die Aktivierung Anoxie-induzierter Apoptose ist (Brunelle et al. 2007). Indessen nahmen in Gliomzellen weder der Knockout von Mcl-1 noch die gleichzeitige Inhibition von Bcl-2 und Mcl-1 nachweisbar Einfluss auf die Sensitivierung der Zellen für Anoxie.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Bcl-xL und insbesondere Bcl-2, unabhängig von Mcl-1, entscheidend dazu beitragen, den mitochondrialen Apoptose-Signalweg zu blockieren und

maligne Gliome vor diversen apoptotischen Stimuli zu schützen.

6.4 Sensitivierung von Gliomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose durch Proteasomeninhibitoren

Der Ubiquitin-Proteasomen-Signalweg reguliert ein weites Spektrum essentieller zellulärer Funktionen wie Proteinumsatz, Zellzyklus-Progression, Immunantwort und Apoptose durch die proteolytische Degradation regulatorischer Proteine, darunter Cycline, Transkriptionsfaktoren und Onkoproteine (Lee and Goldberg 1998). Pharmakologische Inhibitoren des Proteasoms stellen eine Klasse neuer Krebsmedikamente mit großem therapeutischen Potential dar (Adams 2004). Schon früh konnte gezeigt werden, dass Proteasomeninhibitoren in Gliomzellen p53-unabhängig Apoptose und einen G2/M-Zellzyklus-Arrest induzieren (Wagenknecht et al. 1999b). Mit Bortezomib (PS-341/Velcade) wurde in den USA erstmals ein Proteasomeninhibitor als Krebsmedikament zur Behandlung von refraktorischem multiplen Myelom zugelassen (Richardson et al. 2005), was beispielhaft die klinische Relevanz des Ubiquitin-Proteasomen-Systems als Ziel für therapeutische Ansätze demonstriert.

Verglichen mit Caspasen, die das zentrale proteolytische System in der Apoptose darstellen, ist die Rolle des Proteasoms bei der Regulierung und Kontrolle des Zelltods jedoch weitaus weniger gut verstanden (Sohn et al. 2006). Eine mögliche Erklärung für die selektive Empfindlichkeit von Tumoren für Proteasomeninhibitoren liefert die Tatsache, dass maligne Zellen aufgrund ihrer hohen Proliferation verstärkt auf eine korrekte Degradierung aberranter Proteine angewiesen sind (Adams 2004). Neben ihrer direkten pro-apoptotischen Wirkung können Proteasomeninhibitoren Krebszellen zudem synergistisch für Radiotherapie und Standardchemotherapien sensitivieren (Almond and Cohen 2002).

Die beiden in dieser Arbeit eingesetzten Proteasomeninhibitoren, MG132 und Epoxomicin, sensitivierten Gliomzellen potent für TRAIL. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen zeigten die Proteasomeninhibitoren im direkten Vergleich zu den BH3-Mimetika eine deutlich höhere Effizienz. Beide Substanzen erhöhten den apoptotischen Zelltod um das 5- bis 6-fache in den TRAIL-sensitiven Zelllinien und waren darüber hinaus in der Lage, auch bei per se subtoxischen Konzentrationen, Apoptose in den beiden TRAIL-resistenten Zelllinien (U343 und U373) zu reaktivieren. Die vergleichsweise niedrigere Effizienz der BH3-Mimetika könnte durch die Expression weiterer anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie, wie etwa Bcl2L12 oder Bcl-w, erklärt werden, die synergistisch mit Bcl-2 und Bcl-xL zur Unterdrückung apoptotischer und nicht-apoptotischer Zelltodprogramme auf Ebene der Mitochondrien beitragen. Zusätzlich trägt möglicherweise die in Gliomen verbreitete Überexpression von XIAP zu einer Blockade der Caspase-Aktivierung stromabwärts der Mitochondrien bei (Wagenknecht et al. 1999a; Fulda et al. 2002b). Einen zentralen Aspekt der therapeutischen Überlegenheit von Proteasomeninhibitoren

dürfte der Umstand ausmachen, dass ihre Wirkung nicht auf einzelne Komponenten bestimmter Signalwege beschränkt ist, sondern simultan multiple zelluläre Ziele in Angriff genommen werden.

Ungeachtet ihres unbestrittenen therapeutischen Potentials bei der Bekämpfung bösartiger Krebserkrankungen sind die molekularen Mechanismen, die der Wirkung von Proteasomeninhibitoren zugrunde liegen, noch immer nicht befriedigend aufgeklärt und variieren zudem allen Anschein nach merklich zwischen verschiedenen Tumorzelltypen. Eine vergleichende Microarray-Analyse der Expression von 96 Apoptose-relevanten Genen nach Epoxomicin-Behandlung in TRAIL-sensitiven (U87) und –resistenten Gliomzellen (U373) identifizierte DR5 als interessanten Kandidaten, ergab ansonsten jedoch lediglich, dass in der TRAIL-sensitiven Zelllinie deutlich mehr pro-apoptotische Gene, darunter auch solche, die für Komponenten des DISC kodieren, aktiviert werden.

Eingehendere Untersuchungen bestätigten die potente Hochregulierung der DR5-Expression nach Proteasomeninhibition auf mRNA- und Proteinebene. Dahingegen trug Gamma-Bestrahlung, auch in den p53-exprimierenden Zelllinien, nur zu einem moderaten Anstieg der DR5-Proteinlevel bei. Das erhöhte Protein- und Oberflächenexpressionsniveau von DR5 infolge der Proteasomeninhibition kann auf transkriptionelle Aktivierung bei gleichzeitig verminderter Proteindegradation zurückgeführt werden und liefert damit eine mögliche Erklärung für die hohe Effizienz von Proteasomeninhibitoren, Gliomzellen für TRAIL zu sensitivieren. Tatsächlich hatte die RNAi-vermittelte Inhibition der Proteasomeninhibitor-ausgelösten DR5-Induktion in U343- und U251-Zellen eine potente Reduzierung der DR5-Oberflächenexpression und einen signifikanten Rückgang der TRAIL- und MG132-induzierten Apoptose zur Folge. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die transkriptionelle Aktivierung bzw. die erhöhte Oberflächenexpression von DR5 in Gliomzellen im Gegensatz zu anderen Krebszelltypen wie etwa Leberkarzinomzellen (Ganten et al. 2004) eine ausschlaggebende Rolle bei der Potenzierung bzw. Reaktivierung von TRAIL-induzierter Apoptose spielt.

Das zelluläre FLICE-inhibierende Protein (c-FLIP) ist ein anti-apoptotisch wirkendes Protein, dessen beide Splice-Varianten FLIP S und FLIP L kompetitiv die Spaltung von Caspase-8 am DISC inhibieren können (Krueger et al. 2001). In Zusammenhang mit der Sensitivierung unterschiedlicher Tumorzelltypen für TRAIL wurde mehrfach die Proteasomeninhibitor-induzierte Reduzierung der FLIP L- und FLIP S-Proteinlevel beschrieben (Zhang et al. 2004; Kabore et al. 2006; Li et al. 2007). Interessanterweise wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nach 16-stündiger Behandlung mit MG132 eine dosisabhängige Anhäufung von FLIP S festgestellt. FLIP S repräsentiert eine FLIP-Splicevariante, die im Gegensatz zu FLIP L vollständig die Spaltung von Pro-Caspase-8 blockiert (Krueger et al. 2001). Zwar wurde auch in Leberzellkarzinomen und HeLa-Zellen durch Proteasomeninhibition eine zeitlich begrenzte Stabilisierung beider FLIP-Splicevarianten festgestellt (Ganten et al. 2005; Sohn et al. 2006). In Hinblick auf die potente TRAIL-induzierte Apoptose-Aktivität zu diesem Zeitpunkt (vgl. Abschnitt

5.2.4) überrascht der Befund jedoch insofern, als dass FLIP S in Glioblastomen maßgeblich zur Resistenz gegen TRAIL beiträgt (Panner et al. 2005). Auch Mcl-1 wurde in einer der beiden untersuchten Zelllinien auf Proteinebene dosisabhängig durch Proteasomeninhibitoren stabilisiert. Das Caspase-9-, -7- und -3-inhibierende Protein XIAP hingegen war zum selben Zeitpunkt in Folge kombinierter Behandlung der Zellen mit MG132 und TRAIL bereits signifikant degradiert worden und auch bei 4-fachen MG132-Konzentrationen wurde keine Stabilisierung des Proteins festgestellt.

Es ist daher anzunehmen, dass pro-apoptotische Faktoren, wie z.B. Caspasen, zum gewählten Zeitpunkt hinreichend stabilisiert sind, um die Wirkung der erhöhten FLIP S- bzw. Mcl-1-Proteinlevel zu kompensieren. Die Annahme einer biphasischen Rolle des Proteasoms in der Rezeptor-vermittelten Apoptose (Sohn et al. 2006) muss hingegen angesichts der vorliegenden Daten kritisch überdacht werden. Sie impliziert die biphasische Wirkung von Proteasomeninhibitoren mit einer initialen protektiven Phase (Stabilisierung anti-apoptotischer Proteine, z.B. FLIP, XIAP und Bcl-2) und einer darauf folgenden Apoptose-promovierenden Phase, in der Caspasen stabilisiert werden und z.B. XIAP spalten.

Aufgrund der hohen Effizienz von Proteasomeninhibitoren wurde der Frage nachgegangen, welche Signalwege an der DR5-Aktivierung nach Proteasomeninhibition beteiligt sind. Dabei wurde in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen anderer Krebszelltypen (Yoshida et al. 2005; Concannon et al. 2006) eine potente Proteasomeninhibitor-induzierte Aktivierung des Stress-induzierten pro-apoptotischen Transkriptionsfaktors CHOP beobachtet. Obwohl CHOP in verschiedenen Tumoren als mutmaßlicher transkriptioneller Regulator stromaufwärts von DR5 beschrieben wurde (Yamaguchi and Wang 2004; Yoshida et al. 2005) konnte in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter CHOP-abhängiger Effekt auf die Expression von DR5 oder den TRAIL- und MG132-induzierten Zelltod ermittelt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CHOP in Gliomzellen keine Rolle bei der Proteasomeninhibitor-induzierten transkriptionellen Regulierung von DR5 spielt.

Zwei weitere Apoptose-kontrollierende Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität von Proteasomeninhibitoren reguliert wird, sind p53 und NF- κ B. Eine Vielzahl von Studien berichtet, dass Proteasomeninhibition eine p53-abhängige Apoptose in verschiedenen Krebszellen auslöst, darunter Leukämiezellen (Masdehors et al. 2000), Melanomzellen, Darmkrebszellen und Myelomzellen (Qin et al. 2005; Concannon et al. 2006). Zudem beherbergt die Promotorregion des DR5-Gens drei p53-DNA-Bindestellen (Takimoto and El-Deiry 2000). In Gliomzellen hingegen wurde eine Proteasomeninhibitor-vermittelte Apoptose unabhängig vom p53-Status der Zellen beobachtet (Wagenknecht et al. 1999b; Yin et al. 2005). In Übereinstimmung damit konnte in

dieser Arbeit die p53-abhängige transkriptionelle Regulation von DR5 nach Proteasomeninhibition ausgeschlossen werden.

