

DIE ROLLE VON BCL-2 FAMILIENMITGLIEDERN  
FÜR DIE ZELLTOD-RESISTENZ VON MALIGNEN GLIOMEN

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER NATURWISSENSCHAFTEN

DOCTOR PHILOSOPHIAE NATURALIS  
(DR. PHIL. NAT)

VORGELEGT

BEIM

FACHBEREICH BIOLOGIE  
DER J. W. GOETHE UNIVERSITÄT  
IN FRANKFURT AM MAIN

VON

DIPL. BIOL. VALERIE VOSS

\*11.08.1981 DARMSTADT

FRANKFURT

2010

(D30)

Vom Fachbereich Biologie der  
J. W. Goethe Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. A. Starzinski-Powitz

Gutachter: Priv. Doz. Dr. Donat Kögel  
Prof. Beatrix Süß

Datum der Disputation:

MEINEN ELTERN

TEILE DIESER ARBEIT WURDEN IN FOLGENDEN PUBLIKATIONEN VERÖFFENTLICHT

- 2008 Hetschko\*, H., Voss\*, V., Senft, C., Seifert, V., Prehn, J. H., and Kögel, D. (2008). BH3 mimetics reactivate autophagic cell death in anoxia-resistant malignant glioma cells. *Neoplasia* *10*, 873-885. (\*geteilte Erstautorenschaft)
- 2010 Voss, V., Senft, C., Lang, V., Ronellenfitsch, M. W., Steinbach, J. P., Seifert, V., and Kögel, D. (2010). The Pan-Bcl-2 Inhibitor (-)-Gossypol Triggers Autophagic Cell Death in Malignant Glioma. *Mol Cancer Res.*

# INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG.....	6
1.1	ZELLTODMECHANISMEN: APOPTOSE, NEKROSE UND AUTOPHAGIE.....	6
1.2	CASPASEN UND DIE ZWEI HAUPTSIGNALWEGE DER APOPTOSE.....	7
1.3	APOPTOTISCHE SIGNALWEGE UNTER KONTROLLE DER BCL-2-GENFAMILIE.....	10
1.4	TUMOREN DES ZENTRALEN NERVENSYSTEMS.....	13
1.5	TUMORENTSTEHUNG UND MOLEKULARE URSACHEN DER APOPTOSE-RESISTENZ IN GLIOMEN...16	
1.6	PHYSIOLOGISCHE UND PATHOPHYSIOLOGISCHE RELEVANZ DER AUTOPHAGIE.....	19
1.7	MOLEKULARE MECHANISMEN DER AUTOPHAGIE.....	21
1.8	AUTOPHAGIE UND MÖGLICHE STRATEGIEN DER THERAPEUTISCHEN INTERVENTION.....	25
II	ZIELSETZUNG.....	28
III	MATERIAL.....	29
3.1	ZELLINIEN.....	29
3.2	ANTIKÖRPER.....	29
3.3	PLASMIDE.....	30
3.4	BAKTERIENSTAMM.....	30
3.5	OLIGONUKLEOTIDE.....	31
3.6	LENTIVIRALE TRANSDUKTIONS PARTIKEL.....	31
3.7	ZELLKULTURMEDIEN.....	32
3.8	SUBSTANZEN.....	32
3.9	KITS.....	34
3.10	FLUORESCENZFARBSTOFFE.....	35
3.11	GERÄTE.....	35
3.12	ZUSAMMENSETZUNG: PUFFER, NÄHRMEDIEN & STAMMLÖSUNGEN.....	37
3.13	SOFTWARE.....	40
IV	METHODEN.....	41
4.1	KULTIVIERUNG VON ZELLEN, ALLGEMEIN.....	41
4.2	PRÄPARATION AUS RATTEN STAMMENDER ASTROZYTEN.....	41
4.3	KULTIVIERUNG VON GLIOMZELLINIEN UND AUS RATTEN STAMMENDEN ASTROZYTEN.....	41
4.4	SUBKULTIVIERUNG ADHÄRENT WACHSENDER GLIOMZELLINIEN UND ASTROZYTEN.....	42
4.5	KULTIVIERUNG VON STABIL TRANSFIZIERTEN BZW. TRANSDUZIERTEN GLIOMZELLINIEN.....	42
4.6	BESTIMMUNG DER ZELLZAHL.....	42
4.7	EINFRIEREN VON ZELLEN (KRYOKONSERVIERUNG).....	42
4.8	AUFTAUEN VON ZELLEN.....	43
4.9	BESCHICHTUNG VON KULTURGEFÄßEN.....	43
4.10	MYKOPLASMENTEST.....	43
4.11	NUKLEINSÄURE METHODIKEN.....	44
4.11.1	PLASMIDPRÄPARATION (TRANSFORMATION).....	44

---

4.11.2 KULTIVIERUNG DER BAKTERIEN UND ISOLATION DER PLASMID-DNA.....	44
4.11.3 BESTIMMUNG DER REINHIT UND KONZENTRATION AN PLASMID-DNA.....	44
4.12 INTEGRATION VON PLASMID-DNA MITTELS KATIONISCHER LIPIDE (TRANSFEKTION) .....	45
4.13 SUBKLONIERUNG VON TRANSFIZIERTEN ZELLEN.....	45
4.14 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODIKEN.....	46
4.14.1 GESAMTZELLEXTRAKTION .....	46
4.14.2 PROTEINGEHALTSBESTIMMUNG VON GESAMTZELLEXTRAKTEN .....	46
4.14.3 DISKONTINUIERLICHE SDS-PAGE.....	46
4.14.4 WESTERN BLOT (TRANSFER AUF NITROCELLULOSEMAMBRAN).....	47
4.14.5 COOMASSIE-FÄRBUNG UND TROCKNUNG VON PROTEINGELEN.....	47
4.14.6 WESTERN-BLOT-IMMUNDETEKTION (IMMUNOBLOT).....	47
4.14.7 SIGNALDETEKTION MITTLES ECL-SYSTEM.....	48
4.14.8 „STRIPPING“ VON NITROCELLULOSEMAMBRANEN.....	48
4.15 IMMUNFLUORESZENZANALYSE .....	48
4.15.1 FIXIERUNG DER ZELLEN.....	48
4.16 ZELLVIABILITÄTSMESSUNG (MITT-ASSAY).....	49
4.17 IN VITRO-ANOXIEMODELL.....	50
4.18 CASPASE-3-AKTIVITÄTSMESSUNG .....	50
4.19 DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....	51
4.19.1 HINTERGRUND .....	51
4.19.2 ANNEXIN-V-FLUOS/PROPIDIUMIODID-DOPPELFÄRBUNG .....	51
4.19.3 TMRM-FÄRBUNG .....	53
4.19.4 LYSOTRACKER-RED-DND-99-FÄRBUNG .....	54
4.20 TRANSFEKTION EUKARYOTISCHER ZELLEN MIT siRNA .....	55
4.21 LENTIVIRALE TRANSDUKTION MITTELS shRNA.....	56
4.22 STATISTIK.....	57
V ERGEBNISSE .....	58
5.1 ERHÖHTE EXPRESSIONSLEVEL ANTI-APOPTOTISCHER BCL-2-FAMILIEN-MITGLIEDER: KORRELATION MIT DER RESISTENZ GEGENÜBER ANOXIE .....	58
5.2 SPEZIFISCHE INHIBITION VON BCL-2-ÄHNLICHEN PROTEINEN .....	60
5.3 INHIBITION ALLER BCL-2-ÄHNLICHER PROTEINE ZUR EFFIZIENTEN SENSITIVIERUNG VON GLIOMZELLEN .....	61
5.4 ANALYSE DER MÖGLICHEN TOXISCHEN EFFEKTE VON GOSSYPOL IN NICHT-TRANSFORMIERTEN ZELLEN.....	64
5.5 GOSSYPOL INDUZIERT EINEN CASPASE-UNABHÄNGIGEN ZELLTOD IN GLIOMZELLEN.....	65
5.6 AKTIVIERUNG DES PRO-APOPTOTISCHEN BCL-2 FAMILIENMITGLIEDES BAX NACH GOSSYPOL- BEHANDLUNG.....	66
5.7 MCL-1 SPIELT EINE WICHTIGE ROLLE FÜR DIE ZELLTODRESISTENZ VON GLIOMZELLINIEN .....	68

---

5.8 GOSSYPOL INDUZIERT EINEN NICHT-APOPTOTISCHEN, AUTOPHAGISCHEN ZELLTOD IN GLIOMZELLEN .....	71
5.9 LYSOSOMALE AKTIVIERUNG NACH GOSSYPOL-BEHANDLUNG.....	73
5.10 KOMBINATIONSBEHANDLUNGEN VON GOSSYPOL MIT KONVENTIONELLEN THERAPIEN .....	74
5.11 TEMOZOLOMID FÖRDERT DEN NICHT-APOPTOTISCHEN, CASPASE-UNABHÄNGIGEN ZELLTOD IN MGMT-NEGATIVEN GLIOMZELLEN.....	77
5.12 MITOCHONDRIALE DYSFUNKTION NACH KOMBINATIONSBEHANDLUNG MIT GOSSYPOL UND TMZ .....	81
5.13 THERAPEUTISCHE EFFEKTE VON mTOR-INHIBITOREN .....	85
5.14 RNA-INTERFERENZ GEGEN mTOR.....	87
5.15 AUSWIRKUNGEN DER mTOR INHIBITION AUF DIE MITOCHONDRIALE FUNKTION .....	90
5.16 DIE INDUKTION DES AUTOPHAGISCHEN ZELLTODES DURCH GOSSYPOL KANN IN GLIOMZELLEN DURCH DEPLETION VON BECLIN1 UND ATG5 AUFGEHOVEN WERDEN.....	92
5.17 DER GOSSYPOL-INDUZIERTE ZELLTOD IST DURCH EINEN INTAKTEN AUTOPHAGISCHEN FLUX GEKENNZEICHNET.....	96
VI DISKUSSION .....	102
VII ZUSAMMENFASSUNG .....	110
VIII LITERATURVERZEICHNIS .....	112
VIII ANHANG .....	122
PLASMIDKARTEN .....	122
9.1 TANDEM PLASMID: MRFP-EGFP/TFLC3 .....	122
9.2 PLASMID: TOPO-MCL-1 .....	123
9.3 PLASMID: EGFP-LC3.....	124
X ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	125
XI LEBENS LAUF .....	129
11.1 AKADEMISCHE LEHRER.....	130
11.2 PUBLIKATIONSLISTE.....	130
11.3 KONGRESSBEITRÄGE .....	131
11.3.1 POSTERPRÄSENTATIONEN .....	131
XII DANKSAGUNG.....	133

# I EINLEITUNG

## 1.1 ZELLTODMECHANISMEN: APOPTOSE, NEKROSE UND AUTOPHAGIE

Streng regulierte Mechanismen zur schnellen, selektiven Entfernung beschädigter, fehlentwickelter aber auch potentiell schädigender Zellen, stehen dem gesamten Organismus zur Verfügung (Kerr et al., 1972; Ellis et al., 1991; Jacobson et al., 1997b; Pettmann und Henderson, 1998; Broker et al., 2005). Grundsätzlich muss zwischen programmierten, reguliert ablaufenden Prozessen und passiven Formen des Zelltodes (Nekrose) unterschieden werden. Zusätzlich wird der programmierte Zelltod anhand seiner morphologischen und biochemischen Merkmale in bestimmte Subklassen unterteilt. Die Apoptose (Typ I Zelltod) stellt neben dem autophagischen Zelltod (Typ II-Zelltod) und der programmierten Nekrose („Nekroptose“) eine Hauptform des programmierten Zelltodes dar (Kerr et al., 1972; Majno und Joris, 1995; Leist und Jaattela, 2001; Jaattela, 2004; Kroemer und Martin, 2005; Tait und Green, 2008). Das wesentliche Kriterium für den programmierten Zelltod ist die Beteiligung zellulärer, aktiver Prozesse, die in letzter Konsequenz zum Zelluntergang führen (Jaattela, 2002, 2004). Anfänglich wurde in der Literatur lediglich der nekrotische dem apoptotischen Zelltod gegenübergestellt. Es zeigte sich aber, dass beide Prozesse nur zwei Enden des Spektrums darstellen, die wiederum miteinander in Abhängigkeit bzw. Beziehung stehen können (Galluzzi und Kroemer, 2008). Der nekrotische Zelltod tritt z.B. bei chemischer-, mechanischer Verletzung oder bei einer Unterversorgung mit Blut (Ischämie) bzw. Sauerstoff (Hypoxie) auf. Er wird durch ein Anschwellen des Zellkörpers (Onkose) und beschädigter und zerstörter Organellen und Membranen charakterisiert, wobei letztendlich der gesamte Inhalt der Zelle in den Extrazellularraum entleert wird (Degterev und Yuan, 2008), was infolgedessen zu einer Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes führt (Fink und Cookson, 2005). Im Gegensatz zur Nekrose wird die Apoptose durch die Integrität der Zellmembran, Ausstülpungen der Zelle (Zeiöse) bis hin zur Phagozytose charakterisiert (Degterev und Yuan, 2008). Im Verlauf der Apoptose kondensiert das Chromatin (Kroemer et al., 2005), es werden exozytotisch Membranvesikel von der Plasmamembran abgeschnürt, die Fragmente und Teile des Kerns beinhalten. Diese apoptotischen Körperchen stellen ein morphologisches Charakteristikum dar und erlauben *in vivo* Nachbarzellen bzw. Makrophagen die Überreste der Zelle aufzunehmen und weiterzuverwerten, ohne dass diese in den extrazellulären Raum gelangen (Mohamed et al., 2004). Biochemische Prozesse, die während der Apoptose ablaufen, sind die Aktivierung von Endonukleasen, DNA-Degradierung und die Aktivierung von Cysteinproteinasen (Caspasen).

## 1.2 CASPASEN UND DIE ZWEI HAUPTSIGNALWEGE DER APOPTOSE

Caspasen unterliegen der Familie der Aspartat-spezifischen Cystein-Proteasen, die für die Aktivierung der Apoptose essentiell sind. Die bekanntesten Caspasen gehören zu der Gruppe der inflammatorischen Caspasen, den Initiator- und Effektor-Caspasen (Lavrik et al., 2005). Die Initiator- und Effektor-Caspasen, wie Casapse-1, -4, -5, -11, -12 und -14 zählen zu den Caspasen, die hauptsächlich an proteolytischen Prozessen von Zytokinen bei Entzündungsprozessen beteiligt sind (Denault und Salvesen, 2002). Caspase-4 und -12 sind unter anderem auch bei dem ER-Stress induzierten Zelltod beteiligt. Die Caspasen, die hauptsächlich bei der Exekution der Apoptose eine bedeutende Rolle spielen, sind die Effektor-Caspasen, Caspase -3, -6 und -7 (Kroemer et al., 2007). Caspasen werden in Form von katalytisch inaktiven Proenzymen synthetisiert und durch proteolytische Spaltung aktiviert.

Darüber hinaus können Caspasen auch inhibiert werden. Onkogene der Familie, deren Mitglieder als IAPs (engl.: Inhibitor of Apoptosis) bezeichnet werden, wirken als physiologische, endogene Caspaseinhibitoren (Richter und Duckett, 2000). Durch konservierte Sequenzmotive können sie direkt an die aktive Domänen der Caspasen binden und somit deren enzymatische Aktivität inhibieren (Wright und Duckett, 2005).

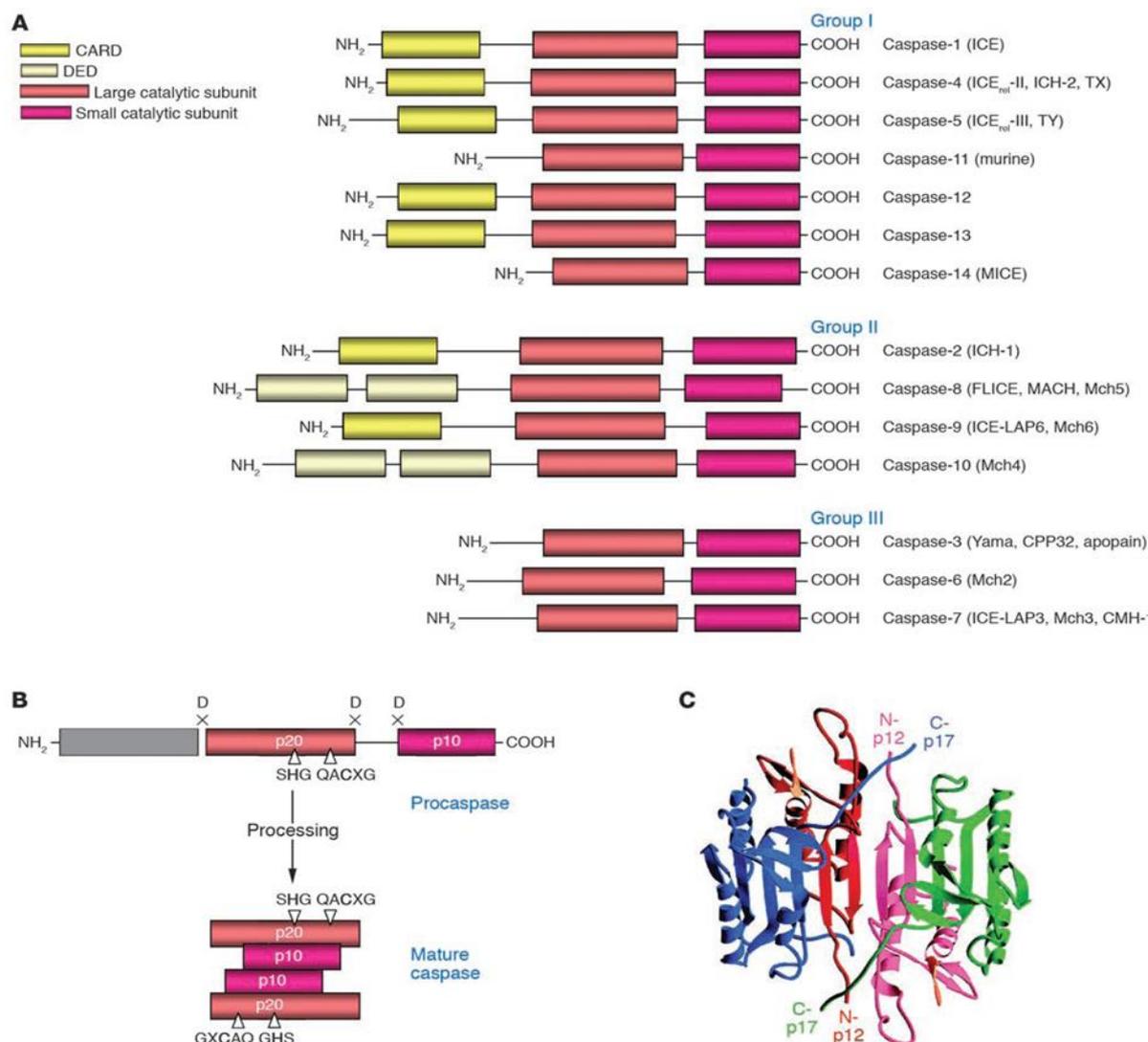


Abbildung 1: Klassifizierung, Domänenstrukturen und Aktivierung aller humaner Caspasen (Lavrik et al., 2005) A) Unterteilung der Caspasen in die drei Hauptgruppen: den Inflammatorischen- (Gruppe I: vorwiegend an Entzündungsprozessen beteiligt), Initiator- (Gruppe II: apoptotische Initiator-Caspasen) und Effektor-Caspasen (Gruppe III: apoptotische Effektor-Caspasen). B) Aktivierung der Pro-Caspasen mittels Proteolyse spezifischer Asp-Reste, wobei der erste Prozessierungsschritt die kleine von der großen Untereinheit trennt, die von einem zweiten Prozessierungsschritt gefolgt ist und durch Abtrennung der Prodomäne das aktive Tetramer bildet. (katalytisches Zentrum: GXCAQ SHG). C) 3-D-Struktur des Caspase-3-Heterotetramers. Charakteristisch dafür sind die parallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen, die die  $\alpha$ -helikale Struktur umspannt.

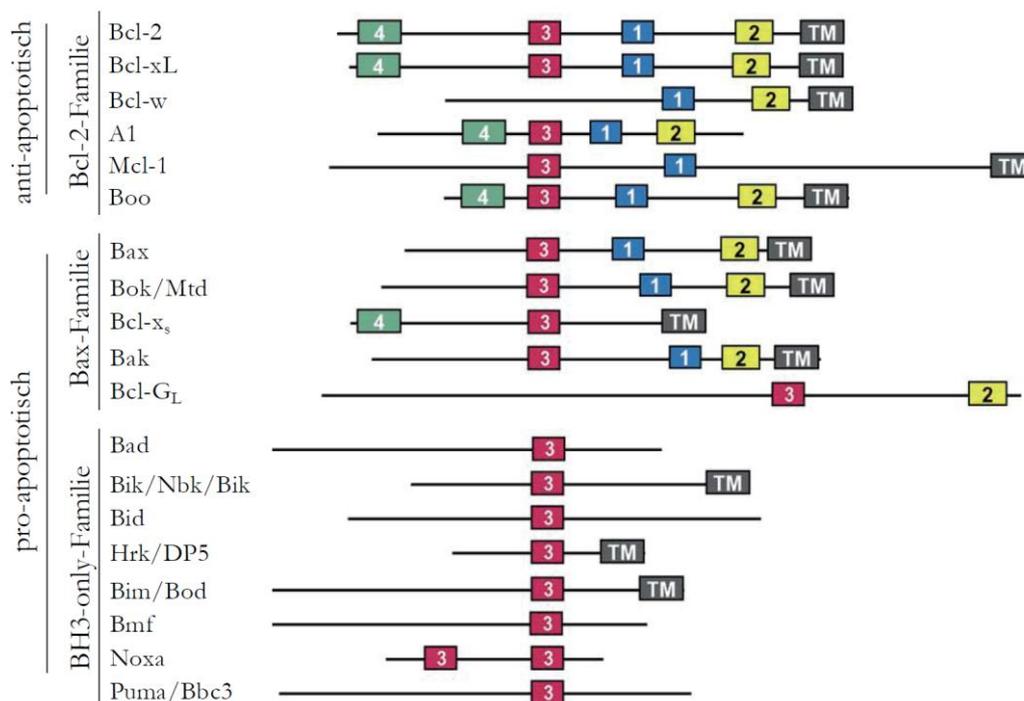
Es kann zwischen zwei apoptotischen Signalwegen unterschieden werden, die aber grundsätzlich in direkter Verbindung zueinander stehen. Zum einen dem intrinsischen bzw. mitochondrialen Signalweg, der über Signale innerhalb der Zelle aktiviert werden kann. Zum anderen dem extrinsischen oder Rezeptor-vermittelten Signalweg, der durch Signale außerhalb der Zelle aktiviert wird. Der intrinsische apoptotische Signalweg kann durch unterschiedliche Faktoren induziert werden, darunter genotoxische Stimuli, wie z. B. Strahlung, oxidativer Stress oder auch Chemotherapeutika. Dahingegen kann auch der Entzug von Wachstumsfaktoren oder auch Zytokinen den apoptotischen Prozess auslösen (Kim et al., 2006).

Der Prozess der Autophagie wird durch einen autophagosomalen/lysosomalen Selbstverdau gekennzeichnet, der einen Überlebensmechanismus bei kurzzeitiger Limitation an Nährstoffen darstellt, der aber auch bei anhaltendem Stress zu einem vollständigen zellulären Selbstverdau und zum Zelltod führen kann (Levine und Yuan, 2005). Die Apoptose und die Autophagie stehen meist in direkten Zusammenhang, da bestimmte Regulatoren den physiologischen Kontext des jeweilig anderen Prozesses unterstützen bzw. regulieren (Maiuri et al., 2007a). Letztendlich entscheidet das intrazelluläre Gleichgewicht von Zellteilung, Zellwachstum und Zelltod über das Schicksal der Zelle. Die Balance antagonistischer Signalwege der Apoptose und Autophagie entscheiden nach Intensität der Zellschädigung und dem Energiestatus der Zelle darüber, ob es zum Erliegen des Stoffwechsels kommt oder nicht (Levine, 2007). Veränderungen in der Regulation bzw. eine direkte Blockade dieser Prozesse ist nicht nur eine bedeutende Ursache für die Entstehung von Tumoren und Immunerkrankungen (Rieux-Laucat et al., 2003; Mizushima et al., 2008), sondern erhöhen auch die Resistenz von malignen Tumoren gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung. Daher ist es von besonderem Interesse, Störungen dieser Mechanismen genauer zu verstehen, da diese genetischen und molekularen Veränderungen in der Zelle Zelltodresistenzen auslösen können.

### 1.3 APOPTOTISCHE SIGNALWEGE UNTER KONTROLLE DER BCL-2-GENFAMILIE

Wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, können im Verlauf der Apoptose zwei Hauptsignalwege aktiviert werden, zum einen der extrinsische und zum anderen der intrinsische Signalweg. Beide Signalwege stehen in direktem Zusammenhang und können sich gegenseitig modulieren. Der extrinsische Rezeptorvermittelte Signalweg wird durch Signale außerhalb der Zelle aktiviert, wenn z.B. Virus-infizierte Zellen von Effektorzellen durch das Immunsystem erkannt werden (Fas et al., 2006, Kaufmann und Earnshaw, 2000). Im Vergleich dazu, wird der intrinsische Signalweg, der über die Mitochondrien verläuft, über diverse Stress-Signale innerhalb der Zelle reguliert, z.B. durch oxidativen Stress, Bestrahlung, DNA-Schäden oder Verlust der Zelladhäsion (Anoikis) (Kaufmann und Earnshaw, 2000; Bouchier-Hayes et al., 2005).

Die wichtigste und größte Gruppe der Regulatoren des intrinsischen apoptotischen Signalwegs bilden die Bcl-2-Proteine. Diese Proteine wurden nach dem Onkogen Bcl-2 (engl. B-cell-lymphoma 2) benannt, welches aufgrund chromosomaler Translokation in B-Zell-Lymphomen überexprimiert wird (Tsujiimoto et al., 1985).



*Abbildung 2:* Schematische Darstellung der wichtigsten Bcl-2-Familien-Mitglieder, untergliedert in anti- und pro-apoptotische Proteine, die abhängig von ihren Bcl-2-Homologie-Domänen 1 bis 4 (BH-Domänen 1-4) in drei Untergruppen (Bcl-2-, Bax- und BH3-only-Familie) aufgeteilt sind. TM: transmembranäre, C-terminale Domäne, die die Integration in intrazelluläre Membranen vermittelt. Modifiziert nach Coultas (Coultas und Strasser, 2003).

Die Bcl-2-Familie untergliedert sich in Apoptose-fördernde (pro-apoptotische) und Apoptose-hemmende (anti-apoptotische) Proteine, wobei diese nochmals abhängig von ihren Homologiedomänen in weitere drei Untergruppen unterteilt werden. Jedes Protein der Bcl-2-Familie besitzt bis zu vier dieser typisch konservierten Bcl-2-Homologie-Domänen (BH-Domäne 1-4) (Hengartner, 2000), die durch ihre alpha-helikalen Strukturen die Funktion des Proteins bestimmen und die an der Homo- bzw. Heterodimerisierung des jeweiligen Proteins beteiligt sind. Die Gruppe der anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder, wie Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 und Bcl-w, besitzen zwei bis vier der BH-Domänen und sind an der zytosolischen Seite intrazellulärer Membranen lokalisiert. Die C-terminale Domäne dieser Proteine ist bei der Integration in die Membran der Zellorganellen, wie Mitochondrien, endoplasmatischem Retikulum und Nukleus beteiligt. Zur Bcl-2-Familie gehören auch die pro-apoptotischen Proteine, die sich in zwei Gruppen unterteilen lassen. Zum einen weisen Mitglieder der Untergruppe, die als Bax-Gruppe bezeichnet wird, wie Bax, Bak, Bok/Mtd, Bcl-x<sub>s</sub> und Bcl-G<sub>L</sub> eine ähnliche Struktur wie die Mitglieder der anti-apoptotischen Bcl-2 Unterfamilie auf. Die zweite pro-apoptotische Untergruppe, die BH3-only-Gruppe (Huang et al., 2000), mit den Mitgliedern Bad, Nbk/Bik, Bid, Hrk/DPS, Bim/Bad, Bmf, Noxa und Puma/Bbc3 unterscheiden sich von den anderen durch die Anzahl der BH-Domänen, da sie nur eine BH3-Domäne besitzen (Danial und Korsmeyer, 2004). Diese Domäne, bestehend aus 9-16 Aminosäuren ist jedoch von großer Bedeutung, da sie zahlreiche Stress- und Todessignale mit dem mitochondrialen Zelltodprogrammen verkoppelt (Puthalakath und Strasser, 2002). Untersuchungen zur Interaktion der pro- und anti-apoptotischen Familienmitglieder zeigten, dass die BH-3-Domäne der BH3-only Proteine in die hydrophobe Tasche der Bcl-2-Proteine, gebildet durch AS-Reste der BH-1– BH-3 Domänen, binden kann (Liu et al., 2003). Durch diese Interaktion kann die anti-apoptotische Funktion von Bcl-2 und seiner Homologe (Bcl-xL, Mcl-1) blockiert werden, da die Interaktion mit den beiden pro-apoptotischen Proteinen Bax und Bak verhindert wird. Pro-apoptotische Familienmitglieder, wie Bax und Bak sind in der Lage durch Konformationsänderungen (Cory et al., 2003) Homooligomere zu bilden, die sich an die äußere Membran des Mitochondriums anlagern um dort eine Pore zu formen. Diese Permeabilisierung der mitochondrialen Membran („MOMP“, engl. Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation) führen zu einer Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren, wie z.B. Cytochrom c in das Zytosol (Cory und Adams, 2002). Verschiedene Proteasen und Caspaseaktivatoren, die sich im Intermembranraum des Mitochondriums befinden werden über die äußere Membran freigesetzt (Gellerich et al., 2000). Dazu zählen der IAP-Inhibitor Smac/Diablo (Du et al., 2000), AIF (engl. Apoptosis Inducing Factor) (Susin et al., 1999), Endonuklease G (Li et al., 2001), HtrA2/Omi (Verhagen et al., 2002, Martinou et al., 2000) und Cytochrom c (Kroemer et al., 2007), welches wiederum die Aktivierung des Komplexes, der als Apoptosom bezeichnet wird, aus ATP, Procaspase-9 und Apaf-1, initiiert (Desagher und Martinou, 2000; Cain et al., 2002). Dieser Prozess resultiert über die Aktivierung von Effektor-Caspasen im apoptotischen Zelltod. Die Aktivierung der Caspasen führt ebenfalls zur Entkopplung der Atmungskette und zu einem Zusammenbruch des elektronischen Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran, dem sogenannten Transmembranpotential  $\Delta\Psi_m$  (Zamzami und Kroemer, 2001).