Aufgrund der Tatsache, dass die Proteinlevel von I κ B α , dem wichtigsten endogenen Inhibitor von NF- κ B, durch das Ubiquitin-Proteasomen-System kontrolliert werden, stabilisiert der Einsatz von Proteasomeninhibitoren I κ B α und inhibiert so indirekt die Aktivität von NF- κ B (Karin and Ben-Neriah 2000). Demzufolge berichten zahlreiche Studien, dass die Repression anti-apoptotischer NF- κ B-Zielgene (darunter Bcl-2, FLIP und IAPs) ausschlaggebend für die Proteasomeninhibitor-induzierte Sensitivierung zahlreicher Krebszelltypen gegenüber Chemotherapeutika und Rezeptor-vermittelter Apoptose ist (Cusack et al. 2001; Hideshima et al. 2002; Sayers et al. 2003; Yin et al. 2005). In diesem Zusammenhang muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Caspasen-3 und -8 selbst einer raschen Ubiquitinylierung und Degradierung durch das Proteasom unterworfen sind, und ihre Stabilisierung durch Proteasomeninhibition bereits zu einem Zeitpunkt Wirkung zeigt, da sich der Einfluss der veränderten NF- κ B-Zielgenexpression noch nicht manifestiert hat (Kim et al. 2004b). In Neuroblastom- und Darmkrebszellen konnte zudem kein Zusammenhang zwischen der Applikation von Epoxomicin und der Regulation von NF- κ B-Zielgenen festgestellt werden (Concannon et al. 2006) und eine kürzlich erschienene Studie berichtet, dass die Inhibition von NF- κ B die durch DNA-Schädigung, TRAIL und Proteasomeninhibitoren-induzierte Apoptose in Glioblastomzelllinien nicht signifikant beeinflusst (La Ferla-Bruhl et al. 2007).

Die Effekte der Proteasomeninhibitor-vermittelten Blockade des NF- κ B-Signalwegs auf die Apoptose-Sensitivität der Zellen sind also offenbar stark vom Zeitpunkt und dem Krebszelltyp abhängig. In der vorliegenden Arbeit konnte der Einfluss von NF- κ B auf die Aktivierung von DR5 nach Proteasomeninhibition bedauerlicherweise nicht genauer untersucht werden, da I κ B α überraschenderweise durch MG132 nur kurzfristig stabilisiert und bereits nach 120 min sukzessive degradiert wurde. Damit widerspricht dieser Befund dem herrschenden Paradigma der Proteasomeninhibitor-vermittelte I κ B α -Stabilisierung und der daraus resultierenden Inhibition von NF- κ B (Karin and Ben-Neriah 2000) und entzieht darüber hinaus dem experimentellen Ansatz, den Einfluss von NF- κ B auf die Aktivierung von DR5 nach Proteasomeninhibition und RNAi-vermittelter I κ B α -Repression zu untersuchen, die Grundlage. Anzumerken bleibt jedoch, dass die I κ B α -Repression bzw. die mutmaßliche NF- κ B-Aktivierung über einen Zeitraum von 48 h zwar zu einer Steigerung der Bcl-2-, nicht jedoch einer Regulierung der DR5-Proteinlevel beitrug.

Wie sich die kontinuierliche Degradierung von I κ B α durch MG132 erklärt, ist unklar. Zwar wurde das Phänomen auch in Prostatakrebszellen beobachtet (Shirley et al. 2005), jedoch nicht näher untersucht. Man kann spekulieren, dass ein alternatives proteolytisches System für den MG132-induzierten Abbau von I κ B α verantwortlich ist. Calpaine, die eine Kalzium-abhängige

Familie nicht-lysosomaler Cystein-Proteasen repräsentieren (Goll et al. 2003), kommen dafür jedoch nicht infrage, da auch sie von MG132 inhibiert werden (Lee and Goldberg 1998). Dahingegen wurde mit der Tripedtidyl Peptidase II (TPPII), einer zytosolischen Serin-Peptidase vom Subtilisin-Typ, ein proteolytisches System beschrieben, das in Säugerzellen bei kompromittierter Proteasomenfunktion die Ubiquitin-abhängige Protein-Degradation hinreichend kompensieren kann (Glas et al. 1998; Wang et al. 2000a). Angesichts der aberranten Akkumulation intrazellulärer Proteine infolge von Proteasomeninhibition wäre auch denkbar, dass eine oder mehrere putative intrazelluläre Proteasen stabilisiert werden und I κ B α degradieren. So ist bekannt, dass I κ B α N-terminal von Caspase-3 gespalten werden kann, diese Reaktion allerdings durch Phosphorylierung der Serin-Reste 36 und 40 (Ziele der I κ B-Kinase) inhibiert wird (Barkett et al. 1997).

Da Proteasomeninhibitoren bekanntlich auch den Stress-induzierten JNK/c-Jun-Signalweg anregen (Meriin et al. 1998; Yin et al. 2005), stellte sich abschließend die Frage, ob möglicherweise dieser Signaltransduktionsweg nach Applikation von Proteasomeninhibitoren an der transkriptionellen Aktivierung von DR5 beteiligt ist. RT-PCR-Analysen hatten eine potente transkriptionelle Aktivierung von c-Jun nach Proteasomeninhibition ergeben, die durch einen positiven „Feedback-Loop“-Mechanismus einschließlich Aktivierung von JNK, Phosphorylierung von c-Jun und schließlich erhöhter c-Jun-Expression erklärt werden kann (Minet et al. 2001). Die Behandlung von Gliomzellen mit dem spezifischen JNK-Inhibitor SP600125 führte zu einer signifikanten dosisabhängigen Reduzierung der Proteinmengen von phosphoryliertem c-Jun (p-c-Jun), ohne dabei jedoch die Expression von CHOP zu beeinträchtigen, in dessen Promotorregion sich ein AP-1-bindendes Sequenzmotiv befindet (Guyton et al. 1996). Begleitet wurde der p-c-Jun-Rückgang von einer deutlichen Reduzierung der DR5-Proteinlevel und einer signifikanten Abschwächung TRAIL- und MG132-induzierter Apoptose, was nachdrücklich auf eine CHOP-unabhängige, JNK/c-Jun-regulierte DR5-Aktivierung nach Proteasomeninhibition hindeutet.

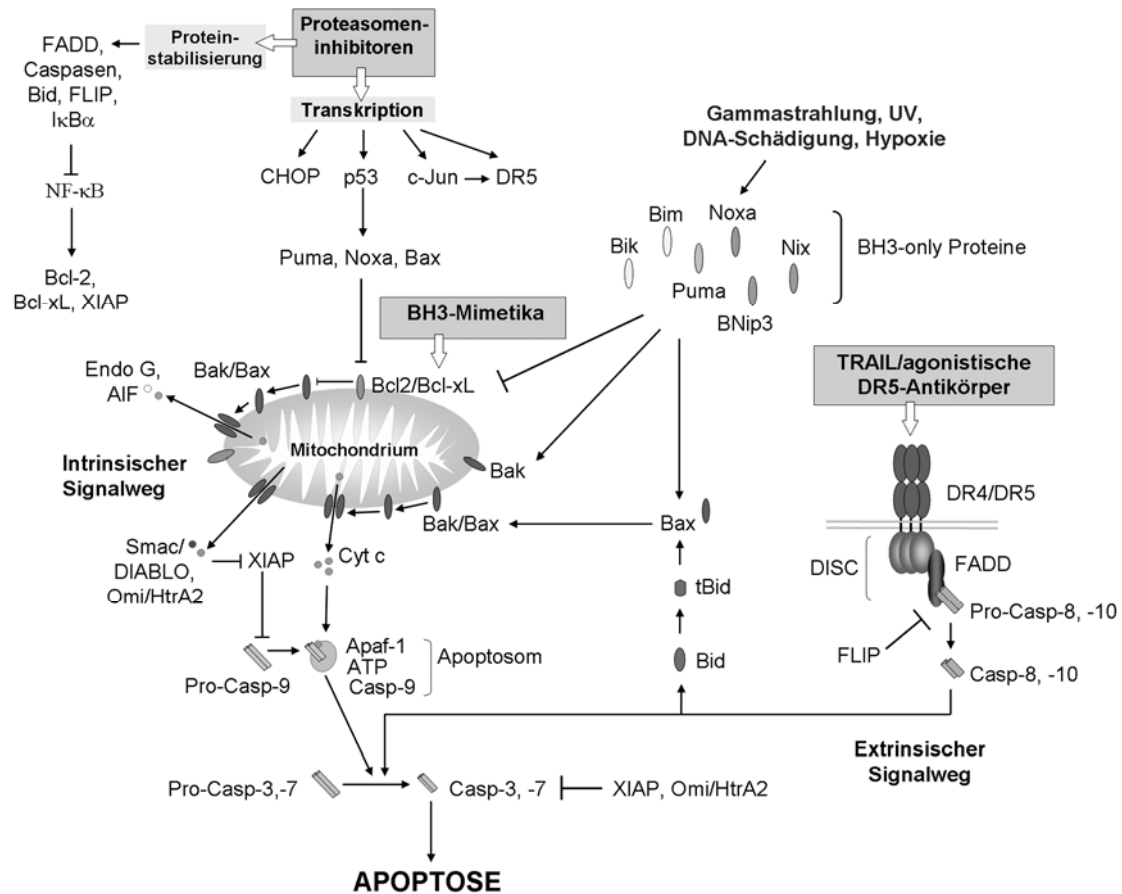


Abbildung 6.1: Wirkung neuer potentieller Krebstherapeutika auf die apoptotische Signaltransduktion. Schematische Darstellung des mitochondrialen (intrinsischen) und Rezeptorvermittelten (extrinsischen) Apoptose-Signalwegs. Über die Caspase-8-vermittelte Spaltung von Bid werden beide Signalwege miteinander gekoppelt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die Überexpression anti-apoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder in Gliomzellen maßgeblich zur Unterdrückung pro-apoptotischer Signale auf Ebene der Mitochondrien und in letzter Konsequenz zu der ausgeprägten Apoptose- und Therapieresistenz der Zellen beiträgt. Synthetische Bcl-2-/Bcl-xL-Inhibitoren können Gliomzellen potent für apoptotische Stimuli wie Anoxie oder TRAIL-Rezeptor-Signale sensitivieren, werden in ihrer Effizienz jedoch von Proteasomeninhibitoren übertroffen, vermutlich da ihre Wirkung nicht auf einzelne zelluläre Ziele beschränkt ist, sondern zu einer raschen Stabilisierung bzw. Aktivierung verschiedener apoptotischer Proteine beiträgt (Abbildung 6.1).

Der Induktion und erhöhten Oberflächenexpression des TRAIL-Todesrezeptors DR5 scheint bei der Sensitivierung von Gliomzellen für die TRAIL-vermittelte Apoptose durch Proteasomeninhibitoren eine tragende Rolle zuzukommen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Stress-induzierte JNK/c-Jun-Signalweg als maßgebliche, an der transkriptionellen Aktivierung von DR5 beteiligte Komponente identifiziert.

Zusammengenommen legen die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde nahe, dass neuartige Therapieansätze, die auf einem kombinatorischen Einsatz von TRAIL oder agonistischen

TRAIL-Rezeptor-Antikörpern in Verbindung mit Proteasomeninhibitoren oder BH3-Mimetika beruhen, vielversprechende Strategien zur effizienten Reaktivierung der Apoptose in Therapie-resistenten hochgradigen Gliomen darstellen.

Ausblick

Nachdem die vorliegende Arbeit die Rolle von Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1 bei der Blockade des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs in Gliomen beleuchtet, der Einsatz von BH3-Mimetika und/oder Mcl-1-RNAi diese Blockade jedoch nicht vollständig und nicht in allen untersuchten Zelllinien überwinden konnte, steht zu vermuten, dass weitere anti-apoptotische Vertreter der Bcl-2-Familie an der Apoptose-Resistenz von Gliomen maßgeblich beteiligt sind. Die simultane pharmakologische Inhibierung mehrerer Bcl-2-Familienmitglieder, etwa von Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1 mit Pan-Bcl-2-Inhibitoren wie z.B. (-)-Gossypol (Dodou et al. 2005), ergänzt durch die gerichtete Repression von Bcl-w und/oder Bcl2L12 mittels RNAi, könnte darüber möglicherweise Aufschluss geben. Besonders wertvoll für die Evaluation zukünftiger Therapiemöglichkeiten mit BH3-Mimetika wäre in diesem Zusammenhang die Untersuchung kombinatorischer Ansätze mit konventionellen Therapien wie Temozolomid, BNCU oder Gamma-Bestrahlung, sowie mit TRAIL. Die effiziente Reaktivierung des Zelltods in Apoptose-resistenten Gliomzellen durch die Applikation von Chemotherapeutika oder TRAIL in Verbindung mit BH3-Mimetika ließe eine breite Anwendung von BH3-Mimetika in der Krebstherapie möglich erscheinen.

In der vorliegenden Studie wurde die potente Reaktivierung der TRAIL-vermittelten Apoptose nach Sensitivierung von Gliomzellen mit Proteasomeninhibitoren festgestellt und die transkriptionelle Aktivierung des Todesrezeptors DR5 als wichtige Voraussetzung dafür identifiziert. In diesem Zusammenhang wäre es äußerst interessant, die Effizienz der eingesetzten rekombinanten humanen TRAIL-Moleküle mit einem agonistischen DR5-Antikörper wie etwa HGS-ETR2 (Marini et al. 2006) zu vergleichen. Aufgrund der erhöhten Stabilität und der Eigenschaft, ausschließlich DR5-Homotrimere zu rekrutieren, könnte der Einsatz eines solchen Antikörpers in Kombination mit Proteasomeninhibitoren die Effizienz von rekombinantem TRAIL noch weiter übertreffen.

Im Sinne neuer multimodaler Therapieansätze wäre es darüber hinaus von Interesse, die Effekte der herkömmlichen Gliomtherapie (Temozolomid, Radiotherapie) ebenfalls in Kombination mit Proteasomeninhibitoren zu untersuchen.

Zusätzlich zu mechanistischen und funktionellen Untersuchungen *in vitro* sind für die bessere Einschätzung des therapeutischen Potentials von TRAIL oder agonistischen DR5-Antikörpern in Kombination mit Proteasomeninhibitoren bzw. BH3 Mimetika als nächster Schritt Experimente *in vivo*, vorzugsweise am orthotopen Xenograft-Modell der Maus, dringend notwendig.

7 Zusammenfassung

Maligne Gliome, darunter anaplastische Astrozytome (WHO Grad III) und Glioblastome (Grad IV), sind die häufigsten und aggressivsten Neoplasien des Zentralen Nervensystems. Sie zählen zu den hypoxischsten Tumoren und entwickeln u.a. durch die Adaption an niedrige Sauerstoffbedingungen infolge des Selektionsdrucks Apoptose-resistente Phänotypen. Die gegenwärtige Gliomtherapie umfasst in der Regel die chirurgische Entfernung des Tumors und eine darauf folgende Strahlentherapie, die im Falle von Glioblastomen (Grad IV) durch adjuvante Gabe von alkylierenden Substanzen wie Temozolomid begleitet wird. Trotz intensiver Bemühungen ist es jedoch bislang nicht möglich, maligne Gliome zu heilen. Die mediane Überlebenszeit nach der Diagnose liegt bei anaplastischen Astrozytomen (Grad III) zwischen 18 und 20 Monaten und bei Glioblastomen zwischen 8 und 12 Monaten. Angesichts dieser dramatischen Umstände sind dringend neue Therapiestrategien zur gezielten Überwindung der Apoptose- bzw. Therapieresistenz maligner Gliome erforderlich.

Der Todesligand TRAIL, der durch Bindung an die TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 selektiv in Tumorzellen Zelltod aktiviert, ist ein vielversprechender Kandidat für neue Apoptose-induzierende Krebstherapien. Da maligne Gliome und einige weitere Krebszelltypen gegen TRAIL weitestgehend resistent sind, richtet sich das Interesse gegenwärtig verstärkt auf kombinatorische Therapieansätze, die Tumorzellen für TRAIL sensitivieren bzw. die TRAIL-induzierte Apoptose reaktivieren sollen.

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurden 17 Gliomzelllinien in einem *in vitro*-Anoxiemodell auf ihre Anoxie-Toleranz hin untersucht. Dabei wurde eine hohe Variabilität mit der Tendenz zu einer ausgeprägten Anpassung an niedrige Sauerstoffverhältnisse festgestellt, die von der Fähigkeit begleitet wird, das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi_m$ unter Anoxie aufrecht zu erhalten. Der durch Anoxie induzierte Zelltod wurde als Caspase-unabhängig und Nekrose-ähnlich charakterisiert. Apoptose wurde hingegen auch in den Anoxie-sensitiven Zelllinien nach 48-stündigem Sauerstoffentzug nur in sehr geringem Ausmaß beobachtet. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Analysen mit den synthetischen BH3-Mimetika HA14-1 und BH3I-2', die selektiv Bcl-2 bzw. Bcl-2 und Bcl-xL inhibieren, lassen darauf schließen, dass die für Gliomzellen typische Bcl-2- und Bcl-xL-Überexpression eine Blockade des mitochondrialen Signalwegs verursacht und so entscheidend zur Apoptose-Resistenz von malignen Gliomen beiträgt.

In Untersuchungen bezüglich der Sensitivität gegenüber TRAIL reagierten von sechs untersuchten Gliomzelllinien lediglich zwei auf die Behandlung mit TRAIL. Eine Korrelation zwischen TRAIL-Sensitivität und TRAIL-Rezeptor- bzw. Decoy-Rezeptor-Expression konnte nicht festgestellt werden. In der Folge wurde die Effizienz konventioneller und neuartiger Therapien

verglichen, Gliomzellen für TRAIL-induzierte Apoptose zu sensitivieren. Dazu wurde Gamma-Strahlung (eine tragende Säule der herkömmlichen Gliomtherapie) mit der Applikation von BH3-Mimetika und Proteasomeninhibitoren verglichen. BH3-Mimetika werden bislang nur in der präklinischen Krebsforschung eingesetzt, wohingegen mit Bortezomib bereits ein Proteasomeninhibitor zur Therapie des Multiplen Myeloms zugelassen ist. Während Gamma-Strahlung lediglich die TRAIL-Sensitivität von U87-Zellen steigerte, erhöhten die BH3-Mimetika signifikant den TRAIL-induzierten Zelltod in TRAIL-sensitiven Zellen und waren darüber hinaus auch in der Lage, in der TRAIL-resistenten Zelllinie U343 TRAIL-induzierte Apoptose zu reaktivieren. Diese Befunde legen nahe, dass die hohen Bcl-2- und Bcl-xL-Proteinlevel verschiedene Signalwege hemmen, die an den Mitochondrien konvergieren und dadurch die Apoptose- bzw. Therapie-Resistenz maligner Gliome steigern. Mcl-1 scheint in diesem Zusammenhang keine tragende Rolle zu spielen: Die transiente RNAi-vermittelte Repression der Mcl-1-Proteinlevel beeinträchtigte weder die Anoxie- noch die TRAIL-Sensitivität der untersuchten Zellen.

Der Einsatz der Proteasomeninhibitoren MG132 und Epoxomicin erwies sich als äußerst effizient: Beide Substanzen vervielfachten p53-unabhängig den TRAIL-induzierten Zelltod in TRAIL-sensitiven Gliomzellen und reaktivierten darüber hinaus potent die TRAIL-induzierte Apoptose in den TRAIL-resistenten Zelllinien. Semi-quantitative RT-PCR- und Microarray-Analysen ergaben eine ausgeprägte transkriptionelle Aktivierung des TRAIL-Rezeptors DR5 und der Stress-induzierten Transkriptionsfaktoren CHOP und c-Jun. Die transiente Transfektion von U343-Zellen mit spezifischen, gegen DR5 gerichteten siRNA-Oligonukleotiden bewirkte einen deutlichen Rückgang der intrazellulären DR5-Proteinlevel sowie der DR5-Zelloberflächenexpression und senkte signifikant den TRAIL- und MG132-induzierten Zelltod. Die RNAi-vermittelte Repression von CHOP wirkte sich dagegen weder auf die Aktivierung von DR5 noch auf die Induktion TRAIL- und MG132-induzierter Apoptose aus, was vermuten lässt, dass CHOP in diesem Szenario keine tragende Rolle spielt. Experimente mit dem JNK-spezifischen Inhibitor SP600125 führten indes sowohl in TRAIL-sensitiven als auch -resistenten Zellen zu einem dosisabhängigen Rückgang der Menge an phosphoryliertem, aktivem c-Jun, begleitet von einer Reduktion der DR5-Proteinlevel und einer signifikanten Abschwächung des TRAIL- und MG132-induzierten Zelltods. Diese Befunde machen deutlich, dass die Resistenz gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose in malignen Gliomen durch die pharmakologische Hemmung des Proteasoms und die JNK/c-Jun-vermittelte Aktivierung des Todesrezeptors DR5 überwunden werden kann.

Zusammengenommen legt die vorliegende Arbeit nahe, dass neue kombinatorische Ansätze, basierend auf TRAIL oder agonistischen TRAIL-Rezeptor-Antikörpern in Verbindung mit Proteasomeninhibitoren oder BH3-Mimetika, vielversprechende Strategien zur Reaktivierung der Apoptose in Therapie-resistenten Gliomen darstellen.