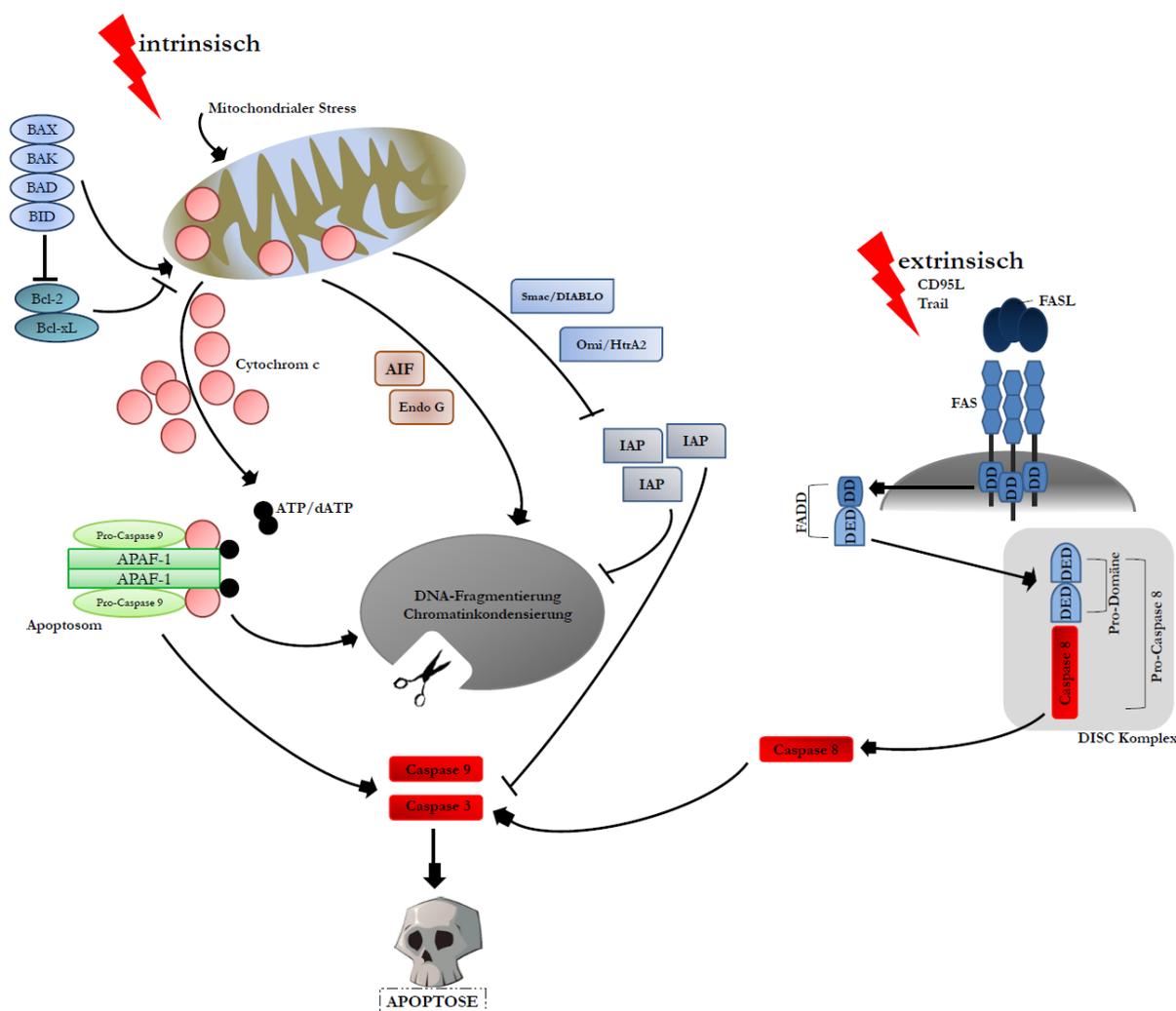


Abbildung 3: Modifizierte und vereinfachte Darstellung der beiden Hauptsignalwege der Apoptose (MacFarlane und Williams, 2004; Kroemer et al., 2007). Im intrinsischen Signalweg münden Stress-Signale in einer Aktivierung der Bax-Familie (BAX, BAK) und der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran. Diese führt zur Freisetzung von Proteinen aus dem Intermembranraum, darunter Cytochrom c, AIF, Endo G, Omi/HtrA2 und Smac/DIABLO. Die Cytochrom c Freisetzung führt zur Assemblierung des Apoptosoms und zur Aktivierung und Spaltung von Caspase-9 und -3. Die Proteine AIF und Endo G werden in das Zytoplasma freigesetzt, wodurch in Caspase-unabhängiger Weise die DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensierung induziert wird. Omi/HtrA2 und Smac/DIABLO fördern den apoptotischen Prozess über die Inhibierung der IAP-Proteine. Dadurch wird die Spaltung der Initiatorcaspase-9 vorangetrieben, die weitere Caspasen aktiviert und folglich die Apoptose einleitet. Der extrinsische Signalweg wird über den Todesrezeptor (z.B. FAS-Rezeptor) durch die extrazelluläre Bindung von Todesrezeptorliganden (FASL) ausgelöst. Durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor werden der FADD-Komplex, sowie der DISC-Komplex gebildet. Die Komplexbildung führt über die Spaltung der Initiator- und Effektor-Caspasen-8, -9 und -3 zu Apoptose.

AIF: engl. Apoptosis Inducing Factor, ATP: Adenosintriphosphat, APAF-1: Apoptotic protease-activating factor-1, dATP: 2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat, (BAK, BAD, BID, BAX) pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie, (Bcl-2, Bcl-xL): anti-apoptotischen Familienmitglieder, DED: engl. Effector domain, DD: engl. death domain, Endo G: Endonuklease G, FADD: engl. Fas associated death domain, FASL: engl. FAS ligand, IAP: engl. Inhibitor of apoptosis, SMAC: engl. second mitochondria-derived activator of caspases.

#### 1.4 TUMOREN DES ZENTRALEN NERVENSYSTEMS

Maligne Tumoren des zentralen Nervensystems kommen eher selten vor, bedeuten aber für den Patienten einen fundamentalen Einschnitt in sein bisheriges Leben. Sowohl die Symptome, als auch die meist infauste Prognose verlangen dem Patienten und seinen Angehörigen ab, sich neu mit Ihrem Leben auseinander zu setzen.

Primäre Hirntumore des zentralen Nervensystems (ZNS) gehen aus Nervenzellen, Gliazellen, den Hirnhäuten (Meningen) und auch Hirngefäßen aus. Da eine Vielzahl dieser Neoplasien im menschlichen Organismus vorkommt, ist eine Klassifizierung von Tumoren basierend auf mikroskopischen Kriterien, wie Kernatypien, Mitoseindex, Endothelzell-Proliferation, Zelldichte und Nekrose unumgänglich. Diese Klassifizierung, die eine Vergleichbarkeit von klinischen und experimentellen Studien gewährleistet und auch die Malignität des Tumors einschließt wird durch eine einheitliche Gliederung in der World Health Organization (WHO) berücksichtigt (Kleihues et al., 1995; Smith und Jenkins, 2000; Kleihues et al., 2002; Ohgaki und Kleihues, 2007) Der WHO-Grad-I (pilozytische Astrozytom) wird durch seine benigne Dignität, aber hoch differenzierte langsame Wachstumstendenz mit guter Prognose charakterisiert. Niedriggradige Tumore, wie die Astrozytome (WHO-Grad II), werden als langsam wachsende, aber invasive Tumore bezeichnet (Collins, 2004). Destruktiv hochgradig, diffus und infiltrativ in das umliegende Hirngewebe wachsende Neoplasmen (Ohgaki, 2005), wie das anaplastische Astrozytom, Oligodendrogliom und Oligoastrozytom (WHO-Grad III) und auch die bösartigste Form das Glioblastoma multiforme (WHO-Grad IV) bilden den wesentlichen Anteil der astrozytären Tumoren (Ashby und Ryken, 2006). Charakteristika für ein Glioblastom sind die hohe Zelldichte und die markante zelluläre und nukleäre Polymorphie. Das Tumorgewebe wird durch seine starke Proliferationsaktivität (Kleihues und Ohgaki, 2000), durch seine starke Tumorgewebsnekrosen und Endothelzellproliferation gekennzeichnet (Nelson et al., 1983, Behin et al., 2003). Die typische Lokalisation ist tief im fronto-temporalen Lappen, wobei die Ausbreitung innerhalb der weißen Substanz fortschreitet (Rainov et al., 2006) Darüber hinaus wurde nur selten eine Metastasierung außerhalb des ZNS beobachtet (Rainov et al., 2006).

Table 1: World Health Organisation (WHO) Klassifizierung von Hirntumoren nach Kleihues (Kleihues et al., 2002)

WHO	Bezeichnung	Dignität	Histologie	Merkmale	genetische Alterationen
I	pilozytisches Astrozytom	benigne	bipolare, piloide Zellen, Rosenthal-Fasern, eosinophile Körperchen	langsam wachsend, nicht infiltrativ, selten progressiver Verlauf, meist bei Kindern und jungen Erwachsenen	Akkumulation von p53 (>50%), Deletion des Chromosoms 17q (<20%)
II	Astrozytom	niedriggradig	Kernatypien	infiltrativ wachsend, Entwicklung zum höhergradigen Astrozytom, Rezidivbildung, Auftreten zw. 40. und 50. Lebensjahr	Mutation von p53 (>25%)
III	anaplastisches Astrozytom	maligne	Kernatypien, Mitosen, geringe Vaskularisierung	diffuses Wachstum, keine Nekrosen, häufige Tendenz zur Progression	Mutation von p53 (>30%) und p16 (>20%), Deletion des Chromosoms 19q (>50%)
IV	Glioblastom multifome	hochmaligne	Kernatypien, Mitosen, starke Gefäßproliferation, Pseudopalisaden, endovaskuläre Hyperplasie	sehr schnelles Wachstum, hochinfiltrativ wachsend, Nekrosen, häufig zw. 45. und 60. Lebensjahr	Mutation von p53 (>30%), p16 (>50%), Deletion des Chromosoms 10 (>60%) und 19q (25%), EGF-Rezeptor-Amplifikation (>30%)

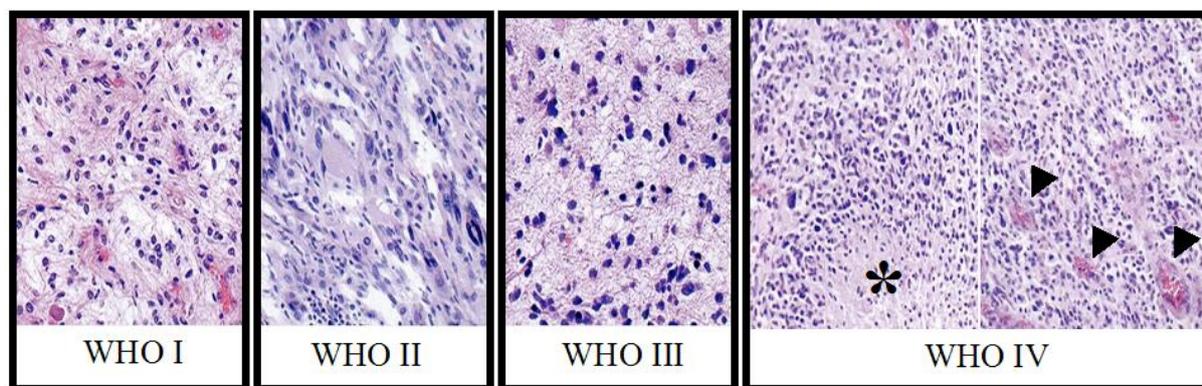


Abbildung 4: Pathologische Histologien aller Astrozytom Graduierungsstufen (WHO-I-IV) (Kamnasaran, 2009). WHO I (pilozytisches Astrozytom) zeigt kein infiltratives Wachstum in das umliegende Gewebe. Zellen sind bipolar. Grad II (Astrozytom) zeigt Kernatypien und leichtes infiltratives Wachstum. Grad III (anaplastisches Astrozytom) bildet deutliche Kernatypien, Mitosen und eine geringe Vaskularisierung ab. Das Glioblastoma multiforme (WHO IV) ist durch starkes infiltratives Wachstum, Mitose, Kernatypien, Nekrose (Markierung: Stern) und mikrovaskuläre Hyperplasien (Markierung: Pfeilköpfe) gekennzeichnet.

Dass es einer spezifischen Kaskade vieler zellulärer und molekularer Veränderungen in der Zelle bedarf, die zu einem Heranwachsen einer Tumorzelle führt, ist schon länger bekannt (Collins, 2004). Aberrationen, die sowohl die Blockade von Tumorsuppressorgenen, als auch die Aktivierung bzw. Überexpression von Onkogenen beinhalten, führen zu Störungen der Transkription bestimmter Gene und letztendlich zur Abweichungen der normalen zellulären Homöostase (Merrill und Jonakait, 1995; Semenza, 2001).

Die Diagnostik maligner Gliome stützt sich neben der histopathologischen Sicherung vor allem auf die bildgebenden Verfahren, wie die zerebrale Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) wobei diese Verfahren eine zunehmende Bedeutung in der Vorbereitung der Operation bzw. Biopsie gewinnen (Klings et al., 2001). Durch die ungünstige Prognose für den Patienten mit einem Glioblastom bedarf es einer Optimierung der therapeutischen Maßnahmen. Die Therapie besteht nach Konstitution des Patienten und der Lokalisation des Tumors meist aus der Operation mit anschließender Strahlen- und eventueller adjuvanten Chemotherapie (Burton und Prados, 2000). Von entscheidender Bedeutung scheint jedoch die Radikalität der Tumorentfernung (engl. Maximum Safe Resection) zu sein (Gupta und Sarin, 2002), die leider aber an ihre Grenzen stößt, da durch bildgebende Verfahren keine klare Abgrenzung des infiltrativ wachsenden Tumors in das umliegende Gewebe gewährleistet werden kann und somit infiltrierende Tumorzellen der operativen Entfernung entkommen. Die Prognose ist von vielen Faktoren abhängig, wie der Diagnose, der Ausbreitung, der Lokalisation, sowie der Verlauf nach der Therapie und nimmt starken Einfluss auf das Überleben des Patienten. Jedoch hat sich die Prognose leider nur unwesentlich verbessert. Leider kann immer noch von einer medianen Überlebenszeit des Patienten zwischen 8 und 15 Monaten im Falle eines Glioblastoms (WHO VI) gesprochen werden (Ohgaki und Kleihues, 2007). Patienten mit einem niedriggradigen Hirntumor (WHO II –III), wie z.B. einem Anaplastischen Astrozytom haben die Chance 5-10 Jahre ab Zeitpunkt der Diagnose die Krankheit zu überleben (Ohgaki und Kleihues, 2007)(CBTRUS; <http://www.cbtrus.org>).

Als neuartige Therapie wurde das Chemotherapeutikum Temozolomid (Temodal®) als konventionelle Maßnahme in der Klinik zum Einsatz gebracht. Die klinischen Studien von Stupp und Mirimanoff (Mirimanoff et al., 2006) zeigten ein verlängertes Überleben des Patienten nach chirurgischem Eingriff und kombinierter Radiochemotherapie mit einer adjuvanten TMZ-Behandlung. Temozolomid (TMZ) ist ein alkylierendes Therapeutikum, welches eine geringe Toxizität aufweist und schnell durch orale Anwendbarkeit in dem Liquorkompartiment verfügbar ist. Die hohe Verfügbarkeit und Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit scheinen für die Wirksamkeit der Substanz von großer Bedeutung zu sein. Der Patient kann entweder begleitend (konkomitant) zur Bestrahlung oder im Anschluss (adjuvant) mit Temozolomid behandelt werden. Es steht jedoch der Wirkung von TMZ das Reparaturenzym O<sup>6</sup>-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) gegenüber (Hermisson et al., 2006). Dieses Enzym repariert die durch TMZ verursachten DNA-Schädigungen. Es profitieren daher vor allem Patienten mit einer

Promotor-Methylierung einhergehenden Herunterregulierung des MGMT-Enzyms von dem Effekt der TMZ-Therapie. Prognostische Erwartungen stehen daher in Abhängigkeit der Enzymaktivität des MGMT-Enzyms (Hegi et al., 2005).

### 1.5 TUMORENTSTEHUNG UND MOLEKULARE URSACHEN DER APOPTOSE-RESISTENZ IN GLIOMEN

Die Tumorentstehung ist ein Resultat einer klonalen Dysregulation des Zellwachstums, die zu einer Unabhängigkeit der betroffenen Zelle von Wachstumssignalen und infolgedessen zu einer autonomen Zellproliferation führt. Die unbegrenzte Replikationsfähigkeit, die Zellinvasion und -migration, sowie auch die autonome Vaskularisierung des Tumors tragen entscheidend zur Tumorentstehung bei (Hanahan und Weinberg, 2000). Störungen des programmierten Zelltodes sind ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung von Tumoren. Die genetische Instabilität, numerische chromosomale Aberrationen und ein Verlust bzw. Zugewinn genetischer Informationen können zu strukturellen Veränderungen, zu Chromosomenbrüchen und zur Apoptoseresistenz führen. Bedingt durch diese Veränderungen können auch Gene, die den Zelltod (Apoptose) bzw. die DNA-Reparatur regulieren, in ihrer Funktion gestört werden, die konsekutiv ein selbständiges neoplastisches Wachstum fördern. Zusätzlich können Defekte in der apoptotischen Maschinerie bzw. die Überexpression anti-apoptotischer Gene eine fundamentale Rolle in der Entstehung vieler Tumore und Krebsarten, im speziellen der Glioblastome spielen (Bogler und Weller, 2002, Steinbach und Weller, 2004, Ziegler et al., 2008).

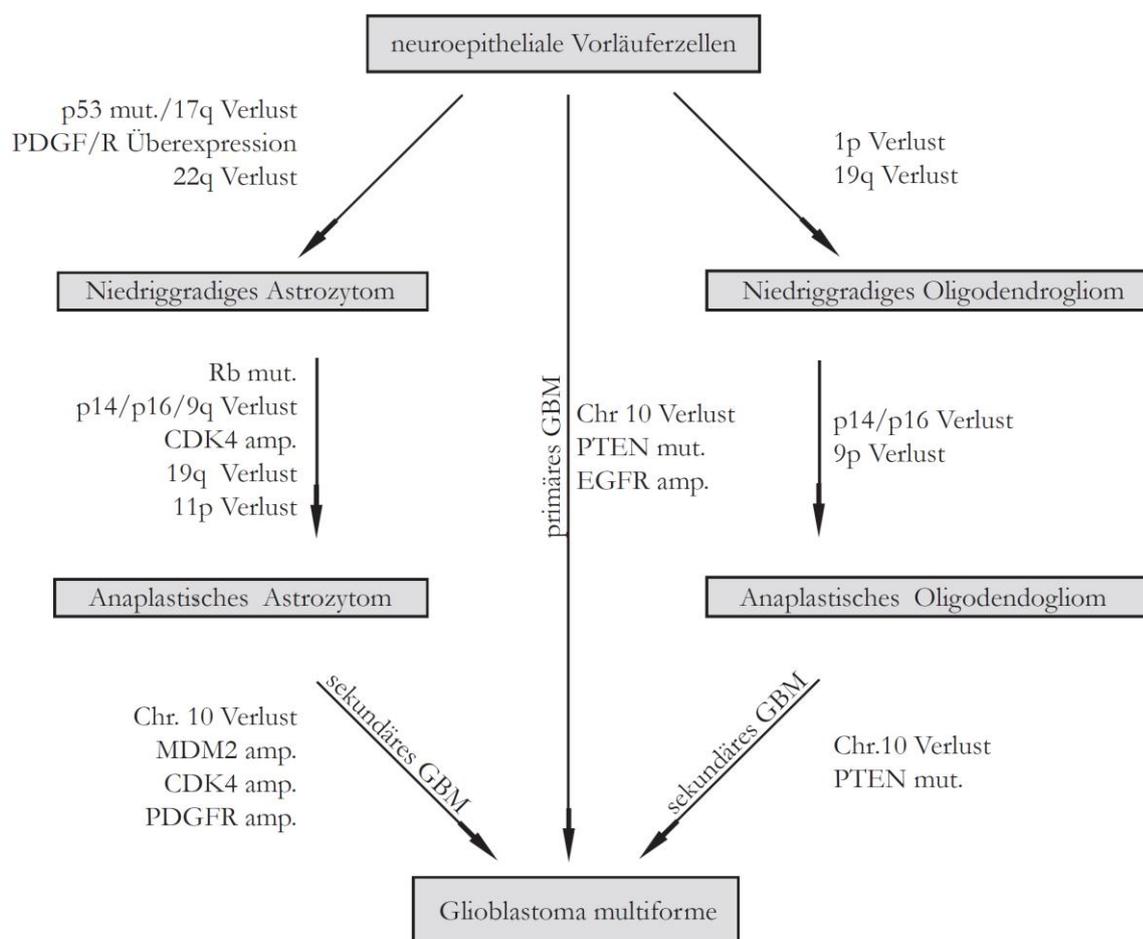


Abbildung 5: Klinische und genetische Progressionswege von der neuroepithelialen Vorläuferzelle zum Glioblastoma multiforme. Modifiziert nach (Kleihues und Ohgaki, 2000). Das primäre Glioblastom entwickelt sich *de novo* in Abhängigkeit eines Chromosom 10 Verlustes, einer PTEN Mutation oder der EGFR Amplifikation, während sich das sekundäre Glioblastom aus niedriggradigen Astrozytomen bzw. Oligodendrogliomen über Mutationen, bzw. Verluste bestimmter Gene und fortschreitende Malignisierung hin entwickelt.

EGFR: engl. epidermal growth factor, CDK4: engl. cyclin-dependent-kinase 4, MDM2: engl. mouse double minute 2, PTEN: engl. phosphatase and tensin homologue deleted from chromosom 10, p53: engl. tumorsuppressor gene 53, PDGFR: engl. plateled derived growth factor receptor.

Veränderungen dieser Art führen dazu, dass die Zelle (Tumorzelle) sich die Fähigkeit aneignet, unkontrolliert zu proliferieren, infiltrativ zu wachsen und eine eigene Vaskularisierung anzuregen (Vajkoczy und Menger, 2004). Bei sekundären Glioblastomen zeigen sich Mutationen des p53-Gens in 65% der Fälle. Durch Inaktivierung von p53 („Wächter des Genoms“) erwirbt die Zelle die Fähigkeit, den Zelltod in Form von Apoptose zu umgehen, teilt sich unkontrolliert und wächst somit zu einem Tumor heran (Shapiro, 2002).

Molekulargenetische Untersuchungen zeigten, dass sich primäre Glioblastome vorwiegend *de novo* in älteren Patienten, zwischen dem 45. und 60. Lebensjahr entwickeln. Sekundäre Glioblastome, entwickeln sich aus Rezidiven niedriggradiger Tumoren (Collins, 2004), wobei hier eher jüngere Patienten betroffen sind. Eine favorisierte Hypothese der *de novo* entstehenden primären Glioblastome stützt sich auf die Annahme von verbliebenen Stammzellen, die anscheinend im adulten Gehirn verweilen, als möglichem Ursprung der Tumorentstehung (Singh et al., 2003, Hemmati et al., 2003; Singh et al., 2004). Aktuelle *in vitro* und *in vivo* Studien zeigten, dass mit dem Oberflächenmarker CD133 positiv markierte „Gliostammzellen“ im Vergleich zu CD133-negativen Zellen zur Selbsterneuerung fähig sind, und eine erhöhte Proliferation, sowie ein verstärktes Wachstum *in vivo* besitzen (Beier et al., 2007). Jedoch zeigten weitere aktuelle Studien, dass der Marker CD133 wohl nicht obligat und exklusiv als Stammzellmarker verwendet werden kann, da unter anderem auch CD133-negative Kolon-Tumorzellen in der Lage sind, einen Tumor zu bilden (Shmelkov et al., 2008).

Genetische Aberrationen die verschiedenste Stationen durchlaufen, beginnen am häufigsten mit dem Verlust des Allels 19q (Anaplastisches Astrozytom bzw. niedriggradiges Oligodendrogliom) welches auf dem Chromosom 7 lokalisiert ist. Das p53-Gen ist auf dem Chromosom 17p13 lokalisiert, welcher ein universeller Sensor des genotoxischen Stresses der Zelle ist. Der Verlust ist Grund einer zellulären Immortalität und prädisponiert diese Zelle für weitere onkogene Mutationen (Levine, 1997). Der Verlust des Allels 17q, führt daher über den Progress des niedriggradigen Astrozytom zur Bildung eines anaplastischen Astrozytoms (WHO III) (von Deimling et al., 1992a), welcher in 65% der Fälle mit einer Mutation des p53-Gens assoziiert ist. Dahingegen zeigen nur 10% der Patienten mit einem primären Glioblastom den Defekt von p53. Weitere Überexpressionen bzw. Abnormalitäten, die das Gen MDM2 betreffen, führen in 20% der Fälle zu einem sekundären Glioblastom. MDM2 wird über p14<sup>ARF</sup> reguliert, wobei sie als E3-Ubiquitin-Ligase als direkter Repressor für p53 fungiert. Rezeptoren, die unter anderem für die Proliferation und Zellteilung verantwortlich sind (Yarden und Ullrich, 1988), werden über den EGFR (engl. Epidermal growth factor receptor) vermittelt. In 40% der Fälle führt eine Amplifikation des EGFR-Gens zu einem Glioblastom und ist letztendlich eine initiale Veränderung der Entwicklung eines primären Glioblastoms (Ekstrand et al., 1991; von Deimling et al., 1992b). Darüber hinaus wurde in einem Drittel der Fälle eine erhöhte Aktivität des mutierten EGFR-Gens nachgewiesen. Charakteristisch bei der dieser Aberration ist der Verlust des Chromosoms 10, besonders des Allels 10q (von Deimling et al., 1992b). Daher liegt die Vermutung nahe, dass mit diesem Verlust, eine Korrelation zur Amplifikation des EGFR einhergeht (Wong et al., 1987). Genetische Veränderungen, die ein Glioblastom entstehen lassen, führen meist auf die Aberration des Chromosoms 10 zurück. Es wurde der Verlust des ganzen Chromosoms, eines q- bzw. p-Armes bis hin zu einer Punktmutation detektiert (Ichimura et al., 1998). Für die Progression des Tumors ist die Blockade entscheidender Tumorsuppressorgene, die auf diesem Chromosom lokalisiert sind, von großer Bedeutung (Karlsson et al., 1993; Albarosa et al., 1996; Kimmelman et al., 1996). In 30% der Fälle entstehen Glioblastome durch die Mutation des PTEN (engl. Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten). Dieses Enzym phosphoryliert sowohl

Lipide, als auch Proteine, wobei hier die wichtigste Rolle das Inositol-Phospholipid 3 spielt. Phospholipide unterstützen die Aktivität von AKT (Steinbach und Weller, 2004), einer Serin-Threonin-Kinase, welche durch Unterdrückung der Apoptose die Zellteilung vorantreibt. PTEN fungiert also in diesem Prozess als direkter Inhibitor von AKT (Smith und Jenkins, 2000), was die Aktivierung von HIF (engl. Hypoxia inducible factor) mit einschließt und ebenfalls zur Blockade der Apoptose führt. (Zundel et al., 2000). In vielen Tumorzellen findet sich eine stark erhöhte Expression von anti-apoptotischen IAPs, die in diesen Zellen eine Apoptosedefizienz und damit Chemotherapieresistenz begünstigt (Chakravarti et al., 2002), Zum anderen kann eine mitochondriale Hemmung der Apoptose durch die Inhibierung anti-apoptotischer Familienmitglieder der Bcl-2-Familie reguliert werden (Smith und Jenkins, 2000).