8 Literaturverzeichnis

- Acker, T. and K.H. Plate. 2002. A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology. *J Mol Med* **80**: 562-75.
- Adams, J. 2004. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer* **4**: 349-60.
- Adams, J., M. Behnke, S. Chen, A.A. Cruickshank, L.R. Dick, L. Grenier, J.M. Klunder, Y.T. Ma, L. Plamondon, and R.L. Stein. 1998. Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett* **8**: 333-8.
- Almond, J.B. and G.M. Cohen. 2002. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* **16**: 433-43.
- Alnemri, E.S., D.J. Livingston, D.W. Nicholson, G. Salvesen, N.A. Thornberry, W.W. Wong, and J. Yuan. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**: 171.
- Amellem, O., T. Stokke, J.A. Sandvik, L. Smedshammer, and E.O. Pettersen. 1997. Hypoxia-induced apoptosis in human cells with normal p53 status and function, without any alteration in the nuclear protein level. *Exp Cell Res* **232**: 361-70.
- Andre, P., M. Groettrup, P. Klennerman, R. de Giuli, B.L. Booth, Jr., V. Cerundolo, M. Bonneville, F. Jotereau, R.M. Zinkernagel, and V. Lotteau. 1998. An inhibitor of HIV-1 protease modulates proteasome activity, antigen presentation, and T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13120-4.
- Araya, R., T. Uehara, and Y. Nomura. 1998. Hypoxia induces apoptosis in human neuroblastoma SK-N-MC cells by caspase activation accompanying cytochrome c release from mitochondria. *FEBS Lett* **439**: 168-72.
- Asai, A., Y. Miyagi, A. Sugiyama, M. Gamanuma, S.H. Hong, S. Takamoto, K. Nomura, M. Matsutani, K. Takakura, and Y. Kuchino. 1994. Negative effects of wild-type p53 and s-Myc on cellular growth and tumorigenicity of glioma cells. Implication of the tumor suppressor genes for gene therapy. *J Neurooncol* **19**: 259-68.
- Ashby, L.S. and T.C. Ryken. 2006. Management of malignant glioma: steady progress with multimodal approaches. *Neurosurg Focus* **20**: E3.
- Badie, B., C.S. Goh, J. Klaver, H. Herweijer, and D.A. Boothman. 1999. Combined radiation and p53 gene therapy of malignant glioma cells. *Cancer Gene Ther* **6**: 155-62.
- Barkett, M., D. Xue, H.R. Horvitz, and T.D. Gilmore. 1997. Phosphorylation of I κ B α inhibits its cleavage by caspase CPP32 in vitro. *J Biol Chem* **272**: 29419-22.
- Bennett, B.L., D.T. Sasaki, B.W. Murray, E.C. O'Leary, S.T. Sakata, W. Xu, J.C. Leisten, A. Motiwala, S. Pierce, Y. Satoh, S.S. Bhagwat, A.M. Manning, and D.W. Anderson. 2001. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13681-6.
- Bishop, D.T. and N.R. Hall. 1994. The genetics of colorectal cancer. *Eur J Cancer* **30A**: 1946-56.
- Boise, L.H., M. Gonzalez-Garcia, C.E. Postema, L. Ding, T. Lindsten, L.A. Turka, X. Mao, G. Nunez, and C.B. Thompson. 1993. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* **74**: 597-608.
- Brat, D.J., A.A. Castellano-Sanchez, S.B. Hunter, M. Pecot, C. Cohen, E.H. Hammond, S.N. Devi, B. Kaur, and E.G. Van Meir. 2004. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res* **64**: 920-7.
- Broadus, V.C., T.B. Dansen, K.S. Abayasiriwardana, S.M. Wilson, A.J. Finch, L.B. Swigart, A.E. Hunt, and G.I. Evan. 2005. Bid mediates apoptotic synergy between tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and DNA damage. *J Biol Chem* **280**: 12486-93.
- Brunelle, J.K., E.H. Shroff, H. Perlman, A. Strasser, C.T. Moraes, R.A. Flavell, N.N. Danial, B. Keith, C.B. Thompson, and N.S. Chandel. 2007. Loss of Mcl-1 protein and inhibition of electron transport chain together induce anoxic cell death. *Mol Cell Biol* **27**: 1222-35.
- Burton, E.C. and M.D. Prados. 2000. Malignant gliomas. *Curr Treat Options Oncol* **1**: 459-68.
- Carrington, J.C. and V. Ambros. 2003. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* **301**: 336-8.
- Chamberlain, M.C. 2006. Treatment options for glioblastoma. *Neurosurg Focus* **20**: E2.

- Chen, S., Y. Dai, H. Harada, P. Dent, and S. Grant. 2007. Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation. *Cancer Res* **67**: 782-91.
- Cheng, E.H., T.V. Sheiko, J.K. Fisher, W.J. Craigen, and S.J. Korsmeyer. 2003. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* **301**: 513-7.
- Ciechanover, A. 1994. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* **79**: 13-21.
- . 2005. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Cell Death Differ* **12**: 1178-90.
- Clohessy, J.G., J. Zhuang, J. de Boer, G. Gil-Gomez, and H.J. Brady. 2006. Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **281**: 5750-9.
- Collingridge, D.R., J.M. Piepmeier, S. Rockwell, and J.P. Knisely. 1999. Polarographic measurements of oxygen tension in human glioma and surrounding peritumoural brain tissue. *Radiother Oncol* **53**: 127-31.
- Collins, V.P. 2004. Brain tumours: classification and genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **75 Suppl 2**: ii2-11.
- Concannon, C.G., B.F. Koehler, C. Reimertz, B.M. Murphy, C. Bonner, N. Thurow, M.W. Ward, A. Villunger, A. Strasser, D. Kögel, and J.H. Prehn. 2006. Apoptosis induced by proteasome inhibition in cancer cells: predominant role of the p53/PUMA pathway. *Oncogene*.
- Cory, S. and J.M. Adams. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**: 647-56.
- . 2005. Killing cancer cells by flipping the Bcl-2/Bax switch. *Cancer Cell* **8**: 5-6.
- Cory, S., D.C. Huang, and J.M. Adams. 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* **22**: 8590-607.
- Coultas, L. and A. Strasser. 2003. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol* **13**: 115-23.
- Cretney, E., A. Shanker, H. Yagita, M.J. Smyth, and T.J. Sayers. 2006. TNF-related apoptosis-inducing ligand as a therapeutic agent in autoimmunity and cancer. *Immunol Cell Biol* **84**: 87-98.
- Cretney, E., A.P. Uldrich, S.P. Berzins, A. Strasser, D.I. Godfrey, and M.J. Smyth. 2003. Normal thymocyte negative selection in TRAIL-deficient mice. *J Exp Med* **198**: 491-6.
- Crompton, M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* **341 (Pt 2)**: 233-49.
- Cusack, J.C., Jr., R. Liu, M. Houston, K. Abendroth, P.J. Elliott, J. Adams, and A.S. Baldwin, Jr. 2001. Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition. *Cancer Res* **61**: 3535-40.
- Davis, F.G., S. Freels, J. Grutsch, S. Barlas, and S. Brem. 1998. Survival rates in patients with primary malignant brain tumors stratified by patient age and tumor histological type: an analysis based on Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) data, 1973-1991. *J Neurosurg* **88**: 1-10.
- Davis, R.J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**: 239-52.
- de Vries, E.G., W.T. van der Graaf, F.J. Heijnenbrok, H.J. Hoekstra, and S. de Jong. 2000. Don't blaze the trailblazer TRAIL too early. *Lancet* **356**: 2014.
- Degterev, A., A. Lugovskoy, M. Cardone, B. Mulley, G. Wagner, T. Mitchison, and J. Yuan. 2001. Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL. *Nat Cell Biol* **3**: 173-82.
- DeMartino, G.N. and C.A. Slaughter. 1999. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J Biol Chem* **274**: 22123-6.
- Dodou, K., R.J. Anderson, D.A. Small, and P.W. Groundwater. 2005. Investigations on gossypol: past and present developments. *Expert Opin Investig Drugs* **14**: 1419-34.
- Domina, A.M., J.A. Vrana, M.A. Gregory, S.R. Hann, and R.W. Craig. 2004. MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene* **23**: 5301-15.

- Drexler, H.C. 1997. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 855-60.
- Duiker, E.W., C.H. Mom, S. de Jong, P.H. Willemse, J.A. Gietema, A.G. van der Zee, and E.G. de Vries. 2006. The clinical trail of TRAIL. *Eur J Cancer* **42**: 2233-40.
- Edinger, A.L. and C.B. Thompson. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 663-9.
- Ehrenberg, B., V. Montana, M.D. Wei, J.P. Wuskell, and L.M. Loew. 1988. Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. *Biophys J* **53**: 785-94.
- Emery, J.G., P. McDonnell, M.B. Burke, K.C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E.R. Appelbaum, C. Eichman, R. DiPrinzio, R.A. Dodds, I.E. James, M. Rosenberg, J.C. Lee, and P.R. Young. 1998. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* **273**: 14363-7.
- Evdokiou, A., S. Bouralexis, G.J. Atkins, F. Chai, S. Hay, M. Clayer, and D.M. Findlay. 2002. Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Int J Cancer* **99**: 491-504.
- Fels, C., C. Schafer, B. Huppe, H. Bahn, V. Heidecke, C.M. Kramm, C. Lautenschlager, and N.G. Rainov. 2000. Bcl-2 expression in higher-grade human glioma: a clinical and experimental study. *J Neurooncol* **48**: 207-16.
- Feng, W.Y., F.T. Liu, Y. Patwari, S.G. Agrawal, A.C. Newland, and L. Jia. 2003. BH3-domain mimetic compound BH3I-2' induces rapid damage to the inner mitochondrial membrane prior to the cytochrome c release from mitochondria. *Br J Haematol* **121**: 332-40.
- Fulda, S., E. Meyer, and K.M. Debatin. 2002a. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* **21**: 2283-94.
- Fulda, S., W. Wick, M. Weller, and K.M. Debatin. 2002b. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat Med* **8**: 808-15.
- Ganten, T.M., T.L. Haas, J. Sykora, H. Stahl, M.R. Sprick, S.C. Fas, A. Krueger, M.A. Weigand, A. Grosse-Wilde, W. Stremmel, P.H. Krammer, and H. Walczak. 2004. Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs. *Cell Death Differ* **11 Suppl 1**: S86-96.
- Ganten, T.M., R. Koschny, T.L. Haas, J. Sykora, M. Li-Weber, K. Herzer, and H. Walczak. 2005. Proteasome inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells, but not human hepatocytes, to TRAIL. *Hepatology* **42**: 588-97.
- Gazitt, Y. 1999. TRAIL is a potent inducer of apoptosis in myeloma cells derived from multiple myeloma patients and is not cytotoxic to hematopoietic stem cells. *Leukemia* **13**: 1817-24.
- Glas, R., M. Bogyo, J.S. McMaster, M. Gaczynska, and H.L. Ploegh. 1998. A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function. *Nature* **392**: 618-22.
- Goll, D.E., V.F. Thompson, H. Li, W. Wei, and J. Cong. 2003. The calpain system. *Physiol Rev* **83**: 731-801.
- Green, D.R. and G. Kroemer. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**: 626-9.
- Greijer, A.E. and E. van der Wall. 2004. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* **57**: 1009-14.
- Guyton, K.Z., Q. Xu, and N.J. Holbrook. 1996. Induction of the mammalian stress response gene GADD153 by oxidative stress: role of AP-1 element. *Biochem J* **314 (Pt 2)**: 547-54.
- Hanada, M., K. Sugawara, K. Kaneta, S. Toda, Y. Nishiyama, K. Tomita, H. Yamamoto, M. Konishi, and T. Oki. 1992. Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. *J Antibiot (Tokyo)* **45**: 1746-52.
- Hao, C., F. Beguinot, G. Condorelli, A. Trencia, E.G. Van Meir, V.W. Yong, I.F. Parney, W.H. Roa, and K.C. Petruk. 2001. Induction and intracellular regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) mediated apoptosis in human malignant glioma cells. *Cancer Res* **61**: 1162-70.
- Hegi, M.E., A.C. Diserens, T. Gorlia, M.F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J.M. Kros, J.A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J.E. Bromberg, P. Hau, R.O. Mirimanoff, J.G.

- Cairncross, R.C. Janzer, and R. Stupp. 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* **352**: 997-1003.
- Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-6.
- Hess, J., P. Angel, and M. Schorpp-Kistner. 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* **117**: 5965-73.
- Hideshima, T., D. Chauhan, P. Richardson, C. Mitsiades, N. Mitsiades, T. Hayashi, N. Munshi, L. Dang, A. Castro, V. Palombella, J. Adams, and K.C. Anderson. 2002. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem* **277**: 16639-47.
- Hideshima, T., P. Richardson, D. Chauhan, V.J. Palombella, P.J. Elliott, J. Adams, and K.C. Anderson. 2001. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* **61**: 3071-6.
- Holmquist, G.P. and T. Ashley. 2006. Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution. *Cytogenet Genome Res* **114**: 96-125.
- Hu, W.H., H. Johnson, and H.B. Shu. 1999. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappaB and JNK activation and apoptosis through distinct pathways. *J Biol Chem* **274**: 30603-10.
- Hulleman, E. and K. Helin. 2005. Molecular mechanisms in gliomagenesis. *Adv Cancer Res* **94**: 1-27.
- Hymowitz, S.G., H.W. Christinger, G. Fuh, M. Ultsch, M. O'Connell, R.F. Kelley, A. Ashkenazi, and A.M. de Vos. 1999. Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol Cell* **4**: 563-71.
- Ichikawa, K., W. Liu, L. Zhao, Z. Wang, D. Liu, T. Ohtsuka, H. Zhang, J.D. Mountz, W.J. Koopman, R.P. Kimberly, and T. Zhou. 2001. Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nat Med* **7**: 954-60.
- Ichimura, K., M.B. Bolin, H.M. Goike, E.E. Schmidt, A. Moshref, and V.P. Collins. 2000. Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res* **60**: 417-24.
- Ichimura, K., E.E. Schmidt, H.M. Goike, and V.P. Collins. 1996. Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene* **13**: 1065-72.
- Igney, F.H. and P.H. Krammer. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2**: 277-88.
- Jaattela, M. 2004. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* **23**: 2746-56.
- Jain, R.K. 1988. Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res* **48**: 2641-58.
- Janus, T.J., A.P. Kyritsis, A.D. Forman, and V.A. Levin. 1992. Biology and treatment of gliomas. *Ann Oncol* **3**: 423-33.
- Jazirehi, A.R., C.P. Ng, X.H. Gan, G. Schiller, and B. Bonavida. 2001. Adriamycin sensitizes the adriamycin-resistant 8226/Dox40 human multiple myeloma cells to Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated (TRAIL) apoptosis. *Clin Cancer Res* **7**: 3874-83.
- Jensen, R.L. 2006. Hypoxia in the tumorigenesis of gliomas and as a potential target for therapeutic measures. *Neurosurg Focus* **20**: E24.
- Jiang, Z., X. Zheng, and K.M. Rich. 2003. Down-regulation of Bcl-2 and Bcl-xL expression with bispecific antisense treatment in glioblastoma cell lines induce cell death. *J Neurochem* **84**: 273-81.
- Jo, M., T.H. Kim, D.W. Seol, J.E. Esplen, K. Dorko, T.R. Billiar, and S.C. Strom. 2000. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* **6**: 564-7.
- Kabore, A.F., J. Sun, X. Hu, K. McCrea, J.B. Johnston, and S.B. Gibson. 2006. The TRAIL apoptotic pathway mediates proteasome inhibitor induced apoptosis in primary chronic lymphocytic leukemia cells. *Apoptosis* **11**: 1175-93.
- Kalejta, R.F. and T. Shenk. 2003. Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of the Rb family of tumor suppressors by the human cytomegalovirus pp71 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3263-8.

- Karin, M. and Y. Ben-Neriah. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* **18**: 621-63.
- Keane, M.M., S.A. Ettenberg, M.M. Nau, E.K. Russell, and S. Lipkowitz. 1999. Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res* **59**: 734-41.
- Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-57.
- Kim, J.Y., H.J. Ahn, J.H. Ryu, K. Suk, and J.H. Park. 2004a. BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1 α . *J Exp Med* **199**: 113-24.
- Kim, S., K. Choi, D. Kwon, E.N. Benveniste, and C. Choi. 2004b. Ubiquitin-proteasome pathway as a primary defender against TRAIL-mediated cell death. *Cell Mol Life Sci* **61**: 1075-81.
- Kimberley, F.C. and G.R. Screaton. 2004. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res* **14**: 359-72.
- Kisselev, A.F., T.N. Akopian, V. Castillo, and A.L. Goldberg. 1999. Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Mol Cell* **4**: 395-402.
- Kleihues, P., D.N. Louis, B.W. Scheithauer, L.B. Rorke, G. Reifenberger, P.C. Burger, and W.K. Cavenee. 2002. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**: 215-25; discussion 226-9.
- Kozopas, K.M., T. Yang, H.L. Buchan, P. Zhou, and R.W. Craig. 1993. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3516-20.
- Krajewski, S., M. Krajewska, J. Ehrmann, M. Sikorska, B. Lach, J. Chatten, and J.C. Reed. 1997. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1, and Bax in tumors of central and peripheral nervous system origin. *Am J Pathol* **150**: 805-14.
- Kroemer, G. 1997. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* **3**: 614-20.
- Kroemer, G., W.S. El-Deiry, P. Golstein, M.E. Peter, D. Vaux, P. Vandenabeele, B. Zhivotovsky, M.V. Blagosklonny, W. Malorni, R.A. Knight, M. Piacentini, S. Nagata, and G. Melino. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1463-7.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, and C. Brenner. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* **87**: 99-163.
- Krueger, A., I. Schmitz, S. Baumann, P.H. Krammer, and S. Kirchhoff. 2001. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* **276**: 20633-40.
- La Ferla-Bruhl, K., M.A. Westhoff, S. Karl, H. Kasperczyk, R.M. Zwacka, K.M. Debatin, and S. Fulda. 2007. NF- κ B-independent sensitization of glioblastoma cells for TRAIL-induced apoptosis by proteasome inhibition. *Oncogene* **26**: 571-82.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- Lamhamedi-Cherradi, S.E., S.J. Zheng, K.A. Maguschak, J. Peschon, and Y.H. Chen. 2003. Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL $^{-/-}$ mice. *Nat Immunol* **4**: 255-60.
- Lawrence, D., Z. Shahrokh, S. Marsters, K. Achilles, D. Shih, B. Mounho, K. Hillan, K. Totpal, L. DeForge, P. Schow, J. Hooley, S. Sherwood, R. Pai, S. Leung, L. Khan, B. Gliniak, J. Bussiere, C.A. Smith, S.S. Strom, S. Kelley, J.A. Fox, D. Thomas, and A. Ashkenazi. 2001. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* **7**: 383-5.
- Le Gouill, S., K. Podar, J.L. Harousseau, and K.C. Anderson. 2004. Mcl-1 regulation and its role in multiple myeloma. *Cell Cycle* **3**: 1259-62.
- LeBlanc, H., D. Lawrence, E. Varfolomeev, K. Totpal, J. Morlan, P. Schow, S. Fong, R. Schwall, D. Sinicropi, and A. Ashkenazi. 2002. Tumor-cell resistance to death receptor--induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nat Med* **8**: 274-81.
- LeBlanc, H.N. and A. Ashkenazi. 2003. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* **10**: 66-75.

- Lee, D.H. and A.L. Goldberg. 1998. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* **8**: 397-403.
- Leist, M. and M. Jaattela. 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 589-98.
- Li, H., H. Zhu, C.J. Xu, and J. Yuan. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**: 491-501.
- Li, W., X. Zhang, and A.F. Olumi. 2007. MG-132 sensitizes TRAIL-resistant prostate cancer cells by activating c-Fos/c-Jun heterodimers and repressing c-FLIP(L). *Cancer Res* **67**: 2247-55.
- Lowe, S.W. and C.J. Sherr. 2003. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* **13**: 77-83.
- Luo, J.L., H. Kamata, and M. Karin. 2005. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest* **115**: 2625-32.
- Maher, E.A., F.B. Furnari, R.M. Bachoo, D.H. Rowitch, D.N. Louis, W.K. Cavenee, and R.A. DePinho. 2001. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* **15**: 1311-33.
- Marini, P., S. Denzinger, D. Schiller, S. Kauder, S. Welz, R. Humphreys, P.T. Daniel, V. Jendrossek, W. Budach, and C. Belka. 2006. Combined treatment of colorectal tumours with agonistic TRAIL receptor antibodies HGS-ETR1 and HGS-ETR2 and radiotherapy: enhanced effects in vitro and dose-dependent growth delay in vivo. *Oncogene* **25**: 5145-54.
- Masdehors, P., H. Merle-Beral, K. Maloum, S. Omura, H. Magdelenat, and J. Delic. 2000. Deregulation of the ubiquitin system and p53 proteolysis modify the apoptotic response in B-CLL lymphocytes. *Blood* **96**: 269-74.
- Matsui, K., S. Omura, H. Cui, S.L. Schauer, G.E. Sonenshein, and S.T. Ju. 1997. Proteasome regulation of Fas ligand cytotoxicity. *Eur J Immunol* **27**: 2269-78.
- Meijer, L., A. Borgne, O. Mulner, J.P. Chong, J.J. Blow, N. Inagaki, M. Inagaki, J.G. Delcros, and J.P. Moulinoux. 1997. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* **243**: 527-36.
- Meriin, A.B., V.L. Gabai, J. Yaglom, V.I. Shifrin, and M.Y. Sherman. 1998. Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis. *J Biol Chem* **273**: 6373-9.
- Michiels, C. 2004. Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am J Pathol* **164**: 1875-82.
- Minet, E., G. Michel, D. Mottet, J.P. Piret, A. Barbieux, M. Raes, and C. Michiels. 2001. c-JUN gene induction and AP-1 activity is regulated by a JNK-dependent pathway in hypoxic HepG2 cells. *Exp Cell Res* **265**: 114-24.
- Mitchell, P., D.W. Ellison, and A.D. Mendelow. 2005. Surgery for malignant gliomas: mechanistic reasoning and slippery statistics. *Lancet Neurol* **4**: 413-22.
- Muchmore, S.W., M. Sattler, H. Liang, R.P. Meadows, J.E. Harlan, H.S. Yoon, D. Nettlesheim, B.S. Chang, C.B. Thompson, S.L. Wong, S.L. Ng, and S.W. Fesik. 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**: 335-41.
- Mülhardt, C. 2000. Der Experimentator: Molekularbiologie, 2. Auflage (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg).
- Nitsch, R., I. Bechmann, R.A. Deisz, D. Haas, T.N. Lehmann, U. Wendling, and F. Zipp. 2000. Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet* **356**: 827-8.
- Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi, and N. Tanaka. 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**: 1053-8.
- Ohgaki, H. 2005. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology* **25**: 1-7.
- Ohgaki, H., P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, P.L. Di Patre, C. Burkhard, D. Schuler, N.M. Probst-Hensch, P.C. Maiorka, N. Baeza, P. Pisani, Y. Yonekawa, M.G. Yasargil, U.M. Lutolf, and P. Kleihues. 2004. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* **64**: 6892-9.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues. 2005. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**: 479-89.