### 1.6 PHYSIOLOGISCHE UND PATHOPHYSIOLOGISCHE RELEVANZ DER AUTOPHAGIE

Wie in Abschnitt 1.1 erwähnt, ist der Prozess der Autophagie (Typ II-Zelltod), neben der klassischen Apoptose (Typ I-Zelltod) und der Nekrose (Typ III-Zelltod) (Lockshin und Zakeri, 2004) ein weiterer Zelltodmechanismus, der für die Zellhomöostase eine wichtige Rolle spielt. Das Wort Autophagie entstammt dem griechischen und setzt sich aus den beiden Wörtern Auto (selbst) und phagie (essen) zusammen. Das Phänomen des Selbstverdaus zytoplasmatischer Komponenten für eine physiologische Neuorientierung der Zelle wurde bereits 1962 von Ashford und Porter beschrieben (Ashford und Porter, 1962). Autophagie beschreibt den partiellen Selbstverdau, der bei zeitweiliger Limitation an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren zu einem Überlebensmechanismus der Zelle wird; der aber auch bei einem vollständigen Ablauf des Prozesses zum Zelltod führen kann (Levine und Yuan, 2005). Die irreversible Degradierung zytosolischer Bestandteile läuft innerhalb charakteristischer Doppelmembranorganellen, den Autophagosomen und Lysosomen, ab (Levine und Kroemer, 2008). Dadurch werden Proteine zu Aminosäuren, Lipide zu freien Fettsäuren und Nukleinsäuren zu Nukleotiden abgebaut, und die dabei entstandenen Aminosäuren für die Proteinsynthese wieder zu Verfügung gestellt. Der autophagische Prozess ist evolutionär hoch konserviert, und daher wichtig für Zellentwicklung, Zelldifferenzierung, Immunabwehr und Zellhomöostase (Levine und Deretic, 2007, Maiuri et al., 2007a, Thorburn, 2008, Mizushima et al., 2008). Aufgrund ihrer bedeutenden Rolle wurde die Autophagie in vielen Organismen beschrieben, wie z.B.: *Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum*, *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und *Homo sapiens* (Mizushima, 2007, Kourtis und Tavernarakis, 2009, Meijer et al., 2008, Melendez und Neufeld, 2008). Die Hauptaufgabe des autophagischen Prozesses liegt in der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase, die daher konstitutiv auf basalem Niveau in allen Zelltypen abläuft. Zelluläre Reaktionen auf Nährstoffmangel, oxidativen Stress, sowie Ansammlung defekter bzw. überschüssiger Proteine werden mit einer erhöhten Induktion von Autophagie beantwortet (Levine und Deretic, 2007; Mizushima, 2007; Levine und Kroemer, 2008). Sonderformen der Autophagie, die gerichtet Organellen degradieren sollen, werden z.B. als Mitophagie (Abbau einzelner Mitochondrien) bezeichnet (Huang und Klionsky, 2007, Yu et al., 2008) Der Prozess der

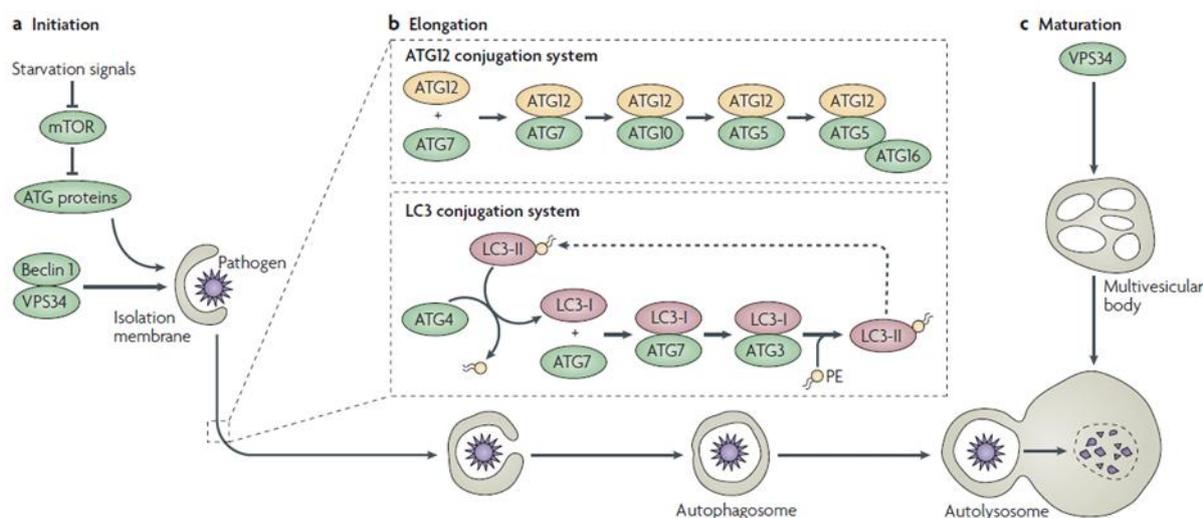
Autophagie kann schützend, aber auch schädigend für Zelle und Organismus sein. Dysregulationen der Autophagie werden daher mit vielen Krankheiten in Verbindung gebracht. So sind sie ursächlich an der Entstehung neurodegenerativer Krankheiten, aber auch bei Herz-, Muskel-, Kreislauf-, Immun- und Lebererkrankungen beteiligt (Levine und Kroemer, 2008, Mizushima et al., 2008). Darüber hinaus kann Autophagie die reduzierte bzw. erhöhte autophagosomale Aktivität, die Tumorgenese, den Zellzyklus und das Altern beeinflussen (Levine und Kroemer, 2008, Mizushima et al., 2008, Thorburn, 2008, Levine und Kroemer, 2009).

Der generelle Überlebensmechanismus der Zelle stützt sich auf den Prozess der Autophagie, der durch saure Degradation in den Lysosomen Proteine und überschüssige Organellen abbaut und dabei den Prozess der Apoptose unterdrückt. Wie oben schon erwähnt, führt langanhaltende, Stress-induzierte Autophagie zum Zelltod. Dieser autophagische Zelltod kann auf molekularer Ebene mit dem apoptotischen Mechanismus eng verknüpft sein, da Teile beider Programme von den gleichen Regulatoren bzw. Mediatoren abhängen (Maiuri et al., 2007a).

Der Abbau kurzlebiger Proteine wird durch den Ubiquitin-Proteasomen-Signalweg initiiert (Kim et al., 2000; Edinger und Thompson, 2003; Mizushima, 2007). Dagegen werden langlebige Proteine, die mindestens 90% des gesamten Proteingehalts der Zelle ausmachen, durch die Degradation in den Lysosomen abgebaut. Lysosomen werden als kleine saure Vesikel vom Golgi-Apparat abgeschnürt. Der niedrige pH Wert von ca. 5 lässt sich auf die Aktivität der in den Vesikel enthaltenen Enzyme, den Hydrolasen zurückführen, die diesen Abbau fördern (DiAugustine, 1974, Kroemer und Jaattela, 2005). Der Abbau langlebiger Proteine kann über drei Wege von dem Zytoplasma zu den Lysosomen vermittelt werden: zum einen ist es die Makroautophagie (allgemein auch als Autophagie bezeichnet), die immer mit einer Neubildung eines doppelmembranhüllten Vesikels im Zytosol beginnt und der am häufigsten genutzte Degradationsweg ist (Gozuacik und Kimchi, 2004; Meijer und Codogno, 2004; Kroemer und Jaattela, 2005). Zum anderen werden zytoplasmatische Bestandteile, wie Peroxisomen und sogar Teile des Nukleus, mittels Mikroautophagie abgebaut. Dies geschieht direkt über die Lysosomenoberfläche durch Invagination, Protrusion und/ oder Septation, Prozesse, die die Abschnürungen intralysosomaler Vesikel vorantreiben und darüber die zytoplasmatischen Teile degradiert werden können (Levine und Klionsky, 2004; Majeski und Dice, 2004; Thompson et al., 2005). Der dritte und letzte Abbauweg, läuft Chaperon-vermittelt ab. Dieser Abbauweg wird spezifisch über zytosolische bzw. lysosomale Co-Chaperone der Hsc70-Familie reguliert. Co-Chaperone erkennen das spezifische Pentapeptid-Signal (KFERQ-Sequenz) cytosolischer Proteinsubstrate, bindet nach Komplexbildung an den lysosomalen Rezeptor Lamp2a (engl. Lysosomal associated membrane protein 2a) und wird mit Hilfe lysosomaler Proteasen im Lysosomenlumen entfaltet und abgebaut (Schmid et al., 2006).

## 1.7 MOLEKULARE MECHANISMEN DER AUTOPHAGIE

Der Prozess der Autophagie ist sehr komplex und beinhaltet verschiedene untergeordnete Signalwege, die miteinander verknüpft und komplex reguliert sind. Zum generellen Verständnis der molekularen Kontrolle der Autophagie trug die Entdeckung der sogenannten ATG-Gene (Autophagie-assoziierte Gene = engl. Autophagy-related genes) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bei (Tsukada und Ohsumi, 1993). Bis zum heutigen Tage konnten über 30 ATG-Gene identifiziert werden, die in der komplexen Autophagiemaschinerie beteiligt sind (Huang und Klionsky, 2002). Für viele dieser Gene konnten mittlerweile Homologe in Säugern entdeckt werden, die sowohl Parallelen, als auch Unterschiede aufzeigen (Mizushima et al., 2002). Der Signalweg der Autophagie wird sowohl über die ATG-Proteine (He und Klionsky, 2009), als auch über Mitglieder der PI3K Familie, die als Hauptregulatoren fungieren, aktiviert bzw. inhibiert. Zum einen aktivieren Proteine der PI3K Klasse III den autophagosomalen Prozess, wohingegen Proteine der PI3K Klasse I die Autophagie über die Aktivierung von mTOR unterdrücken (Kondo et al., 2005). Diese Mechanismen sind besonders wichtig für Zellüberleben und Wachstum der Zelle. Die Rolle der Autophagie hängt sehr von der Umgebung bzw. dem Zustand der Zelle ab. Im Falle der Inhibition des autophagischen Zelltods, dominiert die Proteinsynthese, wodurch ein ununterbrochenes Zellwachstum gefördert werden kann. Dies ist ein typisches Charakteristikum für Tumorzellen. Die Hemmung des autophagischen Zelltods führt auch zu einer gewissen Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. Zellen in zentralen Bereichen des Tumors verfügen meist über eine ungenügende Gefäßversorgung, die einen Missstand an Nährstoffen, Sauerstoff und Energie in sich birgt. Tumorzellen kompensieren diesen Missstand über den Abbau entbehrlicher Proteine und Organellen, die zumal eine Quelle intrazellulärer apoptotischer Stimuli sein können (Edinger und Thompson, 2003; Alva et al., 2004; Cuervo, 2004; Gozuacik und Kimchi, 2004; Shintani und Klionsky, 2004; Bahrecke, 2005; Kondo et al., 2005).



*Abbildung 6:* Prozess und Ablauf der Autophagie A) Der autophagische Prozess wird z.B. über einen Nährstoffmangel initiiert. Die Aktivierung läuft über die Inhibition der Serin/Threonin-Kinase mTOR und über die Aktivierung nachgeschalteter ATG-Proteine, unter anderem auch über die Komplexbildung von Beclin1/VPS34, die die präautophagosomale Struktur bzw. die Entstehung der Isolationsmembran herbeiführt, ab. B) Die Elongation ist gekennzeichnet durch zwei Ubiquitin-Konjugationssysteme: zum einen das ATG12- und zum anderen das LC3-System. Die kovalente Bindung des ATG7-Proteins an das ATG12, und der anschließenden Oligomerisierung mit ATG16 führt zur Komplexbildung, die die Proteinacetylierung von LC3-II/PE (PE: Phosphatidylethanolamin) initiiert. LC3-II/PE kann an die Isolationsmembran binden und treibt die Bildung des Autophagosoms voran. C) Die letzte Phase, die Maturation schließt die Fusion der Autophagosomen mit den Lysosomen ein. Bei der Fusion wird der gesamte Inhalt des Autophagosoms in die Lysosomen entleert, und anschließend mittels saurer lysosomaler Hydrolasen degradiert. Modifiziert nach Levine (Levine und Deretic, 2007).

Grundsätzlich wird der Prozess der Autophagie in drei Phasen unterteilt: Die Initiation, die Elongation (Bildung des Autophagosoms) und die Maturation (Abbau des autophagischen Körpers). Die Initiation wird sowohl über den Nährstoffgehalt, als auch über den Entwicklungsstatus der Zelle reguliert. Für die Regulierung des Nährstoffangebots spielt die Serin/Threonin-Kinase mTOR (engl. mammalian target of rapamycin) als Hauptsensor eine zentrale Rolle. Zuerst wurde mTOR als Angriffsziel des Antibiotikums Rapamycin identifiziert (Noda und Ohsumi, 1998). Ist eine ausreichende Menge an Nährstoffen in der Zelle vorhanden, wird mTOR über den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/AKT Signalweg phosphoryliert und aktiviert (Lum et al., 2005), wodurch die Autophagie unterdrückt wird. Unter physiologischen Nährstoffmangel kommt es zur natürlichen Inhibition des mTOR-Signalweges (Fingar und Blenis, 2004), und damit zur Induktion der Autophagie. Die Initiation der Autophagie, über stimulatorische Signale, unter anderem auch die Komplexbildung von ATG1/ATG13, die grundlegend für die Autophagosomenbildung ist (Diaz-Troya et al., 2008), führt über die Aktivierung des Autophagieinitiationskomplexes (AIC) (engl. autophagy initiating complex) zur Bildung der präautophagosomalen Struktur (PAS) (engl. phagophore assembly site). Anschließend wird das Protein ATG1 bzw. der Komplex Beclin1/ATG6 und VPS34 (Phosphoinositol-3-Kinase) aktiviert bzw. gebildet

(Kihara et al., 2001), die für die Bildung der PAS verantwortlich sind. Für die pharmakologische Unterdrückung der Autophagie können PI3K-Inhibitoren, wie Wortmannin und 3-Methyladenin verwendet werden (Wu et al.). Die Bildung des frühen Autophagosoms beginnt mit der weiteren Rekrutierung anderer ATG-Proteine, die mit der Bildung der Isolationsmembran, der PAS beginnt und die wiederum durch die Elongation des zytoplasmatischen Bestandteile gekennzeichnet ist. An der Elongation sind zwei miteinander gekoppelte Ubiquitin-ähnliche Konjugationsprozesse beteiligt (Geng and Klionsky, 2008).

Nach Levine und Deretic (Levine und Deretic, 2007) wird folgendermaßen unterschieden: eines der Konjugationssysteme, das ATG12-ATG5-System, beinhaltet die Konjugation des ATG12- mit ATG5. Während dieses Prozesses wird der C-terminale Glycinrest des ATG12-Proteins durch das E1-Ubiquitin-Aktivierungsenzym ATG7 mittels ATP-Hydrolyse durch Adenylierung aktiviert. Das Protein ATG12 verbindet sich anschließend über eine Thioesterbrücke mit dem Protein ATG7 und wird als Komplex zum E2-Ubiquitin-Konjugationsezym ATG10, ebenfalls über eine Thioesterbrücke, überführt. Mittels Isopeptidbrücke über den Lysinrest von ATG5 entsteht nun die Konjugation mit ATG12. Der Komplex aus ATG12 und ATG5 formt einen nicht kovalenten Proteinkomplex mit ATG16 an der Außenseite des entstehenden Autophagosomes, welche weiterhin für die Elongation der Isolationsmembran und für die Proteinacetylierung von LC3/ATG8 zum LC3-II/PE (PE: Phosphatidylethanolamin) notwendig ist (Levine und Deretic, 2007, Maiuri et al., 2007a, Matsushita et al., 2007, Mizushima, 2007). Weiterhin besitzt ATG5 eine Membran-verankernde Domäne, die für die Elongation und den Einbau des LC3-PE verantwortlich ist (Mizushima et al., 2001). Das zweite Konjugationssystem spaltet über die Cysteinprotease ATG4 posttranslational fünf Aminosäuren von dem carboxyterminalen Ende des ATG8-Homologs LC3 (engl. microtubule-associated protein 1 light chain 3) ab (Kabeya et al., 2000). Das zytoplasmatische LC3-I wird nun am Glycerinrest (G<sub>120</sub>) durch das E1-Ubiquitinaktivierungsenzym ATG7 über das E2-Ubiquitinaktivierungsenzym ATG3 (Tanida et al., 2002) an das Phosphatidylethanolamin (PE) an der äußeren der sich bildenden Isolationsmembran integriert. Das nun als LC3-II/PE bezeichnete Protein wird über seinen Lipidanteil in die Autophagosomenmembran transloziert, bleibt dort stabil assoziiert und kann als Marker für autophagosomale Aktivität genutzt werden (Ichimura et al., 2000b). Später kann das LC3-II/PE durch ATG4 wieder über den Phospholipidanker dekonjugiert werden. Sowohl der Zyklus der Konjugation und Dekonjugation, als auch beide Ubiquitin-vermittelten Prozesse sind bei der Progression der Autophagie besonders wichtig. LC3 spielt bei dem Transport des Autophagosomen zum Lysosomen über das Mikrotubuli-Zytoskelett ebenfalls eine wichtige Rolle (Mizushima, 2007). Neben der Bindung des LC3 an die Autophagosomenmembran existiert ein weiterer Mechanismus, der eine selektive Degradation des Polyubiquitin bindenden Proteins p62/SQSTM1 initiiert. Das Protein p62/SQSTM1 bindet spezifisch sowohl Ubiquitin, als auch LC3 und führt diese der autophagosomalen Maschinerie zu. Daher kann ebenfalls das Protein p62/SQSTM1, welches nach Aktivierung der Autophagie degradiert wird, als Marker für die Induktion der Autophagie verwendet werden (Bjorkoy et al., 2005).

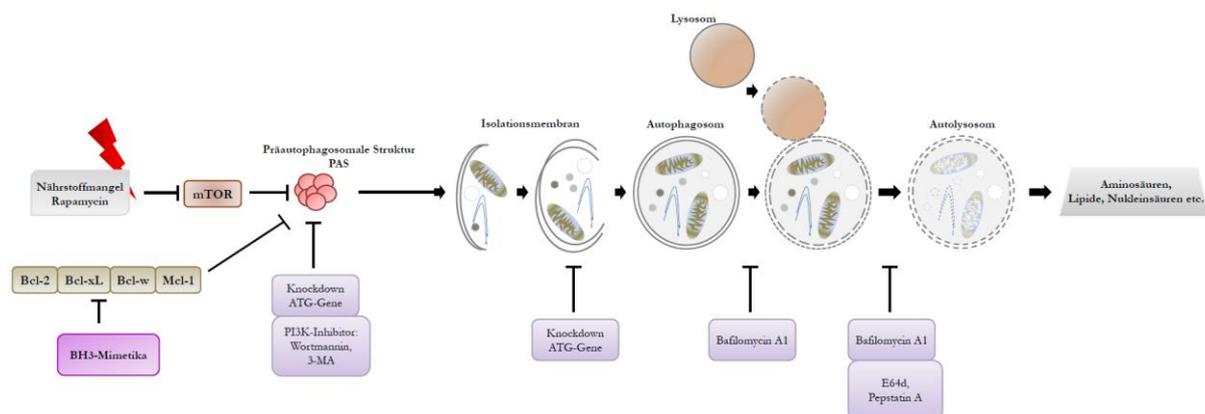
Die weitere Expansion der präautophagosomalen Membran wird durch weitere Signalmoleküle wie GTPasen ( $G\alpha_{13p}$ , Ypt7p), PI3-Kinasen (TORp, Apg1q) und Phosphatasen (PP2Ap) kontrolliert, die unter anderem die Aktivität autophagischer Gene mit einschließt (Fengsrud et al., 1995, Petiot et al., 2002). Gebildete autophagosomale Strukturen schließen viele der zytoplasmatischen Komponenten, wie Proteine, Glykogene, neutrale Lipide, RNA und Ribosomen, ein. Unter anderem werden Organellen wie Mitochondrien, Peroxisomen, oder glattes und raues Endoplasmatisches Retikulum von der Doppelmembran des Autophagosoms umschlossen. Die Degradierung der zytosolischen Bestandteile wird in den Lysosomen voran getrieben. Primäre Lysosomen entstehen durch Abschnürung lysosomaler Enzyme des Golgi-Apparats. Dies geschieht durch den spezifischen Rezeptor, der den Mannose-6-Phosphatrest der lysosomalen Enzyme erkennt und bindet. Diese Reste werden zu der späten Reifeformen des Endosoms geleitet und von dem Rezeptor in das Lysosom transportiert. In den Lysosomen herrscht eine hohe Protonenkonzentration (pH 4,5-5) durch die sauren Hydrolasen, die für das Zerstören der Proteine, Organellen u.a. notwendig sind. Für die Annäherung und die anschließende Fusion von Autophagosom und Lysosom sind sowohl sekretorische, als auch endozytotische Transportsysteme nötig. Für den damit einhergehenden autophagischen Flux von Autophagosom zu Lysosom werden die sogenannten Rab-Proteine (GTPasen Ykt6p) und SNAREs (Vti1p, Vam3p), wie Mikrotubuli und Aktinfilamente rekrutiert (Klionsky, 2005). Das frühe Autophagosom wird nun mittels Protonen-ATPasen vakuolär angesäuert, wodurch die Transformation zu einem späten Autophagosom initiiert wird. Die Fusion des Autophagosoms mit den bereits existierenden Lysosomen bzw. späten Endosomen zu Autophagolysosomen bzw. Autolysosomen (Kim and Klionsky, 2000, Meijer und Codogno, 2004, Petiot et al., 2000) kann nun stattfinden. Nach der Fusion wird die äußere Membran des Autophagosoms in die Lysosomenmembran inkorporiert, die die Freisetzung des autophagosomalen Körpers (einfache innere Membran) in das Lumen des Lysosoms aktiviert. Mit Hilfe von Proteinase A (Pep4p) und Proteinase B (Prb1p), ATG22 und den Lipasen Cvt17p und ATG15 kann der gesamte vakuoläre Inhalt mittels Hydrolasen abgebaut werden.

## 1.8 AUTOPHAGIE UND MÖGLICHE STRATEGIEN DER THERAPEUTISCHEN INTERVENTION

Der Tumorentstehung kann eine verringerte autophagische Aktivität zu Grunde liegen. Jüngste Studien zeigten, dass mit der Abnahme der autophagischen Aktivität, sowohl das Tumorstadium, als auch der Differenzierungsgrad des Tumors korreliert. (Kondo et al., 2005, Meijer and Codogno, 2006).

Eine Überaktivierung des autophagischen Prozesses führt meist zum autophagischen Zelltod, wohingegen eine Inhibierung autophagischer Prozesse mit einer erhöhten Stress-Sensitivität einher geht (Gozuacik und Kimchi, 2004; Codogno und Meijer, 2005). Maligne Gliome sind durch ihr erhöhtes infiltratives Wachstum in das Parenchym und speziell durch ihre Resistenz gegenüber Apoptose zu charakterisieren. Daher sprechen radiotherapeutische und chemotherapeutische Behandlungen kaum an. Zu Grunde liegen spezielle intrazelluläre Signalwege, die über PI3K/AKT und den Hauptregulator mTOR reguliert sind, die meist in Gliomen den autophagischen Signalweg ausschalten und wodurch ebenfalls eine Resistenz gegenüber Autophagie entwickelt werden kann. TMZ, welches als klinisches Therapeutikum verwendet wird, zeigt eine zytotoxische Wirkung, da der autophagische Prozess über diese Substanz in Glioblastomen ausgelöst werden kann. Daher scheint Autophagie (Typ II-Zelltod) ein geeignetes Werkzeug zu sein, um die ausgeprägte Resistenz gegenüber Radiochemotherapie in Glioblastomen zu überwinden (Takeuchi et al., 2005; Lefranc und Kiss, 2006; Jiang et al., 2007).

Jüngste Entdeckungen zeigten, dass anti-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieder einen Komplex mit Beclin1/ATG6 bilden können (Shimizu et al., 2004; Pattingre et al., 2005; Maiuri et al., 2007b; Oberstein et al., 2007). Diese Formation bzw. Dissoziation des Komplexes aus Bcl-2 bzw. Bcl-xL und Beclin1 könnte eine entscheidende Rolle in der Modulation der Autophagie in Tumorzellen spielen. Proteine der Bcl-2-Subfamilie (sowohl Bcl-2, Bcl-xL, als auch Mcl-1) sind in der Lage, Beclin1 aus dem Prozess der Autophagie durch Bindung ihrer BH3-Domäne zu sequestrieren. Über die Bindung, und deren Komplexbildung, die für die Induktion der Vesikelbildung notwendig ist, kann der autophagische Prozess unterdrückt werden (Shimizu et al., 2004; Pattingre et al., 2005; Maiuri et al., 2007b). Daher wäre es eine mögliche Strategie, diese in Gliomen überexprimierten Bcl-2-Proteine (Hetschko et al., 2008) spezifisch zu inhibieren, um den Zelltod über autophagische Signalkaskaden voran zu treiben.



*Abbildung 7:* Schema des autophagischen Prozesses, der über pharmakologische Inhibitoren und Repression bestimmter ATG-Proteine beeinflusst werden kann. Der autophagische Prozess wird in der Zelle über längeren Nährstoffmangel eingeleitet. Zum anderen kann die Autophagie durch den mTOR-Inhibitor Rapamycin und seine Derivate eingeleitet werden. BH3-Mimetika, die spezifisch anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder, wie Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 und Bcl-w inhibieren, aktivieren die Freisetzung von Beclin1, und somit die Bildung des präautophagosomalen Struktur (PAS), worauf die Bildung der Isolatonsmembran und folglich des Autophagosoms resultiert. Die äußere Membran fusioniert mit dem Lysosom und setzt den inneren Vesikel (autophagischer Körper) in das Lumen frei. Die in dem Lysosom enthaltenen Enzyme degradieren die eingeschlossenen Zellbestandteile in Aminosäuren, Lipide und Nukleinsäuren. Dieser Prozess kann an verschiedenen Punkten blockiert werden. Die Bildung des PAS und der Isolatonsmembran kann sowohl über die Repression verschiedener ATG-Gene, als auch über PI3K-Inhibitoren, wie Wortmannin und 3-MA verhindert werden. Die Fusion von Autophagosom und Lysosom, mit der darauf folgenden Bildung des Autolysosoms, wird durch Gabe von Bafilomycin A1, Pepstatin A und E64d gehemmt. Vereinfacht und modifiziert nach (Mizushima et al., 2010; Klionsky et al., 2008).

Um gezielt dieser Frage nachzugehen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit spezifische Inhibitoren, sogenannte BH3-Mimetika eingesetzt. Diese konkurrieren mit der BH3-Domäne pro-apoptotischer Multidomänen bzw. BH3-only-Proteine um die Bindetasche der Bcl-2 Proteine. Die damit einhergehende Blockade führt somit zur Aktivierung sowohl der Apoptose, als auch der Autophagie (Maiuri et al., 2007b; Lessene et al., 2008).

Tabelle 2: Übersicht der Bcl-2-Familienprotein-Inhibitoren (BH3-Mimetika). Modifiziert nach Kang und Reynolds 2009 (Kang et al., 2009).