- Oppermann, M., C.C. Geilen, L.F. Fecker, B. Gillissen, P.T. Daniel, and J. Eberle. 2005. Caspase-independent induction of apoptosis in human melanoma cells by the proapoptotic Bcl-2-related protein Nbk / Bik. *Oncogene* **24**: 7369-80.
- Palombella, V.J., E.M. Conner, J.W. Fuseler, A. Destree, J.M. Davis, F.S. Laroux, R.E. Wolf, J. Huang, S. Brand, P.J. Elliott, D. Lazarus, T. McCormack, L. Parent, R. Stein, J. Adams, and M.B. Grisham. 1998. Role of the proteasome and NF-kappaB in streptococcal cell wall-induced polyarthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15671-6.
- Panner, A., C.D. James, M.S. Berger, and R.O. Pieper. 2005. mTOR controls FLIPS translation and TRAIL sensitivity in glioblastoma multiforme cells. *Mol Cell Biol* **25**: 8809-23.
- Pitti, R.M., S.A. Marsters, S. Ruppert, C.J. Donahue, A. Moore, and A. Ashkenazi. 1996. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* **271**: 12687-90.
- Puthalakath, H. and A. Strasser. 2002. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ* **9**: 505-12.
- Qin, J.Z., J. Ziffra, L. Stennett, B. Bodner, B.K. Bonish, V. Chaturvedi, F. Bennett, P.M. Pollock, J.M. Trent, M.J. Hendrix, P. Rizzo, L. Miele, and B.J. Nickoloff. 2005. Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res* **65**: 6282-93.
- Rainov, N.G., A. Soling, and V. Heidecke. 2006. Novel therapies for malignant gliomas: a local affair? *Neurosurg Focus* **20**: E9.
- Ramplung, R., G. Cruickshank, A.D. Lewis, S.A. Fitzsimmons, and P. Workman. 1994. Direct measurement of pO₂ distribution and bioreductive enzymes in human malignant brain tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **29**: 427-31.
- Rechsteiner, M. and S.W. Rogers. 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21**: 267-71.
- Reed, J.C. 2002. Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* **1**: 111-21.
- Richardson, P.G., B. Barlogie, J. Berenson, S. Singhal, S. Jagannath, D. Irwin, S.V. Rajkumar, T. Hideshima, H. Xiao, D. Esseltine, D. Schenkein, and K.C. Anderson. 2005. Clinical factors predictive of outcome with bortezomib in patients with relapsed, refractory multiple myeloma. *Blood* **106**: 2977-81.
- Rieger, J., U. Naumann, T. Glaser, A. Ashkenazi, and M. Weller. 1998a. APO2 ligand: a novel lethal weapon against malignant glioma? *FEBS Lett* **427**: 124-8.
- Rieger, L., M. Weller, A. Bornemann, M. Schabet, J. Dichgans, and R. Meyermann. 1998b. BCL-2 family protein expression in human malignant glioma: a clinical-pathological correlative study. *J Neurol Sci* **155**: 68-75.
- Rock, K.L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, and A.L. Goldberg. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**: 761-71.
- Rong, Y., D.L. Durden, E.G. Van Meir, and D.J. Brat. 2006. 'Pseudopalising' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* **65**: 529-39.
- Roth, J., M. Dobbstein, D.A. Freedman, T. Shenk, and A.J. Levine. 1998. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *Embo J* **17**: 554-64.
- Rowinsky, E.K. 2005. Targeted induction of apoptosis in cancer management: the emerging role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor activating agents. *J Clin Oncol* **23**: 9394-407.
- Saikumar, P., Z. Dong, Y. Patel, K. Hall, U. Hopfer, J.M. Weinberg, and M.A. Venkatachalam. 1998a. Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury. *Oncogene* **17**: 3401-15.
- Saikumar, P., Z. Dong, J.M. Weinberg, and M.A. Venkatachalam. 1998b. Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene* **17**: 3341-9.
- Salcman, M. 1990. Malignant glioma management. *Neurosurg Clin N Am* **1**: 49-63.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

- Sayers, T.J., A.D. Brooks, C.Y. Koh, W. Ma, N. Seki, A. Raziuddin, B.R. Blazar, X. Zhang, P.J. Elliott, and W.J. Murphy. 2003. The proteasome inhibitor PS-341 sensitizes neoplastic cells to TRAIL-mediated apoptosis by reducing levels of c-FLIP. *Blood* **102**: 303-10.
- Scaduto, R.C., Jr. and L.W. Grotyohann. 1999. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J* **76**: 469-77.
- Scherer, W.F., J.T. Syverton, and G.O. Gey. 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* **97**: 695-710.
- Schiffer, D., P. Cavalla, A. Dutto, and L. Borsotti. 1997. Cell proliferation and invasion in malignant gliomas. *Anticancer Res* **17**: 61-9.
- Schimmer, A.D., S. Dalili, R.A. Batey, and S.J. Riedl. 2006. Targeting XIAP for the treatment of malignancy. *Cell Death Differ* **13**: 179-88.
- Screaton, G.R., J. Mongkolsapaya, X.N. Xu, A.E. Cowper, A.J. McMichael, and J.I. Bell. 1997. TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr Biol* **7**: 693-6.
- Sedger, L.M., M.B. Glaccum, J.C. Schuh, S.T. Kanaly, E. Williamson, N. Kayagaki, T. Yun, P. Smolak, T. Le, R. Goodwin, and B. Gliniak. 2002. Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. *Eur J Immunol* **32**: 2246-54.
- Semenza, G.L. 2003. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu Rev Med* **54**: 17-28.
- Shah, I.M., K.R. Lees, C.P. Pien, and P.J. Elliott. 2002. Early clinical experience with the novel proteasome inhibitor PS-519. *Br J Clin Pharmacol* **54**: 269-76.
- Shankar, S. and R.K. Srivastava. 2004. Enhancement of therapeutic potential of TRAIL by cancer chemotherapy and irradiation: mechanisms and clinical implications. *Drug Resist Updat* **7**: 139-56.
- Shirley, R.B., I. Kaddour-Djebbar, D.M. Patel, V. Lakshmikanthan, R.W. Lewis, and M.V. Kumar. 2005. Combination of proteasomal inhibitors lactacystin and MG132 induced synergistic apoptosis in prostate cancer cells. *Neoplasia* **7**: 1104-11.
- Shoemaker, A.R., A. Oleksijew, J. Bauch, B.A. Belli, T. Borre, M. Bruncko, T. Deckwirth, D.J. Frost, K. Jarvis, M.K. Joseph, K. Marsh, W. McClellan, H. Nellans, S. Ng, P. Nimmer, M. O'Connor J, T. Oltersdorf, W. Qing, W. Shen, J. Stavropoulos, S.K. Tahir, B. Wang, R. Warner, H. Zhang, S.W. Fesik, S.H. Rosenberg, and S.W. Elmore. 2006. A Small-Molecule Inhibitor of Bcl-XL Potentiates the Activity of Cytotoxic Drugs In vitro and In vivo. *Cancer Res* **66**: 8731-9.
- Siegel, R.M., F.K. Chan, H.J. Chun, and M.J. Lenardo. 2000. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol* **1**: 469-74.
- Slee, E.A., C. Adrain, and S.J. Martin. 1999. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* **6**: 1067-74.
- Sohn, D., G. Totzke, F. Essmann, K. Schulze-Osthoff, B. Levkau, and R.U. Janicke. 2006. The proteasome is required for rapid initiation of death receptor-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **26**: 1967-78.
- Song, J.H., A. Bellail, M.C. Tse, V.W. Yong, and C. Hao. 2006. Human astrocytes are resistant to Fas ligand and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *J Neurosci* **26**: 3299-308.
- Song, J.H., D.K. Song, B. Pyrzynska, K.C. Petruk, E.G. Van Meir, and C. Hao. 2003. TRAIL triggers apoptosis in human malignant glioma cells through extrinsic and intrinsic pathways. *Brain Pathol* **13**: 539-53.
- Srivastava, R.K. 2001. TRAIL/Apo-2L: mechanisms and clinical applications in cancer. *Neoplasia* **3**: 535-46.
- Steinbach, J.P. and M. Weller. 2002. Mechanisms of apoptosis in central nervous system tumors: application to theory. *Curr Neurol Neurosci Rep* **2**: 246-53.
- . 2004. Apoptosis in Gliomas: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. *J Neurooncol* **70**: 247-256.
- Steinbach, J.P., H. Wolburg, A. Klumpp, H. Probst, and M. Weller. 2003. Hypoxia-induced cell death in human malignant glioma cells: energy deprivation promotes decoupling of