Substanz	Bindungsprofil	Klinische Phase
HA14-1	Bcl-2	Präklinisch
BH3I-2'	Bcl-2, Bcl-xL	Präklinisch
ABT-737	Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w	Phase I
Gossypol (AT-101)	Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1	Phase I/II

BH3-Mimetika besitzen unterschiedlichste Bindungsprofile (Kang et al., 2009). Die meisten von ihnen binden Bcl-2 und Bcl-xL (Lessene et al., 2008; Kang und Reynolds, 2009). HA14-1 inhibiert Bcl-2 (Wang et al., 2000), während BH3I-2' sowohl Bcl-2 als auch Bcl-xL inhibieren kann (Degterev et al., 2001; Feng et al., 2003). Darüber hinaus kann ABT-737 die Proteine Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w inhibieren (Degterev et al., 2001; Feng et al., 2003). Neben den synthetisch hergestellten Inhibitoren, gibt es einen weiteren Inhibitor, Gossypol, der aus der Baumwollpflanze gewonnen wird. Aktuelle Studien (sowohl *in vitro* als auch *in vivo*) zeigten, dass der Einsatz von Gossypol pro-apoptotische Wirkung entfaltet (Wolter et al., 2006; Ko et al., 2007; Meng et al., 2008; Paoluzzi et al., 2008). Als Inhibitor aller Bcl-2-Proteine (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w und Mcl-1), wird Gossypol, auch als Pan-Bcl-2-Inhibitor bezeichnet (Lessene et al., 2008; Kang und Reynolds, 2009). Das Racemat ((+)-Gossypol) besteht aus einem äquimolaren Gemisch (1:1, d.h. (+)-Gossypol: (-)-Gossypol) beider Enantiomere. Dahingegen besteht das (-)-Gossypol zu 100% aus dem (-)-Enantiomer. Das (-)-Enantiomer ist als die potentere Form beschrieben worden (Lessene et al., 2008), die unter anderem in Krebszellen mit intakter apoptotischer Maschinerie apoptotischen Zelltod auslösen konnte (Wolter et al., 2006; Balakrishnan et al., 2008). Eine Mono-Therapie mit (-)-Gossypol, auch als AT-101 bezeichnet, kann in anderen Krebsarten effektiv einen Zelltod induzieren (Lessene et al., 2008; Kang und Reynolds, 2009) und wurde bereits in klinischen Studien zur Therapie des Glioblastoms der Phase I (Verträglichkeit und Sicherheit des Medikaments) und Phase II (Überprüfung des Therapiekonzepts, Findung der geeigneten Dosis) verwendet (Liu et al., 2009). Darüber hinaus wurde schon in anderen klinischen Studien mit AT-101 die Phase III eingeleitet ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

## II ZIELSETZUNG

Die hohe Zelltodresistenz maligner Gliome und das damit einhergehende mangelnde Ansprechen auf Bestrahlung und Chemotherapie beruht auf Störungen verschiedener zellulärer Mechanismen und molekularer Signalkaskaden. Daher besteht besonderes Interesse, die Mechanismen in Tumorzellen zu verstehen, die die Apoptose-Resistenz fördern und somit Zellen vor dem Zelluntergang schützen. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die Frage, welche Proteine der anti-apoptotischen Bcl-2-Subfamilie zu der zellulären Apoptose-Resistenz von malignen Gliomen beitragen, und wie diese Resistenz auf zellulärer und molekularer Ebene reguliert wird.

Anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder können einerseits den Signalweg der Apoptose, zum anderen aber auch die Signalkaskade der Autophagie regulieren und unterdrücken. Die zentrale Hypothese dieser Arbeit lautet, dass es Gliomzellen aufgrund der modularen Fähigkeit der Bcl-2 Proteine und ihrer erhöhten Expression gelingt, eine Resistenz gegenüber Tumortherapien zu entwickeln. Über eine Blockade der anti-apoptotischen Familienmitglieder der Bcl-2-Familie sollen die molekularen Grundlagen der Resistenz untersucht werden, um darüber hinaus neue Strategien zu entwickeln, die Gliomzellen in den Zelltod zu treiben. Ein Hauptaspekt der vorliegenden Arbeit besteht in der therapeutischen Relevanz der Autophagie und des autophagischen Zelltodes in Gliomzellen.

Für die Blockade der Bcl-2-Proteine werden verschiedene niedermolekulare Inhibitoren, so genannte BH3-Mimetika eingesetzt. BH3-Mimetika sind spezifische Inhibitoren der Bcl-2-Familie, die über ihre hohe Affinität zur Bindungstasche der Bcl-2-Proteine binden und diese dadurch blockieren. Jeder dieser Inhibitoren hat ein spezifisches Bindungsprofil, wodurch jeweils nur ein, zwei, drei oder alle vier Proteine der Subfamilie, die partiell redundante Funktionen erfüllen, spezifisch reprimiert werden. Aufgrund der eingeschränkten Wirkungsweise von BH3I-2<sup>1</sup>, HA14-1 und ABT-737, welche nur eines bis drei der vier Proteine inhibieren, sprechen Gliomzellen möglicherweise nur limitiert auf eine Monobehandlung mit diesen Substanzen an. Es sollen daher auch Experimente mit dem Pan-Bcl-2-Inhibitor (-)-Gossypol durchgeführt werden, der alle vier Bcl-2-ähnlichen Proteine inhibieren kann, und dessen therapeutisches Potential soll in experimentellen *in vitro* Gliommodellen untersucht werden. Gliale Tumoren ohne eine MGMT-Methylierung (MGMT-defizient) zeigen im Vergleich zu Tumoren mit einer Methylierung des MGMT-Promotors eine höhere Sensitivität gegen das alkylierende Agens Temozolomid (Temodal). Die Herausforderung besteht darin, klinische Tumortherapien mit Temozolomid mit neuen, zielgerichteten Strategien zu kombinieren, um die therapeutischen Effekte konventioneller klinischer Therapien zu optimieren.

## III MATERIAL

### 3.1 ZELLINIEN

Table 3: ZELLINIEN

Bezeichnung	Beschreibung zur Herkunft
Astrozyten (Ratte)	Unilever Wistar Ratten ~40d
LNT-229	humane Gliomzelllinie (Grad IV), aus Explantat eines primären Glioblastoms, p53-Mutante (Wischhusen et al., 2003)
MZ-18	humane Gliomzelllinie (Grad IV), aus Explantat eines primären Glioblastoms <sup>1</sup>
MZ-54	humane Gliomzelllinie (Grad IV), aus Explantat eines sekundären Glioblastoms <sup>1</sup>
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)
U87	humane Gliomzelllinie (Grad III/IV), p53-Wildtyp (Asai et al., 1994)

### 3.2 ANTIKÖRPER

Table 4: PRIMÄR-ANTI-KÖRPER

Bezeichnung	Typ		Molekulares Gewicht [kb]	Anwendung	Verdünnung	Hersteller	Katalog-Nummer
anti-ATG5	Kaninchen	polyklonal	55	WB	1:500	Cell Signaling	3738
anti-Bak	Maus	monoklonal	21	WB	1:200	Santa Cruz	sc-832
anti-Bax (6A7)	Maus	monoklonal	30	IF	1:200	Santa Cruz	sc-7480
anti-Bax	Kaninchen	polyklonal	30	WB	1:200	Upstate	06-499
anti-Bcl-w	Kaninchen	polyklonal	20	WB	1:200	Stressgen Bioreagents	AAP-050
anti-Bcl-xL	Kaninchen	polyklonal	26	WB	1:500	BD Transduction Laboratories	610211
anti-Bcl-2	Maus	monoklonal	29	WB	1:50	Santa Cruz	sc-509
anti-Bec1	Kaninchen	polyklonal	60	WB	1:500	Cell Signaling	2630
anti-Cytochrom c	Maus	monoklonal	15	IF	1:50	BD Pharmingen	556432
anti-GAPDH	Maus	monoklonal	36	WB	1:10000	Abcam	ab8245
anti-LC3	Kaninchen	monoklonal	18 und 16	WB	1:1000	Sigma-Aldrich	L8918
anti-Mcl-1	Kaninchen	polyklonal	40	WB	1:200	Santa Cruz	sc-819
anti-mTOR	Kaninchen	polyklonal	289	WB	1:1000	Cell Signaling	2972
anti-p62 (Ick ligand)	Maus	monoklonal	62	WB	1:2000	BD Transduction Laboratories	610833
anti-Tubulin	Maus	monoklonal	50	WB	1:1000	Sigma-Aldrich	T9026

Tabelle 5: SEKUNDÄR-ANTIKÖRPER

Bezeichnung		Anwendung	Verdünnung	Hersteller	Katalog-Nummer
anti-Kaninchen	IgG, HRP-konjugiert	WB	1:10000	Jackson Immuno Research	111-035-045
anti-Maus	IgG, HRP-konjugiert	WB	1:10000	Jackson Immuno Research	115-035-062
anti-Maus	Cy2	IF	1:500	Jackson Immuno Research	88409
anti-Maus	Cy3	IF	1:500	Jackson Immuno Research	84979

### 3.3 PLASMIDE

Tabelle 6: PLASMIDE

Plasmide	codiert für human-	Vektor/Größe [bp]	Hersteller
EGFP-Bax	Bax (630bp)(Kogel et al., 2001)	pEGFP-C1 (4700 bp)	im Vorfeld in der Arbeitsgruppe Kögel hergestellt
EGFP-LC3	LC3 (Kabeya et al., 2000)	pEGFP-C1 (4700 bp)	im Vorfeld in der Arbeitsgruppe Kögel hergestellt
mRFP-EGFP-LC3	LC3 (Kimura et al., 2007)	pmRFP-EGFP-rLC3 (5900 bp)	AG Yoshimori
mRFP-Mito	Mitochondrien	pDsRed1-C1 (4700 bp)	BD Biosciences
TOPO-Mcl-1	Mcl-1 (~1000bp) (Maurer et al., 2006)	pcDNA3.1/V5-His-TOPO (5523 bp)	AG Maurer

### 3.4 BAKTERIENSTAMM

Tabelle 7: BAKTERIENSTAMM

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller	Katalog-Nummer
<i>E.coli</i> - DH5- $\alpha$	F- $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) <i>pboAsupE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> $\lambda$ -	Invitrogen	18265-017

### 3.5 OLIGONUKLEOTIDE

Tabella 8: si-RNA-OLIGONUKLEOTIDE

Bezeichnung	NM-ID	Hersteller	Katalog-Nummer
non-Targeting siRNA		Thermo Scientific Dharmacon	D-001210-01-20
ATG5	nm_004849	Thermo Scientific Dharmacon	D-004374-03-0010 D-004374-06-001
Beclin1	nm_003766	Thermo Scientific Dharmacon	D-010552-02-0010 D-010552-04-0010
Bcl-2	nm_000633	Thermo Scientific Dharmacon	D-003307-01-0010 D-003307-04-001
Bcl-xL	nm_138578	Thermo Scientific Dharmacon	D-003458-01-0010 D-003458-04-0010
Silencer FAM labeled Negativ Kontrolle #1 siRNA		Ambion	AM4620

### 3.6 LENTIVIRALE TRANSDUKTIONSPARTIKEL

Tabella 9: LENTIVIRALE TRANSDUKTIONSPARTIKEL

Bezeichnung	NM-ID	Vektor	Titer	Beschreibung	Produkt-Beschreibung	Hersteller
Negativkontrolle		pLKO.1-puro-control	$\sim 1 \times 10^7$	Mission-ShRNA-Transduktions Partikel	SHC001V	Sigma-Aldrich
ATG5	nm_004849	pLKO.1-puro	$\sim 1 \times 10^7$	Mission-ShRNA-Transduktions Partikel	SHVRS	Sigma-Aldrich
Beclin1	nm_003766	pLKO.1-puro	$\sim 1 \times 10^7$	Mission-ShRNA-Transduktions Partikel	SHVRS	Sigma-Aldrich
Bcl-xL	nm_001191	pLKO.1-puro	$\sim 1 \times 10^7$	Mission-ShRNA-Transduktions Partikel	SHVRS	Sigma-Aldrich
Bcl-2	nm_000633	pLKO.1-puro	$\sim 1 \times 10^7$	Mission-ShRNA-Transduktions Partikel	SHVRS	Sigma-Aldrich
Mcl-1	nm_021960	pLKO.1-puro	$\sim 1 \times 10^7$	Mission-ShRNA-Transduktions Partikel	SHVRS	Sigma-Aldrich

### 3.7 ZELLKULTURMEDIEN

Tabelle 10: ZELLKULTURMATERIALIEN

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nummer
Basalmedium Eagle (BME)	Invitrogen	41010-026
D-MEM F12	Invitrogen	11039-021
D-MEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium) 4,5 g/L Glucose	Invitrogen	61965-026
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen	10270-106
L-Glutamin	Invitrogen	25030-024
Opti-MEM I Serumreduziertes Medium	Invitrogen	11058-021
Penicillin-Streptomycin-Lösung (Pen/Strep)	Invitrogen	15140-122
Trypsin-EDTA	Invitrogen	25200-056

### 3.8 SUBSTANZEN

Tabelle 11: SUPPLEMENTE, CHEMIKALIEN & VERBRAUCHSMATERIALIEN

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nummer
Acrylamide-Bis Lösung (37,5:1) 40% [PAA]	Serva	10681
APS (Ammoniumpersulfat)	AppliChem	A2941
Ampicillin sodium salt	Sigma-Aldrich	10044
Aprotinin	AppliChem	A2132,0010
BM Cyclin	Roche	10 799 050 001
BSA (Albumin bovine serum), Säure frei	Sigma-Aldrich	A-7511
Caspase-3-Substrat [Ac-DEVD-AMC]	Alexis	260-031-M005
CHAPS (3-[3-Cholamidopropyl]-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat)	AppliChem	A1099,0010
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth	A994.1
D-PBS (Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung), mit Ca und Mg	Invitrogen	14080-048
DTT (Dithiothreitol)	AppliChem	A1101,0010
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat (Ethylendiamintetraacetat)	AppliChem	A2937
EGTA (Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure/ C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> )	AppliChem	A0878
FACS clean	BD Biosciences	340345
FACS FLOW	BD Biosciences	342003
FACS Shutdown solution	BD Biosciences	334224
GasPAK EZ Anaerobic System	BD Biosciences	260628
Geneticin selektives Antibiotikum	Invitrogen	10131-027
Gentamicin 10 mg/ml	Invitrogen	15710-049
Glycerin (Glycerol)	Sigma-Aldrich	A2926,1000
HEPES >99% für Gewebekultur (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	intern	130102
HBSS (Hepes Buffered Saline Solution)	Cambrex	CC-5024
Kanamycin sulfate	Sigma-Aldrich	60615
Leupeptin Hemisulfat	AppliChem	A2183,0010

Lipofectamine 2000	Invitrogen	11668-027
Luria Agar (Miller's LB Broth Base)	Invitrogen	12945-036
Luria Broth Base (Miller's LB Broth Base)	Roth	x968.1
Metafectene	Biontex	T020-1.0
Methanol	Sigma-Aldrich	32213
Milchpulver, Blotting grade	Roth	T145.2
Oligofectamine	Invitrogen	12252-011
Papain	Sigma-Aldrich	P4762
PBS Puffer (nach Dulbecco-) Pulver (phosphate buffered saline)	AppliChem	A0964,9100
Pepstatin A	AppliChem	A2205,0010
PermaFluor Mounting Medium	Beckman Coulter	PN IM 0752
PFA (Paraformaldehyd)	Merck	1.040.051.000
Pferedeserum (Horse Serum, HS)	Invitrogen	16050-122
PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride)	Sigma-Aldrich	P7626
Polybren (Hexadimethrin Bromid)	Sigma-Aldrich	H9268
Puromycin	Calbiochem	540222
Roti-Quant UN 1760	Roth	Ko15.1
SDS (Dodecylsulfat-Na)	MP Biomedicals	811030
See Blue Plus 2 Prestained Standard	Invitrogen	LC5925
$\beta$ -Mercaptoethanol-2 pA	Sigma-Aldrich	M3148
Staurosporine [Antibiotic AM-2282]	Alexis	380-014-M001
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich	T9281
Triton x-100 for molecular biology	Sigma-Aldrich	T8787
Trypan Blue Stain 0,4%	Bio Whittaker	17-942E
Tween 20	Sigma-Aldrich	P1379
2-Propanol (Isopropanol)	Sigma-Aldrich	33539
45% Glucose	Sigma-Aldrich	G8769

Tabelle 12: PHARMAKA, CYTOKINE, INHIBITOREN

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nummer
ABT-737	Symansis	852808-04-9
Bafilomycin A1	Sigma-Aldrich	B1793
BH3I-2'	Calbiochem	286891
HA14-1	Calbiochem	371971
N-acetyl-D-erythro-Sphingosine (C2-Ceramid)	Calbiochem	110145
Rapamycin	Sigma-Aldrich	R-0395
Temozolomid (TMZ)	Sigma-Aldrich	T2577
Vincristin	Sigma-Aldrich	V8879
(-)-Gossypol	Biomol	nicht kommerziell erhältlich
(+)-Gossypol	Sigma-Aldrich	G8761

Tabelle 13: PROTEINMARKER SDS-PAGE

Bezeichnung	Größen (kDa)	Hersteller	Katalog-Nummer
Precision Plus Protein Dual	250, 150, 100, 75 (rot), 50, 37, 25 (rot), 20, 15, 10	Biorad	161-0374

### 3.9 KITS

Tabelle 14: KITS

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nummer
CaliBRITE Beads	BD Biosciences	340486
ECL Enhanced Chemiluminescence	Pierce/Perbio Science	34080
Endo Free Plasmid Kit Maxi (10)	Qiagen	12362
MicroBC Assay Reagent Kit	Uptima, KMF	UP75860 A
RNase-Free DNase Set	Qiagen	79254
RNeasy Midi Kit	Qiagen	75142
siIMPORTER Kit	Upstate	64-101
MycTrace PCR Detection Kit	PAA	Q050-020

### 3.10 FLUORESZENZFARBSTOFFE

Tabelle 15: FLUORESZENZFARBSTOFFE

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nummer
Annexin-V-Fluos	Roche	1828681
Lysotracker-Red-DND-99	Invitrogen/Molecular Probes	L-7528
Propidiumiodid (PI)	Invitrogen/Molecular Probes	P-1304
Tetramethylrhodaminmethylester (TMRM)	Invitrogen/Molecular Probes	T-668
TO-PRO-3	Invitrogen/Molecular Probes	T3607

Tabelle 16: EXCITATIONS-,EMISSIONSSPEKTREN DER FLUOROPHORE

Fluorophore	Excitation	Emission
Tetramethylrhodaminmethylester (TMRM)	543	580
Lysotracker Red DND-99	577	590
Annexin-V-Fluos	488	518
Propidiumiodid (PI)	536	617
TO-PRO-3	642	662
Cy2, Cyanin	488	509
Cy3, Cyanin	554	568
engl. Green-Fluorescent Protein (GFP)	488	509

### 3.11 GERÄTE

Tabelle 17: LABORGERÄTE

Bezeichnung	Hersteller
Anoxiekammer (Gaspak Large Anaerobic System)	BD Biosciences
Autoklav Systec 2540 EL	Wettenberg
Autoklav Varioklav	Biomedis, Gießen
BD FACS Canto II V96100345	BD Biosciences
Bio Rad Mini Protean Tetra cell	Biorad
Bio Rad Power Pac HC	Biorad
Bio Rad Transblot SD Semi-dry -Transfer-Cell	Biorad
BL1500S Waage	Sartorius
Cleanbench (Heraeus)	Heraeus
Clenbench (TECNOFLOW)	Integra Biosciences
Falkonroller Typ RM 5	Karl Hecht KG
Gelstand für SDS-Page	Biorad
Geltrockner	Biorad
Gene Quant	Biochrom
Heraeus Wärmeschrank (Bakterienkultur)	Heraeus

---

Hera Cell 150 Zellkulturschrank	Haraeus
Inversmikroskop Eclipse TE300	Nikon
Milli-Q Q-Gard 1-Reinstwasseranlage	Millipore
Mini Spin Tischzentrifuge	Eppendorf
Nikon C1 i Konfokales Mikroskop	Nikon, NY, USA
Nikon Eclipse TS100	Nikon
Nikon Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE2000-S	Nikon
Phero-Temp 60	Biotec Fischer
pH-Meter Lab850	Schott instruments
Sanjo CO2 Inkubator	Thermofisher
Schüttelinkubator	New Brunswick
Schwenkgerät GFL 3014	GFL
TE313-DS Feinwaage	Sartorius
Tecan Reader Genios	Genios
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischschüttler Typ KM-2	Edmund Bähler
Tischzentrifuge Biofuge	Stratos
Tischzentrifuge fresco	Kendro
Wärmeschrank	WTB Binder
Wasserbad 10L	Minitüb

## 3.12 ZUSAMMENSETZUNG: PUFFER, NÄHRMEDIEN &amp; STAMMLÖSUNGEN

Tabelle 18: CASPASE-3-AKTIVITÄTSMESSUNG

<i>Lyspuffer</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>frische Zugabe</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>
	10 mM	HEPES pH 7,4		1 mM	DTT
	42 mM	KCl		5 µg/mL	Aprotinin
	5 mM	MgCl <sub>2</sub> [6H <sub>2</sub> O]		1 µg/mL	Leupeptin
	0,1 mM	EDTA		1 µg/mL	Pepstatin A
	10 mM	HEPES pH 7,4		1 mM	PMSF
	0,50%	CHAPS			
<i>Reaktionspuffer</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>frische Zugabe</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>
	25 mM	HEPES pH 7,4		3 µL/mL	DTT
	1 mM	EDTA		10 µM	Caspase-3 Substrat (DEVD)
	0,10%	CHAPS			
	10%	Sucrose			

Tabelle 19: DURCHFLUSSZYTOMETRIE

<i>HEPES-Puffer</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>frische Zugabe</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>
	10 mM	Hepes/NaOH pH 7,4		0,8 µL	Annexin-V-Fluos (Stocklösung)
	140 mM	NaCl		0,05 µg/µL	Propidium-Iodide
	5 mM	CaCl <sub>2</sub>		30 nM	TMRM
	500 mL	add H <sub>2</sub> O		25 nM	Lysotracker-DND-99

Tabelle 20: IMMUNFLUORESZENZ

<i>Blocklösung</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>
	5%	HS
	0,30%	Triton-x-100
<i>Antikörperlösung</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>
	1%	HS
	0,30%	Triton-x-100

Tabelle 21: SDS-PAGE/IMMUNOBLOT

<i>Blocklösung zum Absättigen bzw. Verdünnen von Antikörpern</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>
	3, 5% (w/v)	Milchpulver
	50 mM	Tris
	150 mM	NaCl
	0,05%	Tween
	500 mL	add H <sub>2</sub> O

<i>SDS-PAGE-Lysepuffer</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>frische Zugabe</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>
	1 37 mM	Tris/HCl pH 6,8		1:100	Phosphatase-Inhibitor
	4%	10% SDS		1:100	Protease-Inhibitor
	2 g (w/v)	Glycerin			
	10 mL	add H <sub>2</sub> O			
<i>SDS-PAGE: Trenngel</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>			
	8, 10, 12, 15%	40% PAA (37,5:1)			
	375 mM	Tris (pH 8,8)			
		add H <sub>2</sub> O			
	0,10%	SDS			
	0,10%	APS			
	0,05%	TEMED			
<i>Transferpuffer: Semi-Dry-Blot (Towbin-Puffer) pH 8,2</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>frische Zugabe</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>
	25 mM	Tris		0-20%	Methanol
	192 mM	Glycin			
	800 mL	add H <sub>2</sub> O			
<i>Tris Buffered Saline (TBS) pH 7,5</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>			
	50 mM	Tris			
	150 mM	NaCl			
	1000 mL	add H <sub>2</sub> O			
<i>Western-Elektrophoresepuffer (WEP) pH 8,9</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>			
	25 mM	Tris			
	192 mM	Glycin			
	0,1% SDS	SDS			
	1000 mL	add H <sub>2</sub> O			
<i>5x Bromphenolblauladepuffer</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>			
	1,25 M	Tris/HCl pH 6,8			
	1 g	SDS			
	5 g (w/v)	Glycerin			
	10 mL	add H <sub>2</sub> O			
<i>5% SDS-Sammelstocklösung</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>frische Zugabe</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>
	5%	40% PAA (37,5:1)		0,10%	APS
	120 mM	Tris/HCl pH 6,8		0,05%	TEMED
	0,10%	10% SDS			
	100 mL	add H <sub>2</sub> O			

Tabelle 22: TRANSFORMATION

<i>Bakterienagarplatten</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>frische Zugabe</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>
	18,5 g	Luria Agar		100µg/µL	Kanamycin
	500 mL	add H <sub>2</sub> O		100µg/µL	Ampicillin
<i>Bakteriennährmedium</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>frische Zugabe</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>
	22,5 g	Luria Broth Base		100µg/µL	Kanamycin
	900 mL	add H <sub>2</sub> O		100µg/µL	Ampicillin

Tabelle 23: ZELLKULTURNÄHRMEDIEN

<i>Astrozyten-Zellmedium (Ratte)</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>
	500 mL	BME-Medium
	10%	FCS
	1%	L-Glutamin
	0,5%	Pen/Strep
	0,22%	45% Glukose
<i>Glioblastom-Zellmedium</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>
	500 mL	DMEM-Medium 4,5g/L
	10%	FCS
	1%	L-Glutamin
	1%	Pen/Strep

Tabelle 24: ALLGEMEINE PUFFER

<i>Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,5</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>
	9,55 g/L	PBS-Pulver
	1000 mL	add H <sub>2</sub> O

### 3.13 SOFTWARE

Tabelle 26: SOFTWARE

<i>Bezeichnung</i>	<i>Funktion</i>	<i>Hersteller/Internet-Bezug</i>
Adobe Acrobat 9	Bearbeitung von PDF-Dateien	Adobe
Adobe Illustrator CS3	Erstellung von Abbildungen und Präsentationen	Adobe
Adobe Photoshop CS3	Bildbearbeitung	Adobe
Endnote 10	Literaturverwaltung	Thomson ISI ReasearchSoft
FACS DIVA	Auswertung und Darstellung von FACS-Analysen	BD Biosciences
Image J	Quantitative Bildanalyse	<a href="http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html">http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html</a>
Microsoft Office 2007	Textverarbeitung, Tabellenkalkulation, Erstellung von Präsentationen	Microsoft, Redmond, USA
Mod Fit 3.2	Auswertung und Darstellung von Zellzyklus-FACS-Analysen	Verity <a href="http://www.vsh.com/">http://www.vsh.com/</a>
Nikon Konfokale EZ-C1 Software	Auswertung und Darstellung von konfokalen Aufnahmen	Nikon, NY, USA
Primer3	Primerdesign- und Suche	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/primer3/">http://frodo.wi.mit.edu/primer3/</a>
SPSS 17.0	Statistische Auswertung	SPSS, München

## IV METHODEN

Bei der Benutzung von Agentien und Kits verschiedener Hersteller wurde grundsätzlich gemäß beiliegender Angaben und Protokolle verfahren, soweit nicht anders vermerkt.

### 4.1 KULTIVIERUNG VON ZELLEN, ALLGEMEIN

Die Kultivierung von Zellen erforderte sterile Bedingungen, um Kontaminationen durch Bakterien, Pilzen, Hefen oder Mykoplasmen zu vermeiden. Daher wurden alle Zellkulturarbeiten an speziell dafür vorgesehenen sterilen Arbeitsplätzen durchgeführt. Zusätzliche Verwendung von gammabestrahlten Zellkulturmaterialien wie Kulturflaschen, Kulturschalen, Pipetten, Zentrifugenröhrchen erhöhten den Schutz vor Kontaminationen.

### 4.2 PRÄPARATION AUS RATTEN STAMMENDER ASTROZYTEN

Für die Isolierung von Astrozyten wurden Gehirne postnatalen Wistar Unilever Ratten aus dem Schädel der dekapitierten Ratten entfernt und in frischen 4 °C BME Basal Medium zwischengelagert. Die in dem Medium gelagerten Gehirne wurden von Ihren Hirnhäuten befreit und in ihre Hemisphären zerlegt. Anschließend wurden die Kortices in BME-Medium zunächst durch ein Zellsieb mit einer Maschengröße von 250 µm- und danach durch eines mit einer Maschengröße von 150 µm gedrückt und durch wiederholtes Aufziehen mit einer 5 mL Pipette tituiert. Die dadurch vereinzelt Zellen werden in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und für 3 min bei 200 x g sedimentiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation verworfen und das Zellpellet mit frischem Medium versetzt und anschließend in ein dafür vorgesehenes mit Poly-D-Lysin beschichtetes großes Zellkulturgefäß überführt. Nach Ablauf von fünf Tagen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

### 4.3 KULTIVIERUNG VON GLIOMZELLINIEN UND AUS RATTEN STAMMENDEN ASTROZYTEN

Zellkulturen aus humanen Gliomzelllinien, wie LNT-229, MZ-18, MZ-54, U251, U343, U373 und U87, bzw. die aus Ratten stammenden Astrozyten wurden bei 37 °C unter einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Das eingesetzte fötale Kälberserum wurde zuvor bei 56 °C für 30 min inaktiviert und gefiltert (Filterporengröße 0,22 µm). Das Gliomzellkulturmedium DMEM mit 4,5 g/L Glukose enthielt 10% fötales Kälberserum, 1% Streptomycin/Penicillin und 1% L-Glutamin. Dahingegen enthielt das Ratten Astrozytenmedium BME 10% fötales Kälberserum, 0,5% Streptomycin/Penicillin, 1% L-Glutamin und 1,11mL 45% Glukose.