- mitochondrial cytochrome c release from caspase processing and necrotic cell death. *Cell Death Differ* **10**: 823-32.
- Steinbach, J.P., H. Wolburg, A. Klumpp, and M. Weller. 2005. Hypoxia sensitizes human malignant glioma cells towards CD95L-induced cell death. *J Neurochem* **92**: 1340-9.
- Stram, Y. and L. Kuzntzova. 2006. Inhibition of viruses by RNA interference. *Virus Genes* **32**: 299-306.
- Stupp, R., W.P. Mason, M.J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M.J. Taphoorn, K. Belanger, A.A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R.C. Janzer, S.K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J.G. Cairncross, E. Eisenhauer, and R.O. Mirimanoff. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352**: 987-96.
- Takimoto, R. and W.S. El-Deiry. 2000. Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene* **19**: 1735-43.
- Thomas, G. 1994. Advances in the genetics and molecular biology of colorectal tumors. *Curr Opin Oncol* **6**: 406-12.
- Thomas, L.R., A. Henson, J.C. Reed, F.R. Salsbury, and A. Thorburn. 2004. Direct binding of Fas-associated death domain (FADD) to the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor DR5 is regulated by the death effector domain of FADD. *J Biol Chem* **279**: 32780-5.
- Thompson, C.B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**: 1456-62.
- Tohma, Y., C. Gratas, E.G. Van Meir, I. Desbaillets, M. Tenan, O. Tachibana, P. Kleihues, and H. Ohgaki. 1998. Necrogenesis and Fas/APO-1 (CD95) expression in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**: 239-45.
- Tsujimoto, Y., E. Jaffe, J. Cossman, J. Gorham, P.C. Nowell, and C.M. Croce. 1985. Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature* **315**: 340-3.
- Ursini-Siegel, J., W. Zhang, A. Altmeyer, E.N. Hatada, R.K. Do, H. Yagita, and S. Chen-Kiang. 2002. TRAIL/Apo-2 ligand induces primary plasma cell apoptosis. *J Immunol* **169**: 5505-13.
- Vajkoczy, P. and M.D. Menger. 2004. Vascular microenvironment in gliomas. *Cancer Treat Res* **117**: 249-62.
- van Delft, M.F., A.H. Wei, K.D. Mason, C.J. Vandenberg, L. Chen, P.E. Czabotar, S.N. Willis, C.L. Scott, C.L. Day, S. Cory, J.M. Adams, A.W. Roberts, and D.C. Huang. 2006. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* **10**: 389-99.
- van den Bent, M.J., M.E. Hegi, and R. Stupp. 2006. Recent developments in the use of chemotherapy in brain tumours. *Eur J Cancer* **42**: 582-8.
- van Noesel, M.M., S. van Bezouw, P.A. Voute, J.G. Herman, R. Pieters, and R. Versteeg. 2003. Clustering of hypermethylated genes in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* **38**: 226-33.
- Vande Velde, C., J. Cizeau, D. Dubik, J. Alimonti, T. Brown, S. Israels, R. Hakem, and A.H. Greenberg. 2000. BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol* **20**: 5454-68.
- Vignati, S., A. Codegioni, F. Polato, and M. Broggin. 2002. Trail activity in human ovarian cancer cells: potentiation of the action of cytotoxic drugs. *Eur J Cancer* **38**: 177-83.
- Wagenknecht, B., T. Glaser, U. Naumann, S. Kugler, S. Isenmann, M. Bahr, R. Korneluk, P. Liston, and M. Weller. 1999a. Expression and biological activity of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) in human malignant glioma. *Cell Death Differ* **6**: 370-6.
- Wagenknecht, B., M. Hermisson, K. Eitel, and M. Weller. 1999b. Proteasome inhibitors induce p53/p21-independent apoptosis in human glioma cells. *Cell Physiol Biochem* **9**: 117-25.
- Walczak, H. and P.H. Krammer. 2000. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* **256**: 58-66.
- Wang, E.W., B.M. Kessler, A. Borodovsky, B.F. Cravatt, M. Bogyo, H.L. Ploegh, and R. Glas. 2000a. Integration of the ubiquitin-proteasome pathway with a cytosolic oligopeptidase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9990-5.

- Wang, J.L., D. Liu, Z.J. Zhang, S. Shan, X. Han, S.M. Srinivasula, C.M. Croce, E.S. Alnemri, and Z. Huang. 2000b. Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7124-9.
- Weinmann, M., V. Jendrossek, D. Guner, B. Goecke, and C. Belka. 2004. Cyclic exposure to hypoxia and reoxygenation selects for tumor cells with defects in mitochondrial apoptotic pathways. *Faseb J* **18**: 1906-8.
- Wendt, J., C. von Haefen, P. Hemmati, C. Belka, B. Dorken, and P.T. Daniel. 2005. TRAIL sensitizes for ionizing irradiation-induced apoptosis through an entirely Bax-dependent mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* **24**: 4052-64.
- Wiechelman, K.J., R.D. Braun, and J.D. Fitzpatrick. 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* **175**: 231-7.
- Wiley, S.R., K. Schooley, P.J. Smolak, W.S. Din, C.P. Huang, J.K. Nicholl, G.R. Sutherland, T.D. Smith, C. Rauch, C.A. Smith, and et al. 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **3**: 673-82.
- Wu, G.S., T.F. Burns, Y. Zhan, E.S. Alnemri, and W.S. El-Deiry. 1999. Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor. *Cancer Res* **59**: 2770-5.
- Yamada, H., S. Tada-Oikawa, A. Uchida, and S. Kawanishi. 1999. TRAIL causes cleavage of bid by caspase-8 and loss of mitochondrial membrane potential resulting in apoptosis in BJAB cells. *Biochem Biophys Res Commun* **265**: 130-3.
- Yamaguchi, H. and H.G. Wang. 2004. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem* **279**: 45495-502.
- Yin, D., H. Zhou, T. Kumagai, G. Liu, J.M. Ong, K.L. Black, and H.P. Koeffler. 2005. Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM). *Oncogene* **24**: 344-54.
- Yoshida, T., T. Shiraiishi, S. Nakata, M. Horinaka, M. Wakada, Y. Mizutani, T. Miki, and T. Sakai. 2005. Proteasome inhibitor MG132 induces death receptor 5 through CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein. *Cancer Res* **65**: 5662-7.
- Yu, J. and L. Zhang. 2003. No PUMA, no death: implications for p53-dependent apoptosis. *Cancer Cell* **4**: 248-9.
- Zamai, L., P. Secchiero, S. Pierpaoli, A. Bassini, S. Papa, E.S. Alnemri, L. Guidotti, M. Vitale, and G. Zauli. 2000. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis. *Blood* **95**: 3716-24.
- Zamzami, N. and G. Kroemer. 2001. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 67-71.
- Zamzami, N., P. Marchetti, M. Castedo, D. Decaudin, A. Macho, T. Hirsch, S.A. Susin, P.X. Petit, B. Mignotte, and G. Kroemer. 1995. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* **182**: 367-77.
- Zamzami, N., S.A. Susin, P. Marchetti, T. Hirsch, I. Gomez-Monterrey, M. Castedo, and G. Kroemer. 1996. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* **183**: 1533-44.
- Zhang, H.G., J. Wang, X. Yang, H.C. Hsu, and J.D. Mountz. 2004. Regulation of apoptosis proteins in cancer cells by ubiquitin. *Oncogene* **23**: 2009-15.
- Zhong, H., A.M. De Marzo, E. Laughner, M. Lim, D.A. Hilton, D. Zagzag, P. Buechler, W.B. Isaacs, G.L. Semenza, and J.W. Simons. 1999. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* **59**: 5830-5.
- Zou, H., Y. Li, X. Liu, and X. Wang. 1999. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* **274**: 11549-56.
- Zundel, W., C. Schindler, D. Haas-Kogan, A. Koong, F. Kaper, E. Chen, A.R. Gottschalk, H.E. Ryan, R.S. Johnson, A.B. Jefferson, D. Stokoe, and A.J. Giaccia. 2000. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* **14**: 391-6.

9 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
A	Ampère
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
AIF	Apoptosis inducing Factor
AP-1	Aktivierendes Protein-1
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	Bcl-2 antagonist/killer
Bax	Bcl-assoziertes x-Protein
BCA	Bichinonsäure
Bcl-2	B-Cell Lymphoma-2
Bcl-xL	Bcl-extra long
BH	Bcl-2-Homologie
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bnip3	BCL-2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	Circa
Caspase	Cysteinyln-aspartat-spezifische Protease
cDNA	komplementäre DNA
CHOP	C/EBP homologes Protein
Cyt c	Cytochrom c
d	Tag
Da	Dalton
DcR1/2	Decoy-Rezeptor 1/2
DEAE	Diethylaminoethyl
DEVD	Tetrapeptid: Asp-Glu-Val-Asp
DFZ	Durchflusszytometrie
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DR4/5	Death Receptor 4/5
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylentetraminessigsäure
<i>et al.</i>	et alteri (und andere)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	Fas-associated Death Domain
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLIP	Fas-like interleukin 1-converting enzyme-Inhibitorisches Protein
FLUOS	5(6)-Carboxy-fluorescein-N-hydroxysuccinimidester
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	N-(2-Hydroxyethylen)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie induzierbarer Faktor
HRP	Meerrettich Peroxidase

IgG	Immunglobulin G
IL-8	Interleukin-8
I κ B	Inhibitor of κ B
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
kDa	Kilodalton
Kon	Kontrolle
L	Liter
M	Molar
M	Marker
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mcl-1	Myeloid-cell-leukemia 1
mg	Milligramm
MGMT	Methylguanin-methyl-Transferase
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger RNA
MZ-	Mainz-
NaCl	Natriumchlorid
Neg. Kon	Negativ-Kontrolle
NF- κ B	Nukleärer Faktor- κ B
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OD ₂₈₀	optische Dichte bei 280 nm
P-	phosphoryliert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	potentia hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration)
Phospho-	phosphoryliert
PI	Propidiumiodid
PI3	Phosphoinositol 3
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rosling Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse Transkription mit Polymerase-Kettenreaktion
scr	scrambled
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
siRNA	Small Interfering RNAs
Smac/DIABLO	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low pI
STS	Staurosporin
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMRM	Tetramethylrhodaminmethylester
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TRE	TPA-responsives Element
U	Unit(s)
u.a.	unter anderem
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vgl.	vergleiche
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
XIAP	x-linkend Inhibitor of Apoptosis Protein
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotential
γ -IR	Gamma-Bestrahlung

Anhang

Tabelle A.1: Auflistung der Epoxomicin-regulierten Gene, die mittels Oligo GEMArray-Analyse in U87 Zellen identifiziert wurden. „Position“ gibt die Position des Oligonukleotid-Tetraspots auf der Array-Membran wieder, „RefSeq Nummer“ die NCBI Reference Sequence project Katalognummer des Gens. „Gruppe 2“ ist das Expressionsniveau des Gens nach Epoxomicin-Behandlung und Normalisierung, „Gruppe 1“ nach Kontrollbehandlung und Normalisierung. Der Quotient aus Gruppe 2 und Gruppe 1 gibt Auskunft über das Maß der Genregulierung. In der Auswertung wurden nur solche Gene berücksichtigt, deren Expression nach Behandlung mit Epoxomicin nachweisbar war. Als hochreguliert (+) eingestuft wurde ein Gen, wenn der Quotient aus Gruppe 2 und Gruppe 1 nach Kontrollbehandlung größer als 1,1 war. Als herunterreguliert (-), wenn dieser Quotient kleiner als 0,9 war und als nicht-reguliert (=), wenn der Quotient zwischen 0,9 und 1,1 lag. Die gezeigten Daten sind Ergebnisse eines repräsentativen Experiments. Ähnliche Ergebnisse wurden in zwei weiteren unabhängigen Experimenten erzielt. ¹, Daten der Gruppen 1 und 2 ursprünglich von der Software GEMArray Expression Analysis Suite als „nicht vorhanden“ von der Auswertung ausgeschlossen. ², Daten der Gruppe 1 von der Software ursprünglich falsch-positiv interpretiert.