#### 4.4 SUBKULTIVIERUNG ADHÄRENT WACHSENDER GLIOMZELLINIEN UND ASTROZYTEN

Zur Subkultivierung adhärent wachsender Zellen wurde das alte Medium verworfen und die Zellen mit PBS (ohne  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ ) gewaschen. Dadurch konnten alle Zelltrümmer, sowie Reste des Serums entfernt werden. Je nach Größe des Monolayers wurde dieser mit einer entsprechenden Menge an Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und bei 37 °C für 3 min im Brutschrank inkubiert. Nach vollständiger Ablösung der Zellen wurden die Zellen in serumhaltigem Medium aufgenommen, um die durch das Trypsin verursachte Enzymreaktion zu stoppen. Dies geschieht durch die ausreichende Menge an Trypsin-Inhibitor im Serum. Durch mehrmaliges Abspülen mit Medium wurden alle Zellen von der Zellkulturunterlage gelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 200 x g für 3 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und anschließend die Zellzahl mittels Neubauer-improved-Zählkammer bestimmt. Die erforderliche Menge an Zellen wurden für die Subkultivierung in die dafür vorbereiteten Zellkulturgefäße überführt, mit der erforderlichen Menge an Medium versehen und im Inkubator platziert.

#### 4.5 KULTIVIERUNG VON STABIL TRANSFIZIERTEN BZW. TRANSDUZIERTEN GLIOMZELLINIEN

Die stabil mit GFP-LC3 transfizierten Gliomzelllinien wurden zusätzlich mit Geneticin (G418) in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kultiviert. Dahingegen wurden die lentiviral transduzierten Zellen mit 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  Puromycin kultiviert. Die Zugabe der Antibiotika als Selektionsmarker ist wichtig, da sie die Effizienz des integrierten Plasmids bzw. der Geninhibierung durch shRNA aufrechterhalten.

#### 4.6 BESTIMMUNG DER ZELLZAHL

Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-improved-Zählkammer bestimmt. Aus der Suspension an Zellen und Medium wurden 9  $\mu\text{L}$  entnommen und unter das aufgelegte Deckglas seitlich der Zählkammer pipettiert. Anschließend wurden unter dem Inversionsmikroskop vier Großquadrate ausgezählt und daraus der Mittelwert bestimmt. Die Zellzahl bezogen auf einen Milliliter, errechnete sich aus der Anzahl der Zellen pro Großquadrat multipliziert mit dem Faktor  $10^4$  und dem Verdünnungsfaktor.

#### 4.7 EINFRIEREN VON ZELLEN (KRYOKONSERVIERUNG)

Die Lagerung von Zellen findet in der Gasphase (ca. -120 °C) von flüssigem Stickstoff statt. Zunächst werden die Zellen wie oben beschrieben von ihrer Zellkulturunterlage gelöst, vereinzelt und sedimentiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-improved-Zählkammer werden  $10^6$  Zellen in 500  $\mu\text{L}$  frischen Vollmedium resuspendiert und 1:1 mit Einfriermedium, bestehend aus 20% DMSO und 80%

FCS, versetzt und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zugabe von DMSO ist notwendig, da es die Bildung von Eiskristallen verhindert. Sorgfältig beschriftet und verschlossen wurde das Kryoröhrchen in die Einfrierhilfe überführt und zunächst bei -81 °C für zwei Tage gelagert. Der Mantel der Einfrierhilfe wurde mit Isopropanol befüllt, um ein langsames herunterkühlen der Zellsuspension (ca. 1 °C pro Minute) zu gewährleisten. Nach zwei Tagen konnten die Kryoröhrchen in den Stickstofftank überführt werden.

#### 4.8 AUFTAUEN VON ZELLEN

Für jedes aufzutauende Kryoröhrchen wurden zuvor 15 mL an frischem Medium in einem Zentrifugenröhrchen auf 37 °C erwärmt. Das Kryoröhrchen wurde unter sterilen Bedingungen geöffnet und durch schnelles wiederholtes Hinzufügen von warmem Medium auf das tiefgefrorene Zellsuspensat aufgetaut. Die flüssige Phase wurde umgehend abgenommen und in das Zentrifugenröhrchen überführt. Das vollständig aufgetaute Zellsuspensat wurde bei 200 x g für 3 min sedimentiert, um das zytotoxische DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellkulturgefäß so gewählt, dass sich eine theoretische 80%ige Konfluenz bei Überleben aller Zellen ergibt. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel vorgenommen um eventuelle DMSO-Reste vollständig zu entfernen.

#### 4.9 BESCHICHTUNG VON KULTURGEFÄßEN

Zur Züchtung primärer Kulturen, sowie zur Kultivierung von Gliomzellen für anstehende Experimente, die auf Einzelzellebene mittels Immunfluoreszenz durchgeführt werden sollen, bedarf es der Beschichtung mit polymerisierten Aminosäuren, wie Poly-D-Lysin. Poly-D-Lysin fördert die Vermittlung aus Adhäsion, Ausbreitung und Wachstum von Zellen. Die Zellkulturgefäße wurden für 30 min bei 37 °C mit Poly-D-Lysin inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellkulturgefäße können bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert und zum Ausbringen der Zellen verwendet werden.

#### 4.10 MYKOPLASMENTEST

Mykoplasmen leben parasitär, sind intra- bzw. extrazellulär lebende Bakterien, die beim Menschen, sowohl in Tier und Pflanze zahlreiche Krankheiten auslösen können. Sie können daher auch in Zellkulturen vorkommen. Experimente, die ein Zellüberleben oder die Zellviabilität nachweisen, können durch in der Zellkultur lebenden Mykoplasmen verfälscht werden. Vor allem, weil sie Tetrazoliumsalze, die bei einem MTT-Assay (4.15.2) verwendet werden, reduzieren (Kirchhoff et al., 1992). Daher wurden alle Zellkulturen vor Beginn jeglicher Experimente regelmäßig auf Mykoplasmen getestet. Für den Nachweis von Mykoplasmen wurde das PCR-Detektionskit von PAA verwendet und nach Herstellerangaben verfahren.

Bestand eine Infektion, wurden die kontaminierten Zellen direkt verworfen bzw. die Kulturen mit BM Cyclin (nach Herstellerangaben) für zwei Wochen behandelt. Nach Ablauf der BM Cyclin Behandlung wurde nochmals ein Testlauf auf Kontamination durchgeführt.

#### 4.11 NUKLEINSÄURE METHODIKEN

##### 4.11.1 PLASMIDPRÄPARATION (TRANSFORMATION)

Für die Transformation wurden 50 µl chemisch kompetente Bakterien des Stammes E.coli: DH5-alpha langsam auf Eis aufgetaut. Der zu transformierende Ligationsansatz (50-100 ng) wurde zu der Bakteriensuspension hinzugefügt und vorsichtig vermischt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurde ein Hitzeschock für 1 min bei 42 °C durchgeführt. Dies ist notwendig, um die Aufnahme des Plasmids in die Bakterien zu initiieren. Die Zellen wurden daraufhin für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium des jeweiligen Ansatzes wurden die Zellen unter leichtem Schütteln bei 300 rpm für eine Stunde ankultiviert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 1 min bei 15000 x g konnte das Zellpellet in 100 µl LB-Medium aufgenommen und anschließend verschiedene Volumina diesen Ansatzes auf mehrere Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) ausgestrichen werden. Die Bakterienplatten wurden über Nacht bei 37 °C in einem Wärmeschrank inkubiert.

##### 4.11.2 KULTIVIERUNG DER BAKTERIEN UND ISOLATION DER PLASMID-DNA

Nach Ablauf der der Inkubationszeit wurde mit einer sterilen Pipettenspitze eine möglichst freistehende, morphologisch einwandfreie Kolonie gepickt und diese in ein 5 mL LB-Selektionsmedium (LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum) überführt. Die Vorkultur wurde für 8-10 h bei 37 °C und 300 rpm geschüttelt und kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die gesamte Vorkultur in zwei mit 200 ml LB-Selektionsmedium 500 ml-Schikanenkolben überführt und über Nacht bei 300 rpm bei 37 °C geschüttelt und inkubiert. Nach der Inkubation wurde mit der Extraktion der Plasmid-DNA mit dem QIAGEN Qiafilter endo-free Plasmid Maxi Kit® entsprechend den Vorgaben des Herstellers begonnen.

##### 4.11.3 BESTIMMUNG DER REINHEIT UND KONZENTRATION AN PLASMID-DNA

Die Gesamt DNA wurde UV-photometrisch bei 280 nm vermessen. Der Reinheitsgrad des Präparates, der im optimalen Bereich zwischen 1,7 und 2,0 liegen sollte, wurde durch das A260/A280-Verhältnis bestimmt. Eine optische Dichte (OD) von Eins entsprach einer Konzentration von 50 µg/mL.

#### 4.12 INTEGRATION VON PLASMID-DNA MITTELS KATIONISCHER LIPIDE (TRANSFEKTION)

Für die Transfektion von adhärent wachsenden Zellen mussten die Zellen am Vortag in einer optischen Konfluenz von  $\sim 80\%$  ausgebracht werden. Generell wurde für die Transfektion mit kationischen Lipiden das kommerziell erhältliche Metafectene Pro verwendet. Jeder Transfektionsansatz für die entsprechende Plasmid-DNA enthielt 30  $\mu\text{L}$  Opti-MEM, 0,5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA und 2,5  $\mu\text{L}$  Metafectene Pro. Die DNA-Lipid-Komplexe wurden in einem FCS-freien Medium (Opti-MEM) durch Inkubation für 20 min gebildet. Nach Ablauf der Inkubation wurde der Transfektionsansatz auf 200  $\mu\text{L}$  mit Opti-MEM aufgefüllt und gemischt. Die ausgebrachten Zellen erhalten 300  $\mu\text{L}$  an frischem Opti-MEM und werden anschließend mit dem Transfektionsansatz auf ein Gesamtvolumen von 500  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. Nach vier Stunden wurden die DNA-Lipid-Komplexe entfernt und die Zellen erhielten ihr geeignetes Vollnährmedium. Nach Ablauf von 24 h konnten die transient transfizierten Zellen für weitere Experimente verwendet werden.

Tabelle 27: TRANSFEKTIONSANSATZ

Transfektionsansatz	Konzentration/Volumen	Zusammensetzung
	30 $\mu\text{L}$	Opti-MEM
	0,5 $\mu\text{g}$	Plasmid-DNA
	2,5 $\mu\text{L}$	Metafectene (Stocklösung)
	200 $\mu\text{L}$	add Opti-MEM nach Ablauf der Inkubationszeit

#### 4.13 SUBKLONIERUNG VON TRANSFIZIERTEN ZELLEN

Für die Generierung von stabilen Zellpopulationen aus einer hervorgegangenen Transfektion (4.12), werden die Zellen zunächst 2-3 Wochen in einem Selektionsmedium (100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  Geneticin) kultiviert. Alle Zellen, die die Integration des Plasmids in die Wirtszelle nicht aufweisen, daher auch nicht die entsprechende Resistenz aufweisen, sterben innerhalb dieser Zeit. Die überlebenden Zellklone, die die Geneticin-Resistenz aufwiesen, wurden vereinzelt auf 10 cm Schalen ausgebracht und wuchsen als Zellkolonien heran. Die Zellkolonien wurden auf der Unterseite der Kulturschale mit einem Stift markiert und mittels Inversionsmikroskop das Übereinstimmen der Position kontrolliert. Anschließend werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und zunächst trocken gezogen. Auf die Markierungen werden Klonierungsringe (5mm), deren unterer Rand mit Silikon überzogen ist, platziert. Anschließend folgte die Abtrypsinierung der umschlossenen markierten Kolonie, die nach Aufnahme mit Selektionmedium in eine Vertiefung einer 24-Loch Platte überführt wurde. Für jedes transfizierte Plasmid wurden mindestens sechs Klone einzeln heran gezogen, um daraus eine einwandfreie stabil transfizierte Zellkultur heranzuziehen.

#### 4.14 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODIKEN

##### 4.14.1 GESAMTZELLEXTRAKTION

Für die Gesamtzellextraktion wurden mindestens  $5 \times 10^5$  Zellen pro Behandlung in 6-Lochplatten ausgesät. Nach Abschluss der jeweiligen Behandlungen wurde der Monolayer vorsichtig einmal mit kaltem PBS gewaschen. Für die Lysierung der Zellen jeder einzelnen Behandlung wurden  $\sim 80 \mu\text{L}$  SDS-Lysepuffer verwendet. Mit dem Zellschaber wurden alle Zellen restlos von der Zellkulturoberfläche gelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, für 10 min bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  aufgekocht und anschließend für 10 min bei  $15.000 \times g$  zentrifugiert. Die Lysate konnten sofort für die diskontinuierliche SDS-PAGE weiterverarbeitet oder bei  $-21 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert werden.

##### 4.14.2 PROTEINGEHALTSBESTIMMUNG VON GESAMTZELLEXTRAKTEN

Der Proteingehalt von Gesamtzellextrakten wurde mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce/Perbio) nach Herstellerangaben bestimmt. Der BCA-Assay, der sogenannten Biuret-Reaktion, werden unter alkalischen Bedingungen  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch Peptidbindungen im Ansatz zu  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen reduziert. Im darauf folgenden Schritt bilden jeweils zwei Bichinonsäure (BCA)-Moleküle mit dem  $\text{Cu}^{1+}$ -Ion einen tiefvioletten, wasserlöslichen Komplex, dessen Absorptionsmaximum bei  $562 \text{ nm}$  liegt (Smith et al., 1985; Wiechelman et al., 1988). Anhand dieser Technik können Proteinmengen von  $0,2 - 50 \mu\text{g}$  errechnet werden. Für die Bestimmung des Proteingehaltes wurden die Proteinlysate entsprechend mit dem BCA Reagenz inkubiert und nach Erstellen der BSA-Standardkurve, mit bekannten Proteinkonzentrationen, konnte durch photometrische Messung der Proteingehalt ermittelt werden.

##### 4.14.3 DISKONTINUIERLICHE SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe und Ladung erfolgt in Acrylamidgelen nach der von Lämmli et al. (Laemmli, 1970) beschriebenen Methode. Das Proteinlysate wurde mit Natriumlaurylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfat, SDS) und  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt und bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  für 5 min erhitzt. Das verwendete  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken, das SDS bricht die Sekundär- und Tertiär-Strukturen der Proteine auf, zwingt diese in eine ellipsoide Form und führt durch Anlagerung zu einer negativen Gesamtladung des Proteins. Im elektrischen Feld werden die Proteine aufgetrennt und wandern entsprechend ihrer Gesamtladung, die proportional zu ihrer Größe ist. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden zwei Gele, ein Sammel- und ein Trenngel, die sich in der Acrylamid-Konzentration sowie in ihrem pH-Wert unterscheiden, übereinander geschichtet. An der Grenze beider Gele entsteht eine scharfe Proteinbande, die nach dem Weiterlaufen in das Trenngel eine reproduzierbare Auftrennung der Proteine herbei geführt. Das Sammelgel (5%) und das Trenngel (8-15%) wurden nach Rezept von Sambrook (Sambrook et al., 1989) hergestellt. Die Polymerisierung der Gele erfolgt ausgehend des Acrylamids (Monomer) und von Bisacrylamid (bifunktional), welches durch Zugabe

von TEMED (Katalysator) und APS (Quervernetzer) gestartet wurde. Nach dem Auspolymerisieren wurde die Gelbox in die Gelkammer eingespannt und mit 1x Westernelektrophorese-Laufpuffer (WEB) bedeckt. Die zu analysierenden Proteinlysate gleicher Konzentration, versehen mit 5 x Bromphenolblau-Laufpuffer, wurden in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung in zwei Phasen: Bei dem Einlaufen der Proben in das Sammelgel wurde eine Spannung von 80 V angelegt, bei der anschließenden Auftrennung im Trenngel wurde die Spannung auf 110 V erhöht.

#### 4.14.4 WESTERN BLOT (TRANSFER AUF NITROCELLULOSEMEMBRAN)

Der Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulose-Membran wird als Western Blot bezeichnet. Die verwendete Apparatur, den sogenannten Blotter, bestehend aus zwei Metall-Platten (Anode und Kathode) wurde für den elektrophoretischen Transfer verwendet. Für den Transfer wurde ein Transfer-Puffer verwendet. Dieser enthält je nach Proteingröße 10-20% Methanol, da der Transfer von großen Proteinen durch einen sehr hohen Methanolgehalt erschwert wird. Auf die mit Transferpuffer leicht angefeuchtete Anode wurden zwei in Transfer-Puffer getränkte Whatman-Papiere gelegt. Darauf waren geschichtet angeordnet die Nitrocellulose-Membran, sowie das Proteingel, die ebenfalls 10 min in Transfer-Puffer equilibriert wurden. Abschließend wurde das Proteingel mit zwei getränkten Whatman-Papieren bedeckt. Der Stromkreis wurde durch die darauf gelegte Kathodenplatte geschlossen. Der Transfer erfolgte für 95 min bei einer konstanten Stromstärke von 2 mA/cm<sup>2</sup>.

#### 4.14.5 COOMASSIE-FÄRBUNG UND TROCKNUNG VON PROTEINGELEN

Die geblotteten Gele können nach dem Transfer mit einer Färbelösung über Nacht unter leichtem Schwenken in Coomassie-Blue-Stain gefärbt werden. Um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurden die Gele für acht Stunden in Wasser gewaschen. Nach dem Entfärben konnten die Gele auf Whatman-Papier für 4 Stunden bei 80 °C getrocknet werden. Die verbliebenen bzw. nicht transferierten Proteine können dadurch sichtbar gemacht werden. Dies dient der optischen Kontrolle des Transferprozesses, sowie der Kontrolle des gleichen Beladens aller Taschen (Ladekontrolle).

#### 4.14.6 WESTERN-BLOT-IMMUNDETEKTION (IMMUNOBLOT)

Die auf die Nitrocellulose-Membran geblotteten Proteine wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungen in 5%-Milchpulver-Lösung (TBS-T<sub>0,05%</sub>) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit entsprechendem Primär-Antikörper in geeigneter Konzentration nach Herstellerangaben in 3%-Milchpulverlösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T<sub>0,05%</sub> für jeweils 10 min erfolgte die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper,

gekoppelt an das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP, horseradish peroxidase) (1:10000) für 2 h bei Raumtemperatur. Nach dreimaligen Waschen mit TBS-T<sub>0,05%</sub> erfolgte die Detektion nach dem ECL (Enhanced Chemiluminescence)-Supersignalsystem (West Pico bzw. Femto).

#### 4.14.7 SIGNALDETEKTION MITTLES ECL-SYSTEM

Das an den Sekundär-Antikörper gekoppelte Enzym Meerrettich-Peroxidase erzeugt durch Substrat-Umsatz (Luminol) Chemilumineszenz, die mit Hilfe eines Röntgenfilmes detektiert werden kann. Entsprechend den Herstellerangaben wurde die Membran mit der ECL-Detektionslösung (West Pico bzw. Femto) für 3 min inkubiert, in einer Entwicklerkassette in Klarsichtfolie eingeschlagen und anschließend der Röntgenfilm mit geeigneter Expositionszeit belichtet.

#### 4.14.8 „STRIPPING“ VON NITROCELLULOSEMEMBRANEN

Membranen, die bereits mit Primär-bzw. Sekundär-Antikörper versehenen wurden, können erneut mit weiteren Antikörpern bestückt werden. Dafür ist zuvor aber eine Entfernung dieser Antikörper notwendig. Die Membran wird zunächst für 10 min mit TBS-T<sub>0,05%</sub> gewaschen, um alle verbliebenen ECL-Reagenzien zu entfernen. Danach wurde die Membran für 25 min mit 0,01 mM HCl bei RT auf dem Roller inkubiert. Die Membran wurde danach für 10 min mit PBS neutralisiert und für weitere 25 min mit 0,01 mM NaOH inkubiert. Bevor die Membran mit 5%iger-Milchpulverlösung für 45 min inkubiert wurde, folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS für 10 min. Nach dem Absättigen der Membran kann wie in 4.14.6 beschrieben weiter verfahren werden.

### 4.15 IMMUNFLUORESZENZANALYSE

#### 4.15.1 FIXIERUNG DER ZELLEN

Für Immunfluoreszenzanalysen müssen physiologische Vorgänge innerhalb der Zelle weitestgehend gestoppt und die Zellen auf der Zellkulturoberfläche immobilisiert werden. Zweck der Paraformaldehyd-Fixierung ist das Erreichen eines Zustands der besseren Permeabilität der Zelle für Antikörper und Immunfarbstoffe.

Zellen wurde zunächst in einer optischen Konfluenz von 50% auf Poly-D-Lysin beschichteten Objektträgerglasplättchen ausgebracht. Nach Beendigung des Experimentes wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min bei leichtem Schwenken bei RT mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Um die Integrität an Antikörpern und Immunfarbstoffen zu optimieren, wurden die Zellen zusätzlich nach zweimaligem Waschen mit PBS mit 0,1% Triton-x-100 für 3 min permeabilisiert. Nach nochmaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einer Blocklösung, bestehend aus 5% Pferdeserum und 0,3% Triton-x-100 in PBS, überschichtet. Nach dem Blocken wurden die Zellen, mit dem jeweiligen

Primär-Antikörper (Konzentration nach Herstellerangaben) in Antikörperlösung (1% Pferdeserum und 0,3% Triton-x-100 in PBS) für 2 h überschichtet. Nach Verwerfen der Primärantikörperlösung wurde der fluoreszenzmarkierte Sekundär-Antikörper (1:500) in Antikörperlösung angesetzt, und für 30 min auf den Zellen belassen. Zweimaliges Waschen mit PBS ließ alle überschüssige Färbung verschwinden. Abschließend wurden die Zellen zur Kontrolle des Zellkerns mit TO-PRO3 für 10 min angefärbt. Nach nochmaligem Waschen mit PBS konnten die Objektträgerglasplättchen mit Eindeckmedium auf dem Objektträger aufgebracht werden. Ein Trocknen unter Lichtabschluss für 24 Stunden optimierte die Fluoreszenzintensität. Gelagert wurden die Objektträger bei 4 °C.

Nach 24 stündiger Trocknungszeit konnten die vorbereiteten Zellen auf Objektträger mittels konfokalem Fluoreszenzmikroskop (Nikon C1i) auf Einzelzellebene betrachtet, bewertet und fotografiert werden. Für die Aufnahmen wurde das Programm EZ-C1 von Nikon nach Angaben des Herstellers verwendet. Die anschließende Zusammenstellung der Aufnahmen wurden mittels Hilfe verschiedener Grafik-Programme, wie Photoshop CS3 und Illustrator CS3 durchgeführt.

#### 4.16 ZELLVIABILITÄTSMESSUNG (MTT-ASSAY)

Die Ermittlung der Zellviabilität wurde mit dem MTT-Assay untersucht. Der Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Tetrazoliums Salzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid (MTT) zum blau-violett gefärbtem Formazan. Die Reduktive Spaltung erfolgt nur in lebenden Zellen in Abhängigkeit von Enzymen des Endoplasmatischen Retikulums oder der Succinat-Dehydrogenase. Eine Schädigung der Zellen resultiert in einer verminderten Formazan-Bildung gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Durch Lyse der Zellen wird das blau-violette Formazan freigesetzt und kann bei einer Wellenlänge von 560 nm photometrisch quantifiziert werden. Dabei wird die gebildete Formazanmenge als optische Dichte (OD-Wert) erfasst.

Zur Ermittlung der Zellviabilität wurden auf einer 96-Lochplatte pro Vertiefung 2000 Zellen ausgebracht, wobei für jede Behandlung 16 unabhängige Kulturen eingeplant wurden. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen behandelt und nach Ablauf der Behandlung der MTT-Assay durchgeführt. Dafür wurde in 100 µL Behandlungsmedium 25 µL an MTT-Lösung (5 mg/mL in PBS) hinzupipettiert und die 96-Lochplatte im Brutschrank für 3 h bei 37 °C belassen. Anschließend wurde das gesamte Medium verworfen und die Zellen mit 100 µL einer 1:24 Lösung aus 1 M HCl und 2-Propanol überschichtet. Bei starkem Schwenken bei RT für 30 min wurde das verbliebene Formazan aus den Zellen herausgelöst. Die Optische Dichte wurde mittels Photometer bei 560 nm bestimmt. Als Leerwert diente die Extinktion in einem Ansatz, der die MTT-Lösung und Medium, jedoch keine Zellen enthielt.

#### 4.17 IN VITRO-ANOXIEMODELL

Hypoxie beschreibt einen pathologischen Zustand der Unterversorgung eines Gewebes mit Sauerstoff. Bei einer absoluten Sauerstoff-Deprivation wird von Anoxie gesprochen. Um diese Bedingungen *in vitro* nachzustellen wurde ein System verwendet, welches uns ermöglichte, Zellen unter Sauerstoffabschluss zu kultivieren und zu analysieren. Die am Vortag ausgebrachten Zellen wurden in die Anoxiekammer gestellt und die darin befindlichen GasPak-Hüllen (GasPak Anaerobic System Envelopes) durch Zugabe von Wasser aktiviert. Dabei verband sich der aus einer Natriumhydrid-Tablette freigesetzte Wasserstoff in Gegenwart eines Palladium-Katalysators mit dem Sauerstoff des Kammerinneren zu Wasser. Eine Natriumbicarbonat-/Zitronensäure-Tablette setzte zusätzlich CO<sub>2</sub> frei und erzeugte so eine 4-10% Kohlendioxidatmosphäre. Nach definiertem Zeitraum wurden die Zellen für nachfolgende Analyseschritte vorbereitet.

#### 4.18 CASPASE-3-AKTIVITÄSMESSUNG

Um die Aktivierung der Effektor-Caspasen-3, -6, -7 zu analysieren, wurde eine Caspase-Aktivitätsmessung durchgeführt. Dabei diente das Tatrapeptid Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) als Caspase-Spaltstelle, an welches das Fluorophor Aminomethylcumarin (AMC) gekoppelt ist. Die Caspase-Aktivität wurde indirekt über die Fluoreszenzintensität von freiem AMC in Relation zum Proteingehalt des Extraktes bestimmt. Das durch Caspasespaltung freigesetzte Aminomethylcoumarin konnte fluorometrisch nach Anregung mit 360 nm bei einer Emissionswellenlänge von 460 nm mit Hilfe des ELISA-Readers gemessen werden. Mit Roti-Quant wurde parallel dazu eine Proteingehaltsbestimmung der Extrakte nach Bradford durchgeführt, um die gemessene Fluoreszenzintensität mit dem Proteingehalt zu verrechnen.

Für die Caspaseaktivitätsmessung wurden 3 x 10<sup>4</sup> Zellen pro Vertiefung einer 24-Lochplatte ausgebracht und nach 24 h der jeweiligen Behandlung unterzogen. Für die jeweilige Behandlung wurden vier unabhängige Kulturen eingeplant. Nach Ablauf der Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 200 µL Lysepuffer zytosolische Extrakte gewonnen. Jeweils 50 µL an Extrakt wurden in eine Vertiefung einer schwarzen 96-Lochplatte überführt und mit 150 µL Reaktionspuffer vermischt. Deren Caspaseaktivität bzw. Reaktionsumsatz wurde mit dem fluorogenen DEVD-Substrat für 120 min bei 37 °C gemessen.

## 4.19 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

### 4.19.1 HINTERGRUND

Mithilfe der Durchflusszytometrie ist eine Zelltypisierung von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften möglich. Die zu messenden Zellen werden mittels einer Kapillare in einen coaxialen Hüllstrom eingestreut, der sich in der Messkammer verjüngt, so dass die Zellen sequentiell im Kreuzpunkt von Laserstrahl und Flüssigkeitsstrom fokussiert werden (hydrodynamische Fokussierung). Sobald eine Zelle den Analysepunkt, den Schnittpunkt zwischen Flüssigkeits- und Laserstrahl, erreicht, kommt es zu einer Streuung des Laserstrahls. Gemessen wird einerseits die Intensität des Lichtes, welche die Vorwärtsrichtung (Forward Scatter) entlang des einfallenden Lichtstrahls streut. Die Vorwärtslichtstreuung ist ein Maß für die Zellgröße. Zum anderen wird die Intensität des Lichtes, welches in Seitwärtsrichtung (Side Scatter) streut, gemessen. Dieses Seitwärtsstreulicht ist ein Maß für die Granularität der Zelle. Mit Hilfe dieser Faktoren lassen sich spezifische Populationen eingrenzen. Zusätzlich zur Lichtstreuung wurde parallel die Fluoreszenz von bestimmten Fluorophoren, die an die Zelle binden gemessen. Besitzt eine Zelle eine Markierung durch ein Fluorophor kommt es zu einer Absorption von Lichtenergie in einem für den Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Wellenlängenbereich. Dadurch werden Elektronen in ein höheres Energieniveau gehoben, fallen wieder auf das Ausgangsniveau zurück und emittieren dabei Licht einer bestimmten Wellenlänge. Dieser Übergang wird als Fluoreszenz bezeichnet.

Bevor es zur Messung kommt muss das Durchflusszytometer optimiert und kalibriert werden. Hierfür werden zunächst vom Hersteller angebotene „Beads“ markiert mit PerCP-Cy5.5. zusammen mit isotoner Kochsalzlösung in ein Analyseröhrchen gegeben. Dadurch wurden die Parameter wie Vorwärtsstreulicht, Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenzintensität justiert.

Um ein durch das breite Emissionsspektrum der Fluorochrome bedingte Überstrahlen in den Fluoreszenzbereich anderer Fluorochrome zu vermeiden, wurde eine Kompensation mit Annexin-V-FLUOS und Propidiumiodid durchgeführt.

Nach der Justierung aller Parameter konnte die Messung der Proben mit 10.000 Zellen beginnen. Dabei betrug die Durchflussrate 300-800 Zellen pro Sekunde.

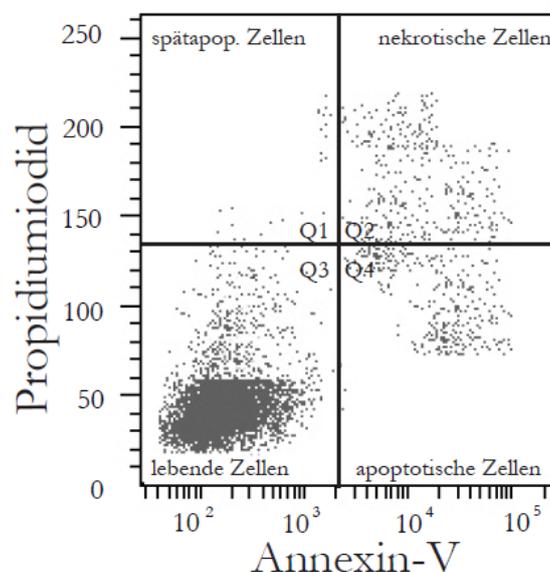
Sämtliche Parameter werden simultan aufgenommen und können eindimensional als Histogramm oder zwei-dreidimensional als Dot Plot dargestellt werden. Den Kriterien der Experimente folgend, werden Regionen (Gates) auf dem Dot Plot definiert, die die separate Analyse einer Zellpopulation erlauben.

### 4.19.2 ANNEXIN-V-FLUOS/PROPIDIUMIODID-DOPPELFÄRBUNG

Für die Messung des Zelltods wurden die Zellen mit Annexin-V-FLUOS und Propidiumiodid angefärbt. Für das Apoptose-spezifische Ereignis einer Zelle ist der Verlust der Asymmetrie der Zytoplasmamembran unweigerlich. In apoptotischen Zellen wird das Phosphatidylserin (PS), ein Phospholipid der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran, in die äußere Membranschicht, welche dem

Extrazellulärraum zugewandt ist, transloziert. Diese Translokation weist auf den frühen Status der Apoptose hin. Annexin-V bindet spezifisch an PS, so dass es möglich ist, apoptotische Zellen von nicht apoptotischen zu unterscheiden. Die Gegenfärbung mit Propidiumiodid (10 µg/µL) ermöglicht die Differenzierung zwischen apoptotischen (Annexin-V-positiv), nekrotischen und spät-apoptotischen Zellen (Annexin-V- und PI-positiv bzw. PI-positiv), da Propidiumiodid durch die permeabilisierten Membranen der apoptotischen Zellen diffundieren kann. Zur Bestimmung des Anteils an Zelltod wurden in einer 24-Lochplatte  $3 \times 10^4$  Zellen ausgebracht und nach 24 h einer Behandlung unterzogen. Für die jeweilige Behandlung wurden vier unabhängige Kulturen eingeplant. Nach Ablauf des Inkubationszeitraumes wurde der Zellüberstand, sowie trypsinisierte Zellen in ein Analyseröhrchen überführt, mit PBS gewaschen, bei 200 x g für 3 min sedimentiert und anschließend das Zellpellet mit 50 µL an 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) mit PI (0,8 µL an 50 µg/µL Stocklösung) und Annexin-V-Fluos (0,8 µL aus Originalstocklösung des Herstellers) resuspendiert. Nach 15 min Inkubation unter Lichtabschluss wurden die Zellen mittels Durchflusszytometer analysiert.

Die Auswertung der Zelltodanteiles wurde mittels Dot Plot durch Berechnung des Anteiles toter (d.h., apoptotischer, spätapoptotischer und nekrotischer Zellen) über die Differenz von 100% (aller vier Quadrate) und dem Anteil lebender Zellen (ungefärbte Zellen) errechnet.



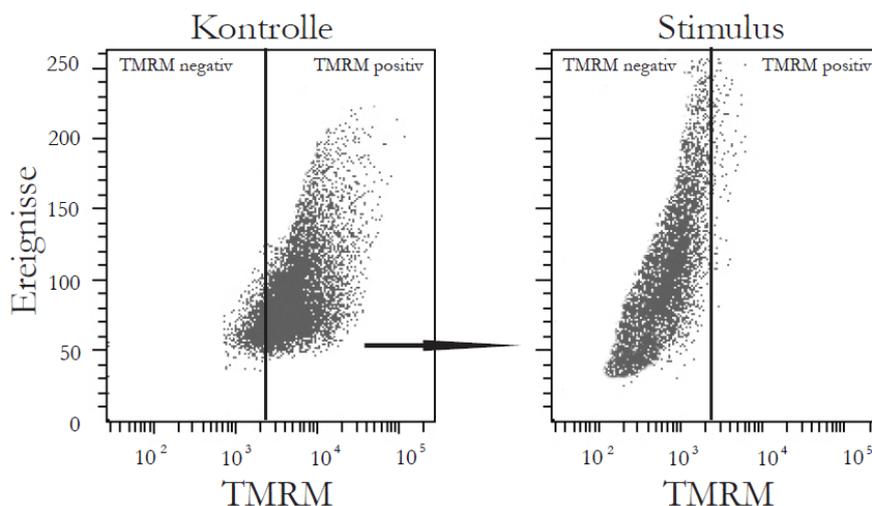
*Abbildung 8:* Abbildung eines FACS Dot Plot Diagramms nach Annexin/PI-Doppelfärbung. Phosphatidylserin (PS) befindet sich auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle. Während der Apoptose (dem "programmierten Zelltod") wird das PS auf die Außenseite der Membran transloziert. Annexin V kann an das PS binden. Durch diese Bindung von Annexin V an PS ist es möglich mittels Durchflusszytometrie apoptotische Zellen nachzuweisen. Dahingegen werden nekrotische Zellen wegen ihrer porösen Membran permeabel für Annexin V und PI. Es wird daher Annexin V mit Propidiumiodid kombiniert, um nekrotische Zellen nachzuweisen. Spätapoptotische Zellen weisen nur ein PI-positives Signal auf. Die Auswertung des Zelltodanteils errechnet sich über die Differenz von 100% (aller vier Quadrate) und dem Anteil ungefärbter Zellen (Q3).  $\text{Zelltod [\%]} = 100\% - \text{Population Q3 [\%]}$

#### 4.19.3 TMRM-FÄRBUNG

Ein Indikator für die funktionelle Integrität des Mitochondriums ist das mitochondriale Membranpotential  $\Delta\Psi_m$ . Dieses wird durch einen Protonengradienten über die innere mitochondriale Membran in Verbindung der Elektronentransportkette aufrechterhalten. Viele Funktionen wie, ATP-Synthese oder Influx und Efflux von Substraten und Metaboliten treibt das  $\Delta\Psi_m$  an. Tetramethylrhodaminmethylester (TMRM) ist ein kationischer Farbstoff, der sich der Nernst-Gleichung entsprechend über zelluläre Membranen verteilt und proportional zu  $\Delta\Psi_m$  in der negativ geladenen Mitochondrienmatrix ansammelt. Da der Farbstoff keinen Einfluss auf die Aktivität der Elektronentransportkette zeigt, eignet er sich besonders für die Bestimmung der Integrität des Mitochondriums. Der Farbstoff ist membranpermeabel, und reagiert auf Potentialänderungen mit einer Umverteilung über Innen- und Außenseite der Membran. Diese Umverteilung findet diffusionskontrolliert statt. Die Sensitivität ist sehr hoch und liegt im Bereich von 80-90% Signaländerung bei einer Potentialänderung von 100 mV.

Durch Stimuli, die die proapoptotischen Familienmitglieder Bak und Bax aktivieren, kommt es zu einer Oligomerisierung in der äußeren Mitochondrienmembran. Aus den entstandenen Poren strömen Proteine, wie das Cytochrom c in das Zytosol, welches folglich zum Verlust von  $\Delta\Psi_m$  führt. Demzufolge kann TMRM nicht mehr von den Mitochondrien aufgenommen werden und verteilt sich im Zytoplasma.

Zellen wurden wie in 4.4 beschrieben ausgebracht, behandelt, trypsiniert und sedimentiert. Für die jeweilige Behandlung wurden vier unabhängige Kulturen eingeplant. Das Zellsediment wird in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) mit TMRM (30 nM) aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 20 min unter Lichtabschluss wurden mittels Durchflusszytometer die mitochondrialen Potentialänderungen gemessen.

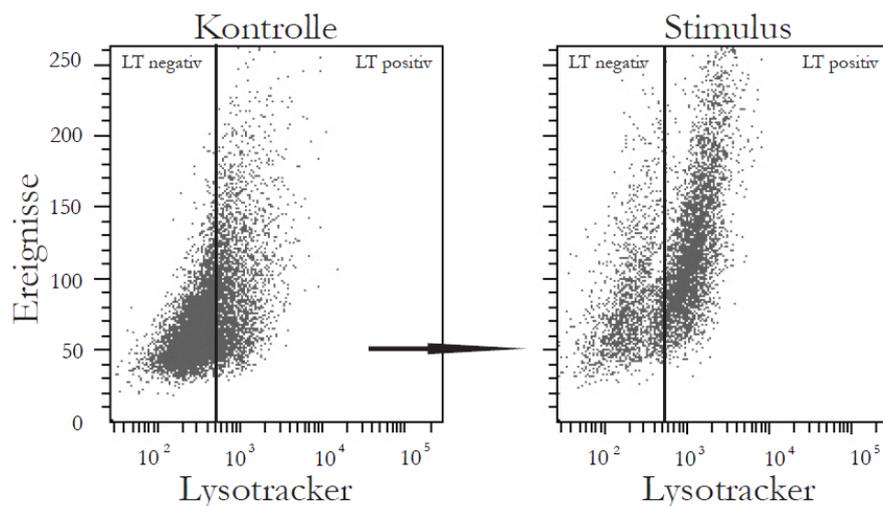


*Abbildung 9:* Mitochondriale Membranpotential-Messung ( $\Delta\Psi_m$ ) mittels TMRM-Färbung. Für die Anfärbung vitaler Zellen wurde der rot fluoreszierende Farbstoff Tetramethylrhodaminmethylester (TMRM) verwendet. Über seine positive Ladung kann er in die negativ geladenen Mitochondrien akkumulieren. Kommt es zu einer Depolarisation der Mitochondrienmembran, wie sie beim Zelltod (Stimulus) stattfindet, geht diese Akkumulation verloren. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, die Potentialänderung zu messen. Das mitochondriale Membranpotential errechnet sich:  
 TMRM Fluoreszenz [%] = 100%- Population TMRM negativ

#### 4.19.4 LYSOTRACKER-RED-DND-99-FÄRBUNG

Für die Untersuchung lysosomaler Aktivität in Glioblastomzelllinien wurde ein rot fluoreszierender Farbstoff, LysoTracker-Red-DND-99, verwendet. Dieser ist leicht basisch und durch die Zellmembran frei permeabel. Im pH neutralen Bereich liegt die Struktur des Farbstoffes partiell protoniert vor, dahingegen im aziden Bereich vollständig protoniert. Aufgrund dieser Tatsache hat der Farbstoff eine hohe Affinität zu aziden Kompartimenten und akkumuliert mit Lysosomen und Endosomen (Zhaound Morales, 2000; Wunderlich et al., 2001). Hintergrund der Verwendung des Farbstoffes ist die Fragestellung, wie hoch die lysosomale bzw. endosomale Aktivität nach Behandlung mit diversen Substanzen ist.

Zellen wurden wie in 4.4 beschrieben ausgebracht, entsprechend behandelt, trypsinisiert und sedimentiert. Für die jeweilige Behandlung wurden vier unabhängige Kulturen eingeplant. Das Zellsediment wurde in 50  $\mu\text{L}$  10 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) mit 25 nM LysoTracker-Red-DND-99-Farbstoff aufgenommen. Nach 30 minütiger Inkubation unter Lichtabschluss wurde mittels Durchflusszytometer die lysosomale Aktivität vermessen.



*Abbildung 10:* Messung der lysosomalen Aktivität mittels Lysotracker Red DND 99 (LT) Färbung. Für die Messung wird der pH sensitive Farbstoff verwendet, da er zum einen in aziden Vesikeln stabil bleibt, und zum anderen eine hohe Affinität aufzeigt. Dieser leicht basische Farbstoff ist durch die Zellmembran frei permeabel. Im pH neutralen Bereich liegt die Struktur des Farbstoffes partiell protoniert vor, dahingegen im aziden Bereich vollständig protoniert. Daher akkumuliert er bevorzugt mit gebildeten Lysosomen und Endosomen nach Aktivierung des Zelltods (Stimulus). Die lysosomale Aktivität errechnet sich folgendermaßen: Lysosomale Aktivität [%] = 100% - Population LT negativ

#### 4.20 TRANSFEKTION EUKARYOTISCHER ZELLEN MIT siRNA

Um spezifisch eine Geninhibition hervorzurufen, wurde Ende der neunziger Jahre ein potentes Inhibitionsverfahren entwickelt, die sogenannte RNA interferenz (RNAi) (Fire et al., 1998). Der Signalweg in eukaryotischen Zellen ist evolutionär hoch konserviert und spielt bei der Entwicklung (Carrington und Ambros, 2003), der Beständigkeit des Genoms (Holmquist und Ashley, 2006) eine bedeutende Rolle, ist aber auch bei der Immunabwehr vor Viren beteiligt (Stramund und Kuzntzova, 2006). Bei diesem Mechanismus wird die RNAi über eine small interfering RNA (siRNA) vermittelt. Die längere doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) wird durch das Protein DICER, einer Endonuklease der RNase III-Typ in 19-meren RNA-Duplexe zerschnitten, die an den 3'-Enden symmetrische Überhänge von zwei Nukleotiden enthalten. Die Phosphorylierung am 5'-Ende des siRNA-Duplexes führt zu deren Aufnahmen in den proteinhaltigen RNA-induced silencing complex (RISC), wodurch sequenzspezifisch die siRNA an die Ziel-mRNA bindet und den Abbau induziert. Genutzt wird dieser Mechanismus heute durch Einbringung synthetisch hergestellter komplementärer siRNA in die Zelle. Die Einbringung bzw. Aufnahme der siRNA in die Zelle passiert nicht spontan, da sie hydrophob ist und aus negativ geladenen Molekülen besteht. Durch Zugabe von Transfektionsagentien kann dieser Vorgang initiiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden spezifische siRNAs der Transkripte Bcl-2, Bcl-xL, Beclin1 und ATG5 in humanen Gliomzelllinien degradiert und eine transiente Repression betreffender Gene erzielt. Für die siRNA Transfektion wurden am Vortag in einer 24-Loch-Platten pro well  $3,0 \times 10^4$  Zellen ausgebracht. Für jeden Ansatz wurden 200 nM an einem siRNA-äquimolaren-Gemisch zweier Nukleotidsequenzen (gleiches Zieltranskript) eingeplant. Ansatz A enthält 2,5  $\mu\text{L}$  des siRNA-Gemisches welches mit 40  $\mu\text{L}$

Opti-MEM versetzt und für 10 min inkubiert wurde. Zusätzlich wurden für Ansatz B 1,5 µL Oligofectamine mit 6 µL Opti-MEM vermischt und ebenfalls 10 min bei RT inkubiert, bevor beide Ansätze vereinigt weitere 20 min inkubierten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Vollmedium verworfen und gegen den Transfektionsansatz, der mit Opti-MEM auf 250 µL aufgefüllt wurde, ersetzt. Zur Beurteilung der Transfektionseffizienz wurden zusätzlich Kontrollzellen mit unspezifischer FAM-markierter siRNA transfiziert. Die Zellen wurden für 4 h bei allgemeinen Bedingungen im Brutschrank belassen. Nach Ablauf der Zeit wurde das Transfektionsmedium verworfen und gegen Vollmedium ersetzt. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Kontrollzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf grün fluoreszierende FAM-positive Zellen untersucht. Durch spezifische Gegenfärbung mit Hoechst konnte die Transfektionseffizienz anhand des Quotienten aus FAM-positiven und Hoechst-positiven Zellen errechnet werden. Es wurde anhand von Immunoblots spezifisch für alle Zieltranskripte festgestellt, dass nach Ablauf von 72 h die Inhibierung des Proteins durch siRNA am stärksten war.

#### 4.21 LENTIVIRALE TRANSDUKTION (HERSTELLUNG STABILER KNOCKDOWN KLONE MITTELS shRNA)

Die Fähigkeit von Lentiviren zur Transduktion in Zellsysteme und deren stabile Intergration ihres Genoms in die Wirtszelle, kann in lentiviralen Vektorsystemen für einen Gentransfer genutzt werden. Vorteile dieser lentiviralen Vektoren gegenüber anderer viraler oder nicht-viraler Gentransfer-Technologien bestehen in der hohen Effizienz der Transduktion und der effizienten Langzeit-Expressions-Integration. Für die Herstellung stabiler Genexpressionen, die dauerhaft verringert sind, werden typische von der Firma Sigma-Aldrich angebotene Mission® shRNA Transduktions-Partikel verwendet. Diese Partikel schleusen shRNA-kodierende Plasmide zielspezifisch mit 19-25 nt shRNA in die Zelle ein. Bei dem Prozess der lentiviralen Transduktion wird die shRNA, die die Sequenz des Gens von Interesse beinhaltet, integriert. Der Name shRNA (engl. small hairpin RNA) basiert auf einer Sequenzkomplementarität innerhalb des Moleküls, die zu einer Haarnadelstruktur führt. Basierend auf dem Prozess der RNA Interferenz wird die Expression des zu betreffenden Proteins gehemmt.

Für die Generierung von lentiviralen Knockdown-Klonen wurden pro Vertiefung  $1,6 \times 10^4$  Zellen in 96-Loch-Platten ausgebracht. Nach einer 24-stündigen Kultivierung bei allgemeinen Bedingungen wurden das Medium verworfen und die Zellen mit 100 µL neuem Vollmedium mit Zugabe von 8 µg/µL Polybren, welches die ladungsbedingten Wechselwirkungen neutralisiert und somit zu Verstärkung der Bindung zwischen pseudoviralem Capsid und Zellmembran beiträgt, überschichtet. Gleichzeitig fand die Virusinfektion mit einer MOI (engl. *multiplicity of infection*), die das zahlenmäßige Verhältnis von Viruspartikeln zu einer Zielzelle beschreibt, von 10 statt. Die dafür verwendeten Virusstocks beinhalteten die pCMV-pLKO-puro-Negativkontrolle (ohne shRNA) bzw. -zielgenspezifische Partikel. Nach Ablauf von 24 h wurde das viruspartikelhaltige Medium verworfen und die Zellen mit Vollmedium und Zugabe des Selektionsmarkers Puromycin 5 µg/µL überschichtet. Zwei Tage nach der Infektion wurden die

Zellen subkultiviert. Von diesem Zeitpunkt an, wurden die Zellen bis zu Beginn eines Experimentes mit entsprechendem Vollmedium und Selektionsmarker (Puromycin) subkultiviert, um eine effektive Selektion aufrecht zu erhalten. Mittels Immunoplot wurde die Hemmung des Proteins detektiert.

#### 4.22 STATISTIK

Die gezeigten Daten sind, soweit nicht anders vermerkt, mit dem Standardfehler des Mittelwertes ( $\pm$  SEM) dargestellt. Die statistischen Vergleiche wurden mit Hilfe des Programms SPSS® Version 17.0 T-Tests und ANOVA-Varianzanalysen in Kombination des Tukey`s-Test durchgeführt. *P*-Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant definiert.

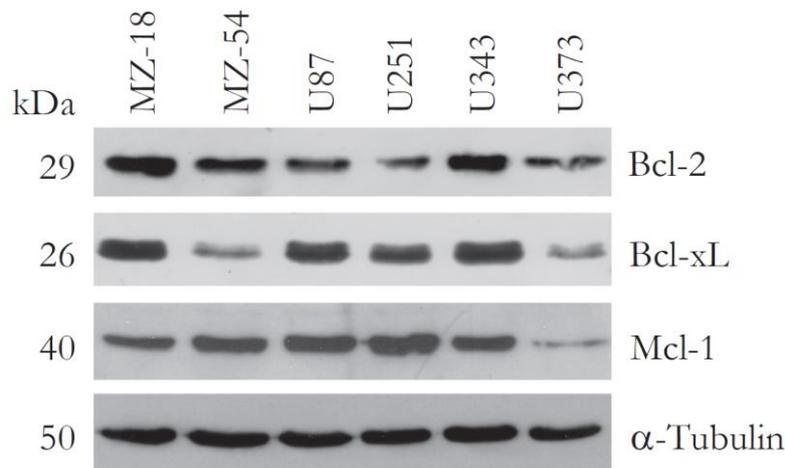
## V ERGEBNISSE

### 5.1 ERHÖHTE EXPRESSIONSLEVEL ANTI-APOPTOTISCHER BCL-2-FAMILIENMITGLIEDER: KORRELATION MIT DER RESISTENZ GEGENÜBER ANOXIE

Maligne Gliome zählen zu den Tumoren mit dem höchsten Grad an Hypoxie (Steinbach et al., 2005) und sind durch ein prominentes Auftreten von Nekrosearealen mit nekrotischen Pseudopalisaden charakterisiert (Tohma et al., 1998). Die Hypoxie ist möglicherweise eine treibende Kraft für die Zelltdresistenz und Gliomzellen scheinen Veränderungen des intrinsischen Apoptose-Signalweges als eine Ausweichmöglichkeit zur Adaption an extrem hypoxische Bedingungen zu nutzen (Acker und Plate, 2002; Greijer und van der Wall, 2004; Kim et al., 2004).

Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle in der Atmungskette, das sie mittels Elektronen-Transportvorgängen durch Anreicherung von Protonen einen elektrochemischen Gradienten zwischen dem Intermembranraum und der mitochondrialen Matrix entwickeln und somit Energie in Form von ATP gewinnen können. Zudem spielen Mitochondrien eine zentrale Rolle in der Signalkaskade des programmierten Zelltods, der Apoptose. Viele Tumorzellen weisen häufig mitochondriale Defekte auf, die sie durch eine Überexpression protektiver Bcl-2 Familienmitglieder kompensieren. Aufgrund der Resistenz von humanen Gliomzelllinien gegenüber Apoptose-fördernden Zelltodstimuli ergab sich die Frage, ob möglicherweise eine Überexpression anti-apoptotischer Familienmitglieder für diese Resistenz mitverantwortlich ist.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden zunächst die basalen Level der Proteine Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1 in sechs verschiedenen humanen Gliomzelllinien (MZ-18, MZ-54, U251, U343, U373 und U87) mittels Immunoblot untersucht. Die Analyse auf Proteinebene zeigte die unterschiedlichen Expressionsniveaus aller untersuchten anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine. Die Gliomzelllinien MZ-54, U373, U87, U251 zeigten für das Protein Bcl-2 ein annähernd ähnliches hohes Expressionslevel. Zudem wurde eine hohe Expression des Proteins Bcl-xL in den in den Zelllinien MZ-18, U87, U251 und U343 festgestellt. Die Expression eines weiteren Bcl-2-Familienmitgliedes, Mcl-1, zeigte sich nur in der Zelllinie U373 stark verringert.

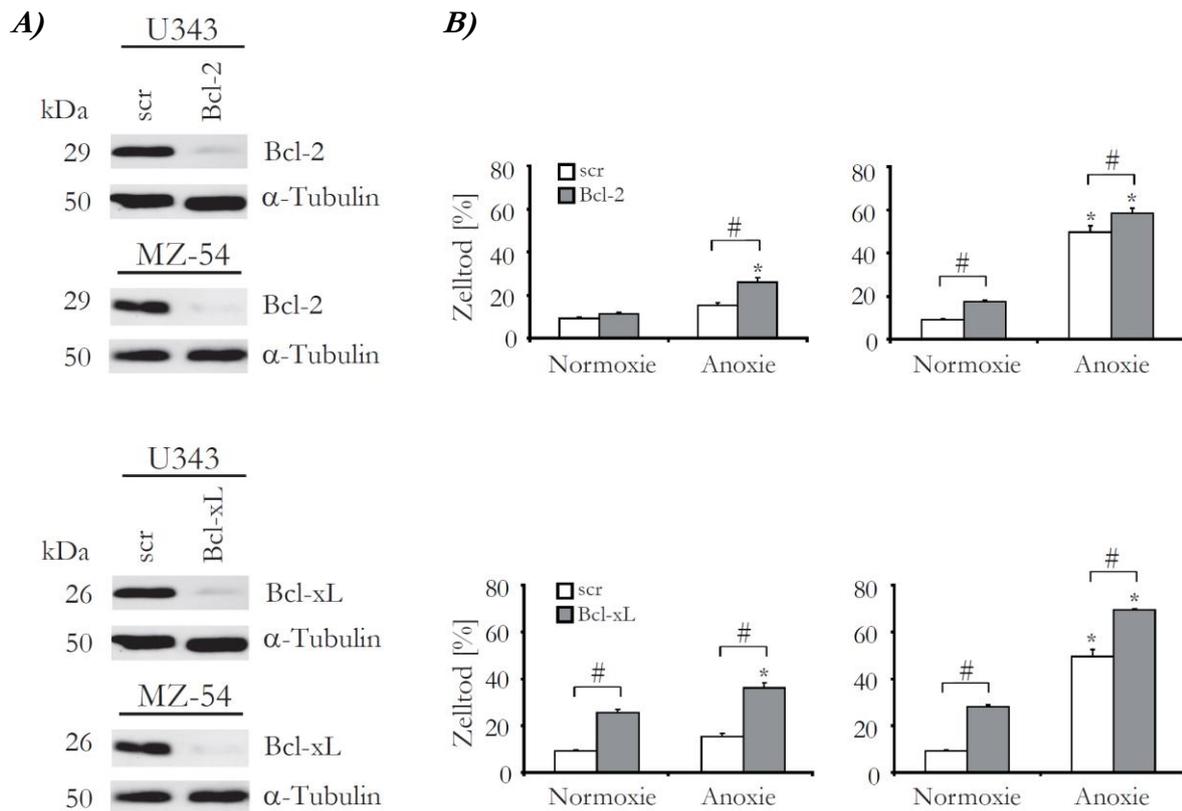


*Abbildung 11:* Analyse der basalen Expressionslevel von anti-apoptischen Bcl-2 Familienmitgliedern in sechs humanen Gliomzelllinien (MZ-18, MZ-54, U251, U343, U373 und U87). Gesamtzelllysate wurden mittels Immunoblot auf die basale Expression von Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 (anti-poptotische Bcl-2-Subfamilie) getestet.  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle.

In vorangegangenen Arbeiten (Hetschko et al., 2008) wurde, neben der Charakterisierung der Expression von Bcl-2-Familienmitgliedern, die Resistenz einiger Zelllinien gegenüber hypoxischen bzw. anoxischen Stress analysiert. Dafür wurden Sensitivitätsstudien in verschiedenen Gliomzelllinien, wie MZ-18, MZ-54, U251, U343, U373 und U87, durchgeführt. Mittels Durchflusszytometrie konnte nach Doppelfärbung mit Annexin V und Propidiumiodid (PI) das Ausmaß an Zelltod bestimmt werden. Ergebnisse dieser Sensitivitätsstudie zeigten erste Hinweise auf einen nicht-apoptischen Zelltod, der durch Sauerstoffentzug ausgelöst wurde. Zusätzlich verdeutlichten die Ergebnisse eine Klassifizierung in Anoxie-sensitive- (U251, MZ-54, U373, U87) und Anoxie-resistente- (MZ-18, U343) Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Dies unterstreicht zusätzlich eine große Variabilität hinsichtlich ihrer Anoxie-Toleranz. Wie auch schon in (Hetschko et al., 2008) beschrieben, weisen die beiden Gliomzelllinien U343 und MZ-18 die höchste und MZ-54 die geringste Resistenz gegenüber Anoxie auf. Vergleichend zu dieser Variabilität mit dem einhergehenden Zelltodes gegenüber der Anoxie, zeigten sich in den Zelllinien mit der höchsten Resistenz (U343 und MZ-18) eine auffällig erhöhte Expression von Bcl-2 und Bcl-xL. Die Zelllinie die die geringste Anoxie-Toleranz aufwies (MZ-54), spiegelte sich mit einer stark verringerten Expression der anti-apoptischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL wider. In Bezugnahme dieser Erkenntnisse, scheint eine erhöhte Expression anti-apoptischer Proteine mit einer erhöhten Anoxie-Resistenz einherzugehen. Dies könnte unter anderem durch die Adaption an die niedrigen Sauerstoffkonzentrationen der Zelle mit einer erhöhten Resistenz gegen die Aktivierung des intrinsischen Signalweges korrelieren.