Position	RefSeq Nummer	Gen-Name	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2/Gruppe 1	+/-
67	NM_001924	GADD45A	1,071	0,091	11,76	+
18	NM_015367	BCL2L13	0,512	0,229	2,24	+
35	NM_004331	BNIP3L/NIX	0,598	0,283	2,11	+
52	NM_001225	CASP4	0,487	0,260	1,88	+
9	NM_001188	BAK1	0,261	0,156	1,67	+
66	NM_003824	FADD	0,269	0,162	1,66	+
25	NM_001166	BIRC2/cIAP	0,336	0,208	1,62	+
77	NM_003821	RIPK2	0,428	0,299	1,43	+
108	NM_003789	TRADD	0,642	0,463	1,39	+
22	NM_001196	BID	0,866	0,686	1,26	+
80	NM_003842	TNFRSF10B/DR5	1,097	0,899	1,22	+
73	NM_021960	MCL-1	1,001	0,842	1,19	+
50	NM_032982	CASP2	0,355	0,310	1,15	+
2	NM_005157	ABL1	0,229	0,207	1,10	+
7	NM_004281	BAG3 ²	1,069	0,000	k.A.	+
20	NM_014739	BCLAF1 ^{1,2}	0,084	0,000	k.A.	+
33	NM_004330	BNIP2 ^{1,2}	0,130	0,000	k.A.	+
55	NM_001227	CASP7 ^{1,2}	0,070	0,000	k.A.	+
57	NM_001229	CASP9 ^{1,2}	0,106	0,000	k.A.	+
74	NM_003946	NOL3 ^{1,2}	0,124	0,000	k.A.	+
90	NM_003790	TNFRSF25/APO3 ^{1,2}	0,144	0,000	k.A.	+
105	NM_005426	TP53BP2 ^{1,2}	0,129	0,000	k.A.	+
3	NM_005163	AKT1	0,290	0,274	1,06	=
34	NM_004052	BNIP3	1,140	1,120	1,02	=
87	NM_001065	TNFRSF1A	0,439	0,445	0,99	=
84	NM_016639	TNFRSF12A/TWEAKR	0,814	0,835	0,98	=
14	NM_138578	BCL2L1/BCL-XL	0,128	0,134	0,95	=
112	NM_004295	TRAF4 ¹	0,060	0,074	0,81	-
101	NM_001252	TNFSF7 ¹	0,073	0,090	0,81	-
88	NM_001066	TNFRSF1B	0,346	0,503	0,69	-
28	NM_001168	BIRC5	0,570	0,901	0,63	-
38	NM_014550	CARD10 ¹	0,059	0,190	0,31	-
17	NM_052842	BCL2L12 ¹	0,129	0,261	0,49	-

Tabelle A.2: Auflistung der Epoxomicin-regulierten Gene, die mittels Oligo GEMArray-Analyse in U373 Zellen identifiziert wurden. Zur Erklärung siehe Tabelle A.1.

Position	RefSeq Nummer	Gen-Name	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2/Gruppe 1	+/-
67	NM_001924	GADD45A	0,537	0,142	3,772	+
7	NM_004281	BAG3	0,991	0,520	1,904	+
6	NM_004323	BAG1	0,136	0,076	1,795	+
55	NM_001227	CASP7	0,261	0,149	1,759	+
22	NM_001196	BID	0,760	0,561	1,353	+
77	NM_003821	RIPK2	0,442	0,328	1,346	+
105	NM_005426	TP53BP2 ¹	0,055	0,044	1,255	+
52	NM_001225	CASP4	0,509	0,414	1,231	+
2	NM_005157	ABL1	0,608	0,522	1,163	+
80	NM_003842	TNFRSF10B/DR5	0,998	0,865	1,154	+
64	NM_004401	DFFA ²	0,142	0,000	k.A.	+
109	NM_005658	TRAF1 ¹	0,045	0,047	0,950	=
20	NM_014739	BCLAF1	0,222	0,238	0,933	=
25	NM_001166	BIRC2/cIAP	0,425	0,464	0,916	=
33	NM_004330	BNIP2	0,110	0,124	0,885	-
18	NM_015367	BCL2L13	0,340	0,408	0,834	-
14	NM_138578	BCL2L1/BCL-XL	0,117	0,150	0,777	-
9	NM_001188	BAK1	0,331	0,438	0,755	-
50	NM_032982	CASP2	0,687	0,934	0,735	-
3	NM_005163	AKT1	0,456	0,621	0,734	-
73	NM_021960	MCL-1	0,596	0,830	0,718	-
28	NM_001168	BIRC5	0,817	1,158	0,705	-
84	NM_016639	TNFRSF12A	0,512	0,739	0,693	-
34	NM_004052	BNIP3	0,953	1,387	0,687	-
108	NM_003789	TRADD	0,401	0,646	0,621	-
101	NM_001252	TNFSF7	0,437	0,747	0,585	-
72	NM_002342	LTBR	0,123	0,222	0,552	-
87	NM_001065	TNFRSF1A	0,450	0,838	0,536	-
112	NM_004295	TRAF4 ¹	0,055	0,109	0,500	-
17	NM_052842	BCL2L12	0,269	0,616	0,436	-
63	NM_014326	DAPK2 ¹	0,037	0,094	0,392	-
104	NM_000546	TP53	0,112	0,290	0,384	-
74	NM_003946	NOL3	0,069	0,188	0,365	-
35	NM_004331	BNIP3L/NIX	0,190	0,738	0,257	-
66	NM_003824	FADD	0,039	0,238	0,163	-
57	NM_001229	CASP9	0,021	0,283	0,075	-
61	NM_003805	CRADD	0,026	0,376	0,068	-

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Holger Hetschko
Geburtsdatum/-ort: 11.08.1977 in Frankfurt am Main
Familienstand: Ledig
Mutter: Hiltrud Hetschko, geb. Rickart
Vater: Manfred Hetschko

Schulbildung

1983 bis 1987 Adolf Reichweich-Schule in Rodenbach
1987 bis 1996 Gymnasium der Kopernikus-Schule in Freigericht, Abitur 1996

Zivildienst

1996 bis 1997 Häusliche Behindertenpflege und mobiler sozialer Hilfsdienst,
Selbsthilfe Körperbehinderter e.V. und Ev. Kirche in Erlensee

Berufsausbildung

1997 bis 1999 Gärtner, Fachrichtung Zierpflanzenbau
Gartenbau Strutt in Rodenbach, Abschlussprüfung 1999

Studium

1999 bis 2004 Biologie an der Technischen Universität Darmstadt
02.09.2004 Diplom, Note: „mit Auszeichnung“
Januar bis September 2004 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Genetik
im Labor von Herrn Priv. Doz. Dr. Kletzin mit dem Thema:
„Reinigung und spektroskopische Charakterisierung des
Hydrogenase/Schwefelreduktase Komplexes aus anaerob
gewachsenem *Acidianus ambivalens*“

Promotionsstudiengang

seit September 2004 Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in
Frankfurt. Anfertigung der Dissertation in der Abteilung
„Experimentelle Neurochirurgie“ des Universitätsklinikums
Frankfurt unter Leitung von Herrn Priv. Doz. Dr. Kögel

.....
(Datum, Unterschrift)

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Damen und Herren:

Buschinger, Dancker, Dencher, Friedel, Gassen, Giersch, Göringer, Holstein, Kletzin, Kluge, Kober, Nixdorff, Langner, Layer, Lindner, Lüttge, Pfeifer, Wollenweber

Originalarbeiten

Kögel, D., B. Svensson, E. Copanaki, S. Anguissola, C. Bonner, N. Thurow, D. Gudorf, H. Hetschko, T. Muller, M. Peters, H.G. König, and J.H. Prehn. 2006. Induction of transcription factor CEBP homology protein mediates hypoglycaemia-induced necrotic cell death in human neuroblastoma cells. *J Neurochem* **99**: 952-64.

Eingereichte Manuskripte und Manuskripte in Vorbereitung

Hetschko, H., V. Voss, S. Horn, V. Seifert, J.H. Prehn, and D. Kögel. Pharmacological inhibition of Bcl-2 family members reactivates TRAIL-induced apoptosis in malignant glioma. *J Neurooncol.* Manuskript angenommen.

Hetschko, H., V. Voss, J.H. Prehn, and D. Kögel. Upregulation of DR5 by proteasome inhibitors potently sensitizes glioma cells to TRAIL-induced apoptosis. Manuskript in Revision.

Hetschko, H., V. Voss, J.H. Prehn, and D. Kögel. BH3 mimetics reactivate caspase-independent cell death in anoxia-resistant malignant glioma cells. Manuskript in Vorbereitung.

Postervorträge und Abstracts

Hetschko, H., R. Gerlach, S. Horn, and D. Kögel. Investigating the role of Bnip3 and Bnip3L/Nix in resistance of glioblastoma cells against hypoxia-induced apoptosis. Postervortrag. Meeting of the European Cell Death Organisation, Budapest, Ungarn, September 2005/Konferenz der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, Wiesbaden, September 2005

Hetschko, H., V. Voss, J. Masri, J. Weissenberger, S. Horn, D. Kögel. Target-specific reactivation of apoptosis pathways in malignant glioma. Postervortrag. Meeting of the European Association for NeuroOncology, Wien, September 2006

Hetschko, H., J. Masri, J. Weissenberger, D. Kögel. Proteasome inhibitors reactivate TRAIL-induced apoptosis in malignant glioma. Postervortrag. Meeting of the European Cell Death Organisation, Chia, Sardinien, Italien, September 2006

Danksagung

Herrn Priv. Doz. Dr. Donat Kögel danke ich für die Bereitstellung des überaus interessanten Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Doktorarbeit.

Frau Dr. Horn und Frau Herr danke ich für die freundliche Bereitstellung von Glioblastomzelllinien.

Herrn Prof. Dr. Eberlein und Herrn Moog danke ich für die Unterstützung bei den Gammastrahlen-Experimenten.

Steffi Böttner, Katerina Copanaki, Rashid El Idrissi, Amin Hashemi, Joumana Masri, Maja Teklic, Nadia Thurow und Dr. Jakob Weissenberger danke ich für die tolle Zusammenarbeit, anregende Diskussionen und die angenehme, freundschaftliche Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Labors. Valerie Voss möchte ich zudem für das äußerst fruchtbare Teamwork im Labor danken. Ein herzliches Dankeschön geht an Hildegard Schweers für ihre stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor.

Für die Durchsicht dieser Arbeit danke ich Steffi Böttner, Alexander Cichonczyk und Andreas Veith.

Ein herzlicher Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Zimmermann und Herrn Priv. Doz. Dr. Laube für die Begutachtung der Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Freundin Feh Reichl für ihr stets offenes Ohr und ihre liebevolle Unterstützung bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich während meines Studiums und der Promotionszeit sehr großzügig unterstützt haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.