## 5.2 SPEZIFISCHE INHIBITION VON BCL-2-ÄHNLICHEN PROTEINEN

Um darüber hinaus die spezifische Rolle der anscheinend für die Zelle protektiv-wirkenden Proteine der Bcl-2 Familienmitglieder näher zu untersuchen folgten RNAi-Experimente, die Bcl-2 bzw. Bcl-xL spezifisch supprimieren sollten. Für diese Analysen wurden eine Anoxie-sensitive- (MZ-54) und eine Anoxie-resistente (U343) Gliomzelllinie verwendet. Die Etablierung des transienten Knockdowns wurde zunächst durch eine Zeitreihe von 24, 48 bis hin zu 72 h durchgeführt. Anhand der gewonnenen Gesamtzellextrakte nach jeweiligem Zeitpunkt konnte mittels Immunoblot festgestellt werden, dass nach 72 h die transiente Geninhibition beider Zieltranskripte (Bcl-2 und Bcl-xL) optimal war (Daten nicht gezeigt). Für die Untersuchungen, die den Zelltod unter basalen und anoxischen Bedingungen aufzeichnen sollten, wurde sowohl die Anoxie-resistente (U343), als auch die Anoxie-sensitive (MZ-54) Zelllinie jeweils mit 250 nM Bcl-2 bzw. Bcl-xL-siRNA und einer nicht zielgerichteten scrambled (scr) Kontroll-siRNA transfiziert. U343 und MZ-54 wurden wie in Punkt 4.19 beschrieben mit den siRNA-Oligonukleotiden transfiziert. Nach 24 h wurden die transfizierten Zellen unter Sauerstoffentzug bzw. Normalbedingungen bei 37 °C für weitere 48 h kultiviert. Mittels Durchflusszytometrie konnte nach 72 h der Zelltod nach Doppelfärbung mit Annexin V/PI bestimmt werden. Die Resultate zeigten, dass unter basalen Bedingungen nach spezifischer Suppression von Bcl-2 bzw. Bcl-xL in beiden Zelllinien U343 und MZ-54 eine signifikante Steigerung des Zelltods herbeigeführt werden konnte. Ergebnisse, die unter anoxischen Bedingungen erlangt wurden, zeigten neben dem durch Sauerstoffentzug-induzierten Zelltod eine zusätzliche signifikante Steigerung des Zelltods, der über die spezifische Geninhibition erzielt wurde. Diese Befunde deuten an, dass die Anwesenheit sowohl von Bcl-2, als auch von Bcl-xL für die Anoxie-Resistenz der Gliomzelle essentiell ist.



*Abbildung 12:* Der spezifische Knockdown anti-apoptotischer Bcl-2 Familienmitglieder durch RNA Interferenz führt zu einem erhöhten Zelltod unter basalen Bedingungen und sensitiviert Gliomzellen zusätzlich gegenüber Anoxie. *A)* Eine Anoxie-resistente (U343) und eine Anoxie-sensitive (MZ-54) Gliomzelllinie wurden mit 250 nM Bcl-2 bzw. Bcl-xL-siRNA und einer nicht zielgerichteten scrambled (scr) Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 72 h wurden Gesamtzelllysate hergestellt und der Knockdown von Bcl-2 bzw. Bcl-xL mittels Immunoblot in beiden Zelllinie nachgewiesen.  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle *B)* U343 und MZ-54 wurden, wie oben beschrieben, transfiziert, nach 24 h unter Sauerstoffentzug für weitere 48 h kultiviert und es wurde mittels Durchflusszytometrie (Annexin V/PI) der Zelltod bestimmt. 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.

### 5.3 INHIBITION ALLER BCL-2-ÄHNLICHER PROTEINE ZUR EFFIZIENTEN SENSITIVIERUNG VON GLIOMZELLEN

Die dargelegten Ergebnisse lassen vermuten, dass Gliomzelllinien den Verlust von Bcl-2 und Bcl-xL durch die Überexpression weiterer Bcl-2-Familienmitglieder kompensieren können. Da durch die von uns eingesetzten BH3-Mimetika nur zwei Mitglieder bzw. durch RNAi nur jeweils ein Bcl-2-Familien-Protein zielgerichtet supprimiert wurde, wurden weitere Analysen durchgeführt, die weitere bzw. alle Familienmitglieder der Bcl-2-Subfamilie inhibieren sollten. Um diese pharmakologische Inhibition mehrerer Bcl-2-Familienmitglieder zu erreichen, wurde der Pan-Bcl-2-Inhibitor Gossypol verwendet, der zielgerichtet Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, und Mcl-1 inhibiert (*Tabelle 2*).

Bevor eine Dosis- bzw. Zeitreihe zur Etablierung der Gossypol-vermittelten-Sensitivierung in den Gliomzelllinien über die Blockade aller Bcl-2 Familienmitglieder durchgeführt wurde, wurde zu Anfang sicher gestellt, dass alle Proteine der Bcl-2-Familie von den Gliomzelllinien U343, MZ-54 und U87 exprimiert werden. Mittels Immunoblot wurden die vorhandenen Expressionslevel von Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, und Mcl-1 in den oben genannten Zelllinien bestätigt, die annähernd gleich in allen Zelllinien ausfällt.

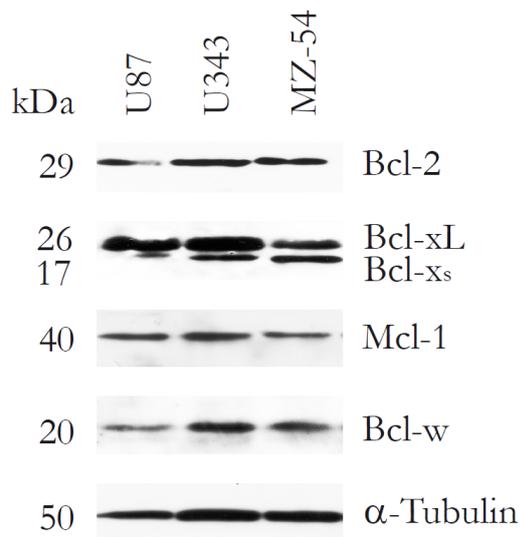


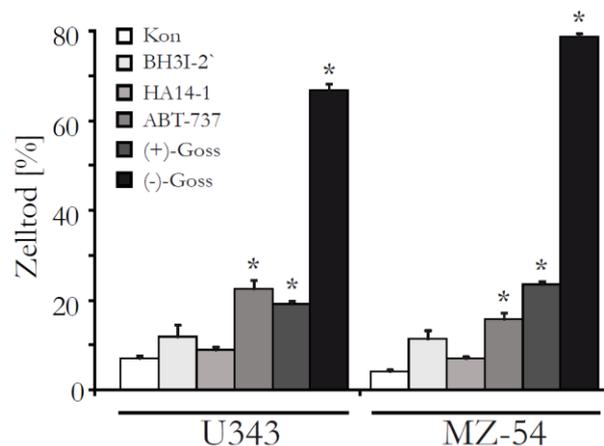
Abbildung 13: Analyse der basalen Expressionslevel anti-apoptotischer Bcl-2-Familien Mitglieder, wie Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-x<sub>S</sub>, Mcl-1 und Bcl-w in den Gliomzelllinien U87, U343 und MZ-54. Gesamtzelllysate wurden mittels Immunoblot proteingerichtet mit jeweiligem Antikörper getestet. α-Tubulin diente als Ladekontrolle.

Zur Etablierung der Sensitivität gegenüber Gossypol in Gliomzelllinien, wurde sowohl ein zeitverlaufs-, als auch ein konzentrationsabhängiges Experiment in U343 und MZ-54 durchgeführt. Diese Etablierungsexperimente wurden für das Racemat und das Enantiomer (Racemat: (+)-Gossypol bzw. Enantiomer: (-)-Gossypol) des Gossypols durchgeführt. Als Vorversuch wurden beide Zelllinien in einer Zeitreihe von 24, 48, 72 und 96 h mit verschiedenen Konzentration (5, 10, 15, 20, 30 μM) an (+)-Gossypol bzw. (-)-Gossypol behandelt und mittels Durchflusszytometrie nach Doppelfärbung mit Annexin V und PI der Zelltod bestimmt. Für die Einzelbehandlung beider Inhibitoren hatte sich der Zeitpunkt von 48 h mit einer Konzentration von 15 μM als geeignet erwiesen (Daten nicht gezeigt).

Zum Vergleich des sensitivierenden Potentials von Gossypol gegenüber anderer BH3-Mimetika, wurden zum einen die beiden zuvor verwendeten Inhibitoren, BH3I-2` und HA14-1 in den Konzentrationen 20 μM und 30 μM (Hetschko et al., 2008) gebraucht. Zum anderen, für einen weiteren Vergleich verschiedener BH3-Mimetika, die die unterschiedlichsten Bindungsprofile aufweisen, wurde der Inhibitor ABT-737 verwendet, welcher drei Bcl-2-Proteine, Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w aber nicht Mcl-1 blockiert(Lessene et al., 2008; Kang und Reynolds, 2009)(Tabelle 2). Der Inhibitor ABT-737 wurde wie das Gossypol in der gleichen Konzentration von 15 μM eingesetzt, um einen genauen Vergleich der Wirkungsweise der Substanzen darzustellen. Die Gliomzelllinien U343 und MZ-54 wurden mit den oben beschriebenen BH3-Mimetika in jeweiliger Konzentration für 48 h behandelt. Der Zelltod wurde mittels Durchflusszytometrie nach Annexin V und PI Doppelfärbung bestimmt. Die Ergebnisse zeigten

interessanterweise, dass (-)-Gossypol in beiden Zelllinien einen potenten Zelltod induzieren konnte. In U343 wurde ein signifikanter Zelltod von 65% und in MZ-54 von 75% nachgewiesen. BH3I-2` und HA14-1 konnten in beiden Zelllinien wie auch schon in vorangegangenen Studien (Hetschko et al., 2008) gezeigt, keinen Zelltod nach 48 h auslösen. Dahingegen induzierten ABT-737 und das Racemat ((+)-Gossypol) einen signifikanten Zelltod von ca. 15% bis hin zu 22%.

Bezugnehmend auf diese Resultate, scheinen alle anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder zur Resistenz in Gliomzellen beizutragen. Daher ist die zusätzliche Inhibierung von weiteren Bcl-2-Proteinen, Bcl-w und Mcl-1, der anti-apoptotischen Familie vermutlich bedeutend für die Wirksamkeit von ABT-737 und Gossypol. Interessanterweise scheint das Enantiomer im Vergleich zu dem Racemat des Gossypols einen höheren zytotoxischen Effekt zu haben. Neben den dargestellten limitierenden und wegen der zytotoxischen Effekte der einzelnen BH3-Mimetika, liegt der Verdacht nahe, dass die einzelnen Proteine eine unterschiedlich wichtige Resistenz-fördernde Rolle inne haben, da erst die zusätzliche Inhibition von Mcl-1 entscheidend zu dem Zelluntergang in Gliomzellen beiträgt.



*Abbildung 14.:* Charakterisierung der Zelltod fördernden Eigenschaften von BH3-Mimetika. Die Quantifizierung des Zelltods in den Gliomzelllinien U343 und MZ-54 wurde mittels Durchflusszytometrie (Annexin V/PI) nach Behandlung der synthetisch hergestellten BH3-Mimetika (BH3I-2`, HA14-1 und ABT-737) und dem aus der Baumwollpflanze hergestellten Gossypols (Racemat: (+)-Gossypol bzw Enantiomer: (-)-Gossypol). Beide Gliomzelllinien wurden für 48 h mit 20 µM BH3I-2`, 30 µM HA14-1, 15 µM ABT-737 und 15 µM (+)-Gossypol bzw. (-)-Gossypol behandelt. Die Daten entsprechen Mittelwerten ± SEM von n = 4 unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten erzielt. \*, p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

#### 5.4 ANALYSE DER MÖGLICHEN TOXISCHEN EFFEKTE VON GOSSYPOL IN NICHT-TRANSFORMIERTEN ZELLEN

Um die möglichen toxischen Effekte in nicht-transformierten Zellen auf ihre hohe Spezifität hinsichtlich einer möglichen Therapie gegen das Glioblastoma multiforme zu beschreiben, wurden Kontrollexperimente in aus Ratten stammenden, nicht-transformierten Astrozyten durchgeführt. Diese Astrozyten wurden mit 20  $\mu\text{M}$  BH3I-2', 30  $\mu\text{M}$  HA14-1, 10 und 20  $\mu\text{M}$  ABT-737, sowie 10, 15, 20 und 30  $\mu\text{M}$  (+)-Gossypol bzw (-)-Gossypol für 48 h behandelt. Für die Ermittlung des Zelltodes mittels Durchflusszytometrie wurden die astrozytären Primärkulturen nach der Behandlung für die Analyse vorbereitet und mit Annexin V und PI gefärbt. Ergebnisse der Zelltodanalyse zeigten, dass ABT-737 bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  moderat zytotoxisch wirkt, wohingegen eine Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  einen signifikant hohen Zelltod von ca. 40% induzierte. Sowohl die beiden BH3-Mimetika BH3I-2' und HA14-1, als auch die Konzentrationen von 10-20  $\mu\text{M}$  an Gossypol lösten keinen Zelltod in den Astrozyten aus, wohingegen die Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  an (+)-Gossypol bzw (-)-Gossypol sehr zytotoxisch auf die Zellen wirkte, und einen signifikanten Zelltod von 35% bis hin zu 55% auslöste.

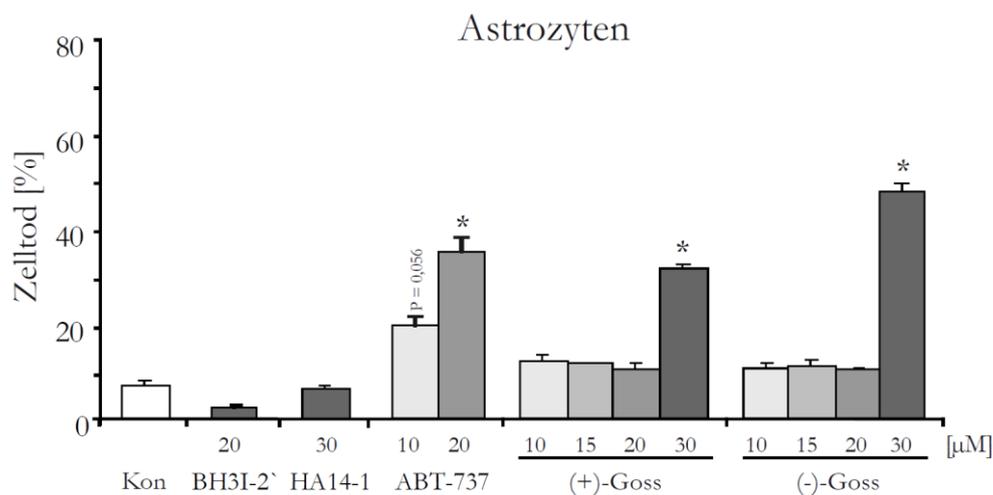


Abbildung 15: Primärkulturen aus Ratten stammender Astrozyten wurden mit im Diagramm vermerkten Konzentrationen an BH3I-2', HA14-1 und ABT-737, sowie Gossypol (Racemat: (+)-Gossypol bzw Enantiomer: (-)-Gossypol) für 48 h behandelt. Die Untersuchung des Zelltods wurde nach Annexin V- und PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Daten entsprechen Mittelwerten  $\pm$  SEM von  $n = 4$  unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten erzielt. \*,  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

### 5.5 GOSSYPOL INDUZIERT EINEN CASPASE-UNABHÄNGIGEN ZELLTOD IN GLIOMZELLEN

Um der Frage nachzugehen, warum in den Gliomzellien trotz Apoptose-Resistenz nach Gossypol-Behandlung Zelltod induziert werden konnte, wurde hier untersucht, ob durch Gossypol ein apoptotischer Zelltod induziert wurde. Die Aktivierung von Caspasen ist ein wichtiges Charakteristikum der Apoptose. Daher wurde für die erste Abklärung der Fragestellung eine Caspasen-Aktivitätsmessung durchgeführt, da der Ausschluss eines Caspase-unabhängigen Zelltodes, für die Sensitivierung von Gliomzellen notwendig erscheint. Für diese Untersuchung wurde die Zelllinie U343 mit 20  $\mu\text{M}$  BH3I-2', 30  $\mu\text{M}$  HA14-1, 10  $\mu\text{M}$  ABT-737, sowie 15  $\mu\text{M}$  (+)-Gossypol bzw (-)-Gossypol für 48 h behandelt und nach Lyse der Kulturen der Caspase-Aktivitätstest durchgeführt. Die Behandlung mit 3  $\mu\text{M}$  Staurosporin für 6 h wurde als Positivkontrolle zur Induktion der Apoptose mitgeführt. Ergebnisse des Tests ergaben keine Caspasen-Induktion nach BH3I-2', HA14-1- und Gossypol-Behandlung. Lediglich die Behandlung mit ABT-737 zeigte eine geringfügige Caspasen-Induktion. Diese Befunde legen nahe, dass der Zelltod, der durch Gossypol induziert wurde, nicht den Caspase-abhängigen Signalwegen unterliegt. Zudem konnten die Ergebnisse der Behandlung mit BH3I-2' und HA14-1 mit denen in der vorangegangenen Arbeit reproduziert werden (Hetschko et al., 2008).

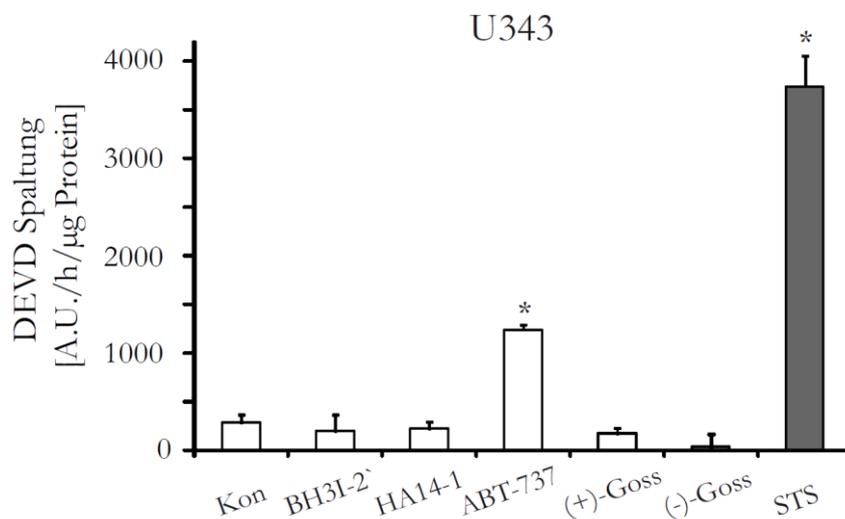


Abbildung 16: Gossypol induziert einen Caspase-unabhängigen Zelltod in Gliomzellen. Für die Untersuchung der Caspasen-Induktion wurde die Zelllinie U343 mit 20  $\mu\text{M}$  BH3I-2', 30  $\mu\text{M}$  HA14-1, 10  $\mu\text{M}$  ABT-737, sowie 15  $\mu\text{M}$  (+)-Gossypol bzw (-)-Gossypol für 48 h behandelt. Die Behandlung mit 3  $\mu\text{M}$  Staurosporin für 6 h wurde als Positiv-Kontrolle zur Induktion der Apoptose mitgeführt. Gesamtzellextrakte der Kulturen wurden anschließend durch Spaltung des fluorogenen Substrates Ac-DEVD-AMC [10  $\mu\text{M}$ ] auf Caspase-3-Aktivität hin untersucht. Die Daten entsprechen Mittelwerten  $\pm$  SEM von n = 4 unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten erzielt. \*, p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

## 5.6 AKTIVIERUNG DES PRO-APOPTOTISCHEN BCL-2 FAMILIENMITGLIEDES BAX NACH GOSSYPOL-BEHANDLUNG

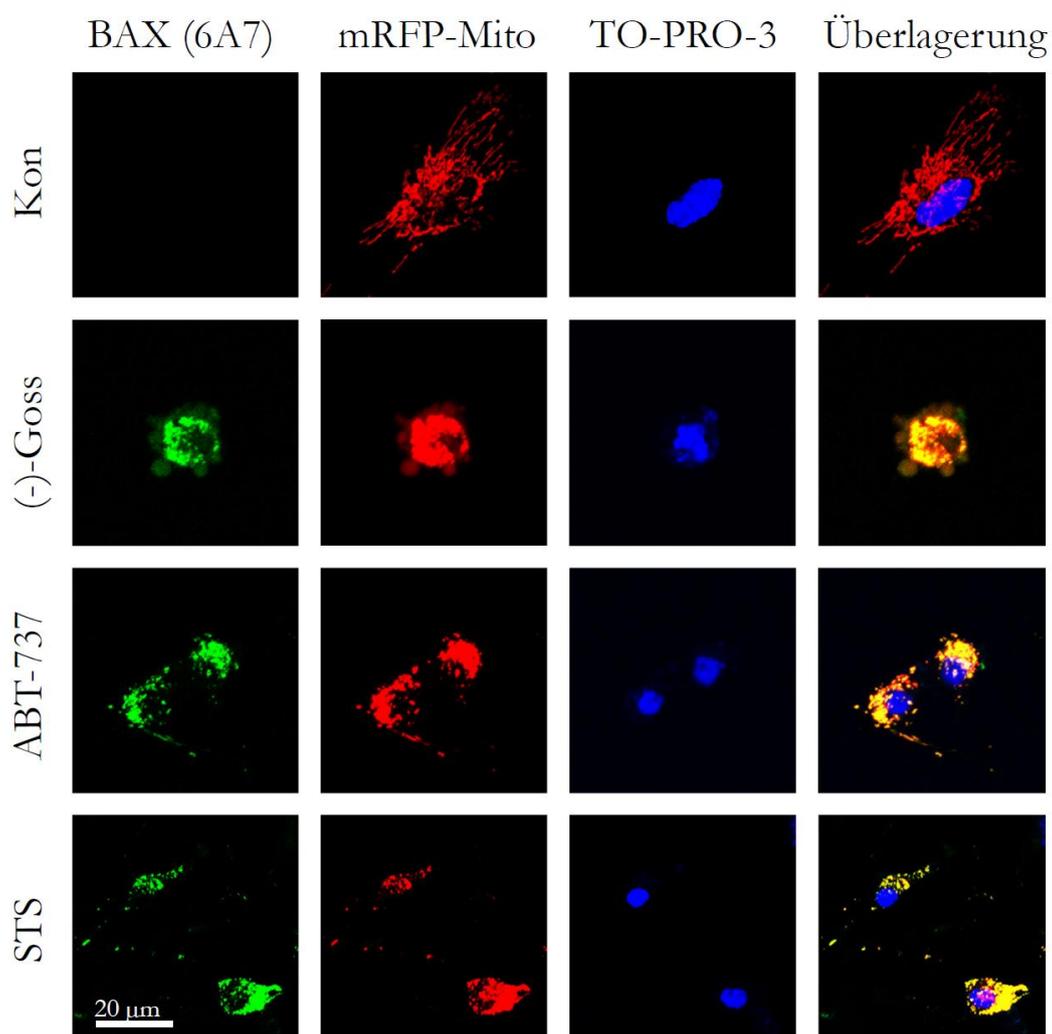
Um zu bestätigen, dass Gossypol spezifisch an Bcl-2-Proteine bindet, diese inaktiviert (Kang und Reynolds, 2009), und darüber hinaus keine Apoptose induziert, wurden weitere Experimente geplant, die diesen Zusammenhang besser darstellen sollten. Für dieses Experiment wurde die Gliomzelllinie U343 transient mit dem Plasmid mRFP-Mito transfiziert, wodurch nach Integration des Plasmids in die DNA der Zelle, die Mitochondrien mittels roter Fluoreszenz dargestellt werden können. Die dadurch entstehende Färbung an den Mitochondrien veranschaulicht sowohl die Kollokalisierung nach Bax-Aktivierung zu den Mitochondrien, als auch die einhergehende Fragmentierung bzw. Kondensierung des Mitochondriums nach Induktion des intrinsischen Signalwegs. Die Integration des Plasmids mRFP-Mito dauert ca. 24 h, daher wurden erst nach Ablauf von einem Tag, die auf Glasplättchen ausgebrachten Zellen mit 15  $\mu\text{M}$  (-)-Gossypol und 10  $\mu\text{M}$  ABT-737 für 48 h behandelt. Als Positivkontrolle der Aktivierung des intrinsischen Signalwegs über die Aktivierung von Bax, der zur Apoptose führt, wurden die Zellen mit 3  $\mu\text{M}$  Staurosporin für 6 h behandelt. Nach Ablauf der Behandlung wurden die Zellen mit 4%-Paraformaldehyd fixiert und anschließend die Zellen mit dem Antikörper, die die aktive Form der monomeren Form von Bax nachweist, angefärbt. Nach Abschluss der Färbung wurden die Zellen für die konfokale Mikroskopie vorbereitet.

Die *Abbildung 17* zeigt repräsentative Bildausschnitte nach jeweiliger Behandlungen mit 15  $\mu\text{M}$  Gossypol, 10  $\mu\text{M}$  ABT-737 und 3  $\mu\text{M}$  STS. Zellen, die unbehandelt vorliegen, zeigen laminare und ungeschädigte Mitochondrien. Eine Aktivität der Form von Bax an den Mitochondrien konnte nur in 5% der Gesamtzellpopulation beobachtet werden. Die Zellen, die mit (-)-Gossypol, ABT-737 sowie Staurosporin behandelt worden sind, zeigen die aktive oligomere Form von Bax, die ebenfalls mit einer erwarteten Kollokalisierung an den Mitochondrien beobachtet wurde. Die Überlagerung der Fluoreszenz von Bax und mRFP-Mito veranschaulicht, dass das Bax-Protein an den Mitochondrien angelagert ist. Zusammengefasst und als Diagramm dargestellt, zeigt sich eine stark erhöhte Aktivierung von Bax nach Gossypol-Behandlung von 25%. Dahingegen zeigte nach ABT-737-Behandlung 12% der Zellen die aktive Form von Bax. Staurosporin zeigte als Positivkontrolle eine erwartete Aktivierung des Bax-Proteins von 65%.

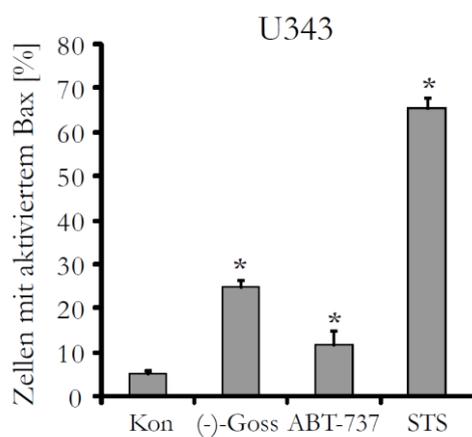
Im Hinblick auf diese Resultate konnte gezeigt werden, dass nach der Gossypol-Behandlung der Zelltod in Gliomzellen induziert wurde, der aber nicht unweigerlich mit einer Aktivierung von Bax assoziiert ist und welcher anscheinend nicht in dem apoptotischen Signalweg mündet.

A)

U343



B)

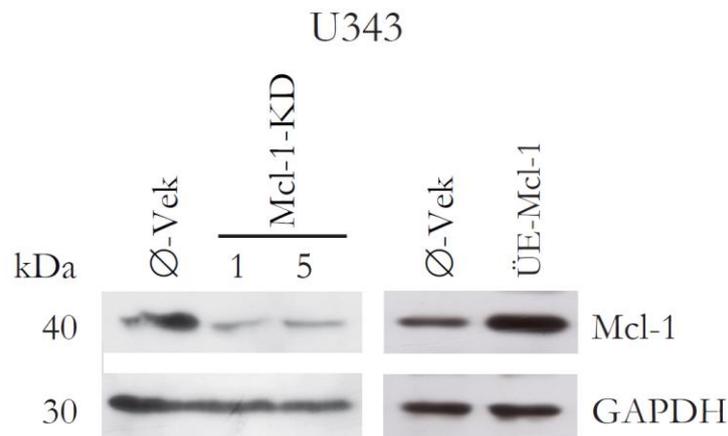


*Abbildung 17:* Die Aktivierung des pro-apoptotischen Proteins Bax nach Gossypol-Behandlung scheint nicht essentiell für den induzierten Zelltod in Gliomzellen zu sein. *A)* Für die Veranschaulichung der Aktivierung von Bax auf Einzelzellebene wurden Zellen der Gliomzelllinie U343 auf Glasplättchen ausgebracht, mit dem Plasmid mRFP-Mito transient transfiziert und nach Ablauf von 24 h mit 15  $\mu\text{M}$  (-)-Gossypol und 10  $\mu\text{M}$  ABT-737 für 48 h behandelt. Als Positivkontrolle der Aktivierung des intrinsischen Signalwegs über die Aktivierung von Bax, der zur Apoptose führt, wurden die Zellen mit 3  $\mu\text{M}$  Staurosporin für 6 h behandelt. Nach der 4%-Paraformaldehydfixierung wurden die Zellen anschließend mit dem Antikörper, der die aktive Form der monomeren Form von Bax nachweist, angefärbt. Die Zellkerne wurden mit TO-PRO-3 angefärbt. Nach Abschluss der Färbung wurden die Zellen für die konfokale Mikroskopie vorbereitet. Maßstab 20  $\mu\text{m}$ . *B)* Für die quantitative Analyse der aktiven Form von Bax nach Behandlung mit (-)-Gossypol, ABT-737 und STS (Konzentration und Dauer wie oben beschrieben), wurden repräsentative Bereiche ausgewählt. Die Daten entsprechen Mittelwerten  $\pm$  SEM von  $n = 3$  unabhängigen Kulturen in denen 100 Zellen pro Experiment gezählt wurden. \*,  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

## 5.7 MCL-1 SPIELT EINE WICHTIGE ROLLE FÜR DIE ZELLTODRESISTENZ VON GLIOMZELLINIEN

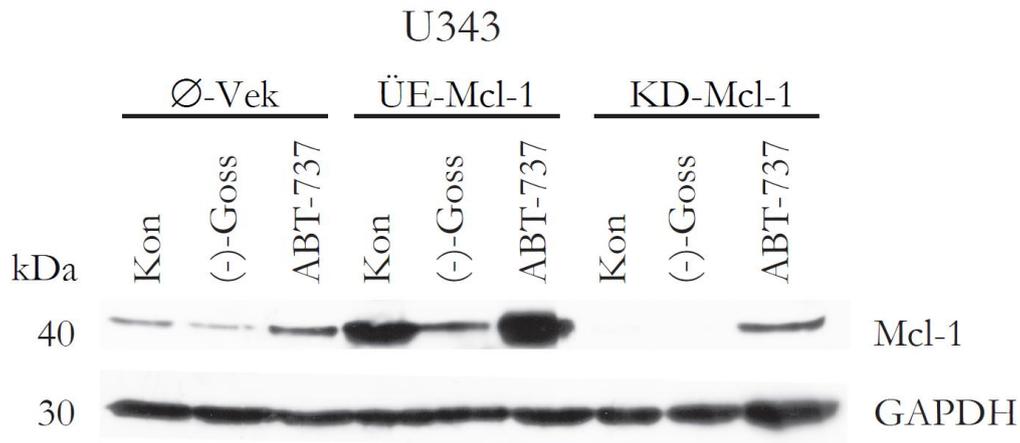
Die durch Gossypol ausgelösten Zelltodmechanismen, scheinen unter Kontrolle der inhibitorischen Bcl-2-Familienmitglieder zu stehen. Daher ist es notwendig, die dahinter stehenden molekularen Mechanismen zu verstehen und näher die bedeutende Rolle der Bcl-2-Familienmitglieder zu charakterisieren. Darauf aufbauend, könnten therapeutische Ansätze entwickelt werden.

Das anti-apoptotische Protein Mcl-1 scheint für die Resistenz der Gliomzelle, gegenüber Zelltod fördernder Stimuli, wichtig zu sein, da erst über seine Inhibierung ein massiver Zelltod ausgelöst werden konnte. Der massive Zelltod wurde nur durch die Behandlung mit (-)-Gossypol, welches Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w und Mcl-1 inhibiert, ausgelöst. Das BH3-Mimetika ABT-737 konnte nur einen moderaten Zelltod auslösen, was anscheinend an der spezifischen Inhibition von nur drei Bcl-2-Familienmitgliedern, Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w und nicht Mcl-1, liegen könnte. Aufgrund dieser Beobachtung, sollte die Rolle von Mcl-1 in der Signalkaskade näher untersucht werden. Daher wurde in einer Gliomzelllinie Mcl-1 zum einen überexprimiert und zum anderen stabil reprimiert. Dieser Knockdown von Mcl-1 wurde mittels lentiviralem Systems nach Herstellerangaben (SIGMA-Aldrich) in der Gliomzelllinie U343 etabliert. Aus einem Set von fünf Sequenzen, die alle gegen das Transkript von Mcl-1 gerichtet waren, konnten lediglich zwei der Sequenzen einen spezifischen stabilen Knockdown in der Gliomzelllinie U343 herbeiführen (*Abb. 18*). Ebenfalls wurde in der Zelllinie U343 zum Vergleich eine Überexpression von Mcl-1 über eine transiente Transfektion mit dem Plasmid TOPO-Mcl-1 nach 48h bewirkt (*Abb. 18*).



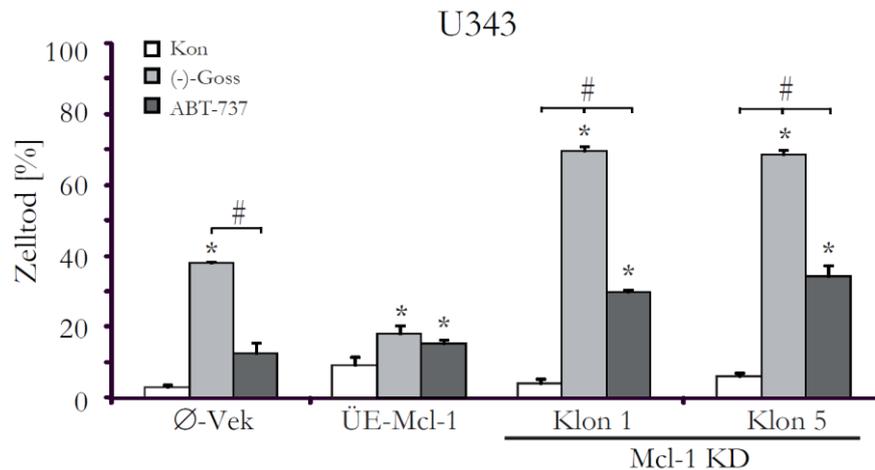
*Abbildung 18:* In der Gliomzelllinie U343 wurde ein stabiler lentiviraler Knockdown, sowie eine transiente Überexpression von Mcl-1 durchgeführt. Für die Etablierung wurden Gesamtzellextrakte aller fünf sequenzspezifischen lentiviralen Klone und mit zusätzlicher Kontrolle generiert. Die Kontrollkultur wurde durch die lentivirale Transduktion mit dem pLKO.1-puro-Kontrollvektor (Ø-Vek) erzeugt. Die Mcl-1 Überexpression wurde durch die transiente Transfektion mit dem Plasmid TOPO-Mcl-1 in der Gliomzelllinie U343 nach 48 h bewirkt. Mittels Immunoblot gerichtet mit dem Antikörper gegen Mcl-1 konnte sowohl der Knockdown, als auch die Überexpression nachgewiesen werden. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

Für die Einschätzung der anscheinend wichtigen Rolle von Mcl-1, bezugnehmend der Resistenz von Gliomzellen, wurden verschiedene experimentelle Ansätze geplant. Der erste Ansatz galt dem Interesse der tatsächlichen Inhibierung des Mcl-1 Proteins nach (-)-Gossypol-Behandlung. Zum Vergleich wurden U343 Gliomzellen, mit dem pLKO.1-puro-Kontrollvektor versehen, mit einem Mcl-1 überexprimierenden- und einem Mcl-1-Knockdown-Klon gegenübergestellt. Diese Kulturen wurden einer Behandlung mit 15 µM (-)-Gossypol und zum Vergleich auch einer 10 µM ABT-737-Behandlung für 48 h unterzogen. Auf Proteinebene wurden die Gesamtzellextrakte mittels Immunoblot untersucht. Resultate zeigten, dass nach Behandlung mit (-)-Gossypol eine starke Verringerung des Proteinniveaus von Mcl-1 sowohl in den parental Zellen, als auch dem überexprimierenden Mcl-1-Klon zu beobachten war. Die Behandlung mit ABT-737, welches zielgerichtet Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w inhibiert, zeigte wie erwartet, in allen drei Linien keine Verringerung des Proteingehalts von Mcl-1, interessanterweise aber eine leichte Erhöhung von Mcl-1. Mittels dieser Ergebnisse konnte dargestellt werden, dass Gossypol spezifisch auf Mcl-1 wirkt und durch diese Spezifität eine Degradierung des Proteins erreicht werden kann.



*Abbildung 19:* Gossypol vermindert spezifisch das Expressionslevel von Mcl-1. Für den Nachweis der Reprimierung des Mcl-1 Protein nach (-)-Gossypol-Behandlung wurden mit dem Leervektor (∅-Vek) versehene, Mcl-1-überexprimierende (ÜE-Mcl-1) und Mcl-1-Knockdown-Klone (KD-Mcl-1) der Gliomzelllinie U343 mit 15 µM (-)-Gossypol und 10 µM ABT-737 für 48 h behandelt. Mittels Immunoblot wurden die Gesamtzellextrakte auf das Proteinniveau von Mcl-1 hin untersucht. Die Kontrollkultur wurde durch die lentivirale Transduktion mit dem pLKO.1-puro-Kontrollvektor (∅-Vek) erzeugt. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Der zweite Ansatz, der die essentielle Rolle von Mcl-1 hinsichtlich der Zelltod-Resistenz unterstreichen sollte, wurde durch eine durchflußzytometrische Analyse das Ausmaß an Zelltod analysiert. Für dieses Experiment wurden, wie oben beschrieben, alle drei U343 Kulturen, mit ein weiterer Mcl-1 Knockdown-Klon, sowohl mit (-)-Gossypol, als auch mit ABT-737 für 48 h behandelt. Nach Doppelfärbung mit Annexin V und PI konnte das Ausmaß an Zelltod bestimmt werden. Die Analysen zeigten, nach (-)-Gossypol-Behandlung und zusätzlichem Mcl-1-Knockdown eine drastische Erhöhung des Zelltods von ~ 38% bis zu ~ 70%. Die Behandlung mit ABT-737 in den Mcl-1-Knockdown-Klonen konnte den Zelltod von ~ 12% (∅-Vek) bis zu ~ 30% signifikant steigern. Interessanterweise zeigten die Mcl-1 überexprimierenden U343 Zellen keinen Zelltod nach beiden Behandlungen (ABT-737 und (-)-Gossypol). Die Überexpression von Mcl-1 scheint die Zellen resistenter gegenüber den Behandlungen zu machen. Dahingegen konnte durch die Inhibition von Mcl-1 eine Sensitivierung in den Gliomzellen erreicht werden. Dies unterstreicht die wesentlich wichtige Rolle von Mcl-1 in der Zelltod-Signalkaskade, die offenbar bedeutend für die Resistenz in Gliomzellen ist.



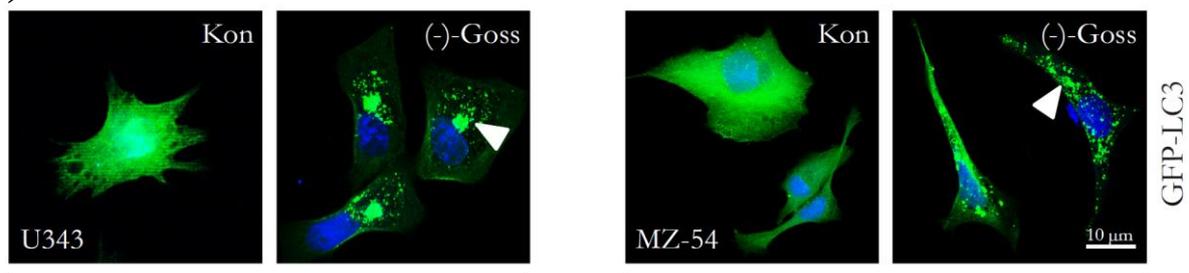
*Abbildung 20:* Mcl-1-abhängige Resistenz in Gliomzellen. Quantifikation des Zelltods nach Färbung von Annexin V und PI wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Für die Quantifizierung wurde ein Mcl-1-überexprimierender Klon (ÜE-Mcl-1) und zwei Klone mit einem stabilen Mcl-1-Knockdown (Klon 1 und Klon 5) mit der Kontrollkultur (Ø-Vek) der Zelllinie U343 verglichen. Alle Kulturen wurden mit 15 µM (-)-Gossypol und 10 µM ABT-737 für 48 h behandelt. Die Daten entsprechen Mittelwerten ± SEM von n = 4 unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten erzielt. \*, p < 0,05 im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle. #, p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle mit angegebener Behandlung

### 5.8 GOSSYPOL INDUZIERT EINEN NICHT-APOPTOTISCHEN, AUTOPHAGISCHEN ZELLTOD IN GLIOMZELLEN

Die in 5.5 beschriebenen Erkenntnisse zeigten, dass der durch Behandlung mit Gossypol in den Gliomzellen erzeugte Zelltod, Caspase-unabhängig war. Da aber verschiedene Caspase-unabhängige Zelltodmechanismen nebenher existieren, war es von großer Bedeutung, den induzierten Typ des Zelltods näher zu charakterisieren. Das anti-apoptotische Protein Bcl-2 steht in der Signalkaskade direkt dem Protein Beclin1 voraus, welches an der Induzierung des autophagischen Zelltods beteiligt ist. Unter der Annahme einer Inhibition von Bcl-2 durch BH3-Mimetika, kann das Protein Beclin1 nicht mehr über das anti-apoptotische Protein gehemmt werden und induziert somit den autophagischen Prozess. Da die Aktivierung des autophagischen Zelltods mit einer Lipidierung von LC3 in die Autophagosomenmembran charakterisiert ist, wurde das GFP-LC3-Plasmid als Autophagiemarker für die Aufklärung des durch Gossypol induzierten Zelltods verwendet. Für die Untersuchung wurden zwei Gliomzelllinien, U343 und MZ-54, mit dem Plasmid GFP-LC3 stabil transfiziert. Die GFP-LC3 stabil exprimierenden Zellen der Zelllinien U343 und MZ-54, wurden auf Glasplättchen ausgebracht und am darauf folgenden Tag mit 15 µM (-)-Gossypol für 48 h behandelt. Nach der Fixierung und Kernfärbung mit TO-PRO-3 wurden die Zellen für die konfokale Mikroskopie aufbereitet. Ergebnisse auf Einzelzelebene zeigten bei beiden Zelllinien ein klares zytoplasmatisches GFP-Signal unter Kontrollbedingungen, welches auf die inaktive Form von LC3-I schließen lässt. Interessanterweise zeigte sich nach Behandlung mit (-)-Gossypol in beiden Zelllinien eine erhöhte Anzahl von vesikulären Strukturen im Zytoplasma, die auf die Aktivierung

von LC3-II hindeuten. Das LC3-II-Protein wird in die Membran der Autophagosomen eingebaut. Dies scheint offenbar nach der Gossypol-Behandlung aufgetreten zu sein, da vesikuläre Strukturen zu beobachten waren. Eine Quantifizierung der sich gebildeten Autophagosomen wurde ebenfalls durchgeführt. Zum Vergleich wurden die U343 und MZ54 GFP-LC3 Klone neben der 15  $\mu\text{M}$  (-)-Gossypol-Behandlung zusätzlich mit 20  $\mu\text{M}$  BH3I-2` und 30  $\mu\text{M}$  HA14-1 für 48 h behandelt. Ergebnisse der Quantifikation auf Einzelzellebene zeigten, dass nach Behandlung spezifischer Bcl-2 und Bcl-xL Inhibitoren (BH3I-2` und HA14-1) nur wenige Autophagosomen gebildet wurden ( $\sim 10\%$  in U343 und  $\sim 20\%$  in MZ54). Im Vergleich dazu zeigten Zellen, die mit (-)-Gossypol behandelt wurden, ein weitaus größeres Ausmaß an Autophagosomenbildung (85% in U343 bzw. 98% in MZ54).

A)



B)

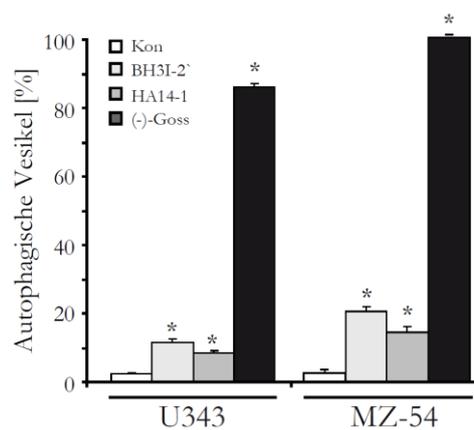
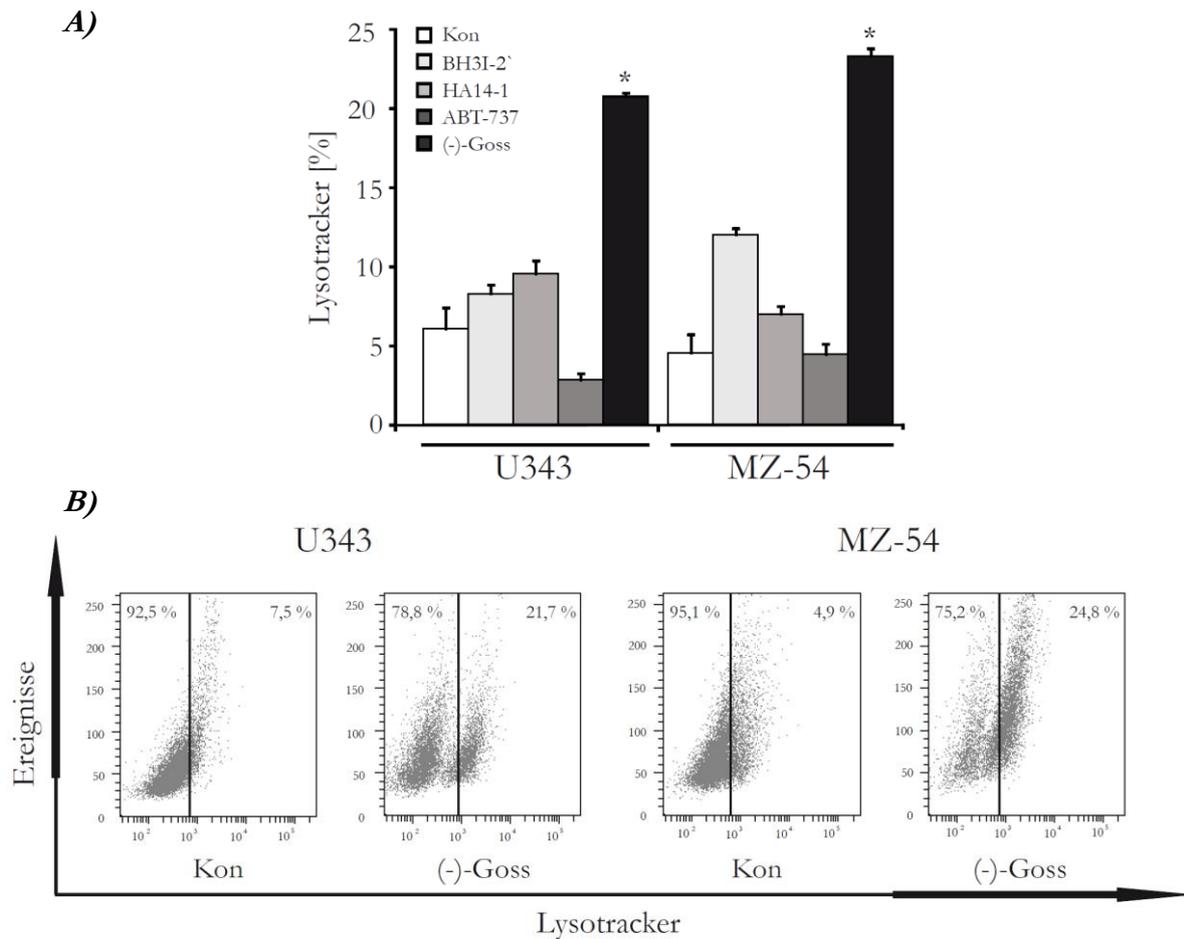


Abbildung 21: (-)-Gossypol löst einen autophagischen Zelltod in Gliomzellen aus A) Die Zelllinien U343 und MZ54 wurden mit dem Plasmid GFP-LC3 stabil transfiziert und mit 15  $\mu\text{M}$  (-)-Gossypol für 48 h behandelt. Nach Ablauf der Behandlung wurden die Zellen fixiert, die Kerne mit TO-PRO-3 [1 $\mu\text{M}$ ] angefärbt und für die konfokale Mikroskopie vorbereitet. Für die abgebildete Darstellung wurden repräsentative Bereiche ausgewählt. Die mit Pfeilspitzen gekennzeichneten Bereiche zeigen Autophagosomen nach (-)-Gossypol-Behandlung. Maßstab 10  $\mu\text{m}$ . B) Eine quantitative Analyse der gebildeten Autophagosomen nach Behandlung mit 20  $\mu\text{M}$  BH3I-2` und 30  $\mu\text{M}$  HA14-1, sowie 15  $\mu\text{M}$  (-)-Gossypol für 48 h wurde in den Gliomzelllinien U343 und MZ-54 durchgeführt und als Diagramm dargestellt. Die Daten entsprechen Mittelwerten  $\pm$  SEM von  $n = 3$  unabhängigen Kulturen in denen 100 Zellen pro Experiment gezählt wurden. \*,  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

## 5.9 LYSOSOMALE AKTIVIERUNG NACH GOSSYPOL-BEHANDLUNG

Autophagie wird durch die Bildung von Autophagosomen gekennzeichnet. Bei diesem Prozess werden langlebige Proteine, zytoplasmatisches Material und Zellorganellen abgebaut. Nach der Bildung der Autophagosomen, die die zu degradierenden Komponenten enthalten, erfolgt die Fusion mit den Lysosomen, die als zelluläre Degradationssysteme arbeiten. Da durch Gossypol der autophagische Prozess aktiviert wird, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, das die Aktivierung der Lysosomen darstellen soll. Für die Durchführung des Experiments, das die Anreicherung an lysosomalen Vesikeln nach Gossypol-Behandlung aufzeichnen sollte, wurde der basische Farbstoff LysoTracker-Red-DND-99 verwendet. LysoTracker beinhaltet leicht basische Amine, die mit Vesikeln, welche aufgrund von Protonierung einen sauren pH-Wert aufweisen, akkumulieren. Durch die Akkumulation des Farbstoffs LysoTracker in den aziden Vesikeln lässt sich leicht mittels Durchflusszytometrie das Ausmaß an Lysosomen-Aktivierung in der Zelle detektieren. Für den Nachweis der lysosomalen Aktivität wurden die Zelllinien U343 und MZ-54 mit 20  $\mu\text{M}$  BH3I-2` und 30  $\mu\text{M}$  HA14-1, sowie 10  $\mu\text{M}$  ABT-737 und 15  $\mu\text{M}$  (-)-Gossypol für 48 h behandelt. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen, wie in 4.18.4 beschrieben, für die Durchflusszytometrie vorbereitet und mit 25 nM LysoTracker Red angefärbt. Eine Induktion der lysosomalen Aktivität innerhalb der Zelle wird durch den Anstieg der Fluoreszenzintensität des LysoTracker-Farbstoffs gewertet. Die quantitative Analyse zeigt nach Behandlung mit allen drei BH3-Mimetika (BH3I-2`, HA14-1, ABT-737) eine moderate lysosomale Aktivität im Höchstfall von  $\sim 11\%$ . Dahingegen zeigt die Behandlung mit (-)-Gossypol einen erwarteten, weitaus höheren, signifikanten Anstieg an lysosomaler Aktivität von 21% in der Zelllinie U343 und 24% in der Zelllinie MZ-54. Verglichen mit den Daten der Einzelzellanalyse des Autophagiemarkers GFP-LC3 mit denen der quantitativen Analyse der lysosomalen Aktivierung stellt sich heraus, dass nach Gossypol-Behandlung ein autophagischer Mechanismus angekurbelt wird, der über eine Induktion der Autophagosomen- und Lysosomen-Bildung assoziiert ist.

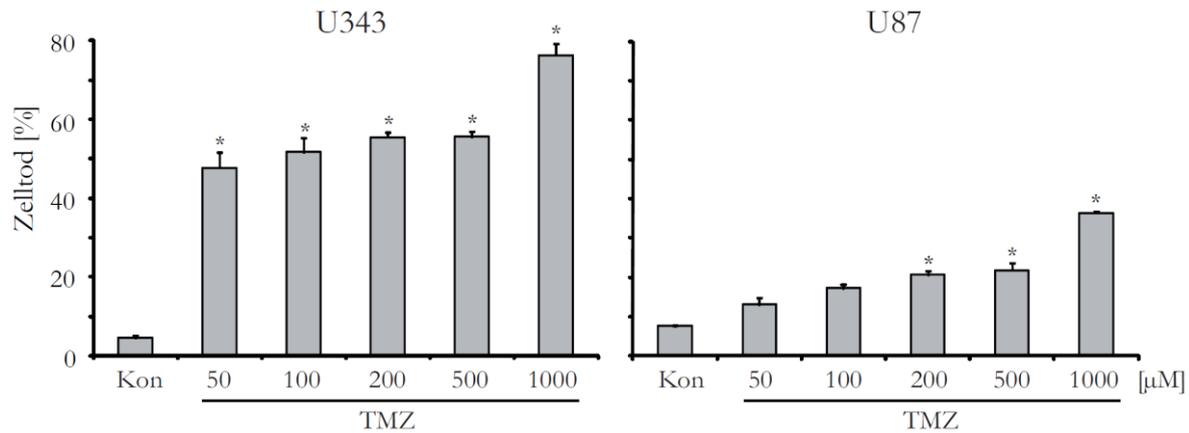


*Abbildung 22:* Induktion der lysosomalen Aktivität nach Gossypol-Behandlung *A)* Die Lysosomale Aktivität wurde durch den Einsatz des Farbstoffes Lysotracker-Red-DND-99 bestimmt. Für die Analyse wurden die Gliomzelllinien U433 und MZ-54 mit 20  $\mu\text{M}$  BH3I-2' und 30  $\mu\text{M}$  HA14-1, sowie 10  $\mu\text{M}$  ABT-737 und 15  $\mu\text{M}$  (-)-Gossypol für 48 h behandelt. Das Ausmaß an lysosomaler Aktivität wurde nach Färbung mit Lysotracker [25 nM] und mittels Durchflusszytometrie bestimmt. *B)* Repräsentative Dot Plot-Diagramme der Lysotrackerfärbung wurden nach Behandlung mit 15  $\mu\text{M}$ (-)-Gossypol nach 48 h Behandlung in den Zelllinien U433 und MZ-54 erstellt. Die Daten entsprechen Mittelwerten  $\pm$  SEM von  $n = 4$  unabhängigen Kulturen \*,  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

### 5.10 KOMBINATIONSBEHANDLUNGEN VON GOSSYPOL MIT KONVENTIONELLEN THERAPIEN

Aufgrund der hohen Apoptoseresistenz scheinen Gliomzellen weniger resistent gegenüber nicht-apoptotischen Zelltodprogrammen zu sein (Levine und Yuan, 2005; Kroemer und Levine, 2008). Dieses Phänomen wird heutzutage in der Klinik genutzt, da die zellschädigende Wirkung von Temozolomid (TMZ) bei Gliomtherapien auf nicht-apoptotischen Mechanismen beruht. Um diese Effizienz konventioneller Therapien im Hinblick auf die Induktion nicht-apoptotischer Zelltodprogramme zu verbessern, werden synergistische Therapieansätze verfolgt. Hierfür wird die Inhibition der Bcl-2-Familienmitglieder durch (-)-Gossypol mit der konventionellen Gliomchemotherapie in Form von Temozolomid kombiniert. Dem Wirkstoff Temozolomid steht ein Reperaturenzym entgegen, die O<sup>6</sup>-

Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) (Hegi et al., 2005). Dieses Enzym ist in der Lage, die durch Temozolomid verursachte DNA-Schädigung zu reparieren. In Gliomen kann der Promoter dieses MGMT-Gens methyliert, somit inaktiv bzw. unmethyliert und somit aktiv vorliegen. Liegt der Promoter in der methylierten aktiven Form vor, kann die DNA der Zelle nicht repariert werden. Dies führt dazu, dass die mit TMZ behandelten Zellen nicht wieder repariert werden können und folglich in den Zelltod getrieben werden. Um den Effekt von (-)-Gossypol in der Kombinationstherapie mit TMZ zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Gliomzelllinien verwendet: eine MGMT-positive (U87) und eine MGMT-negative (U343) Gliomzelllinie. Für die Etablierung der Dosis und der Dauer der Behandlung mit TMZ wurde sowohl eine Zeitreihe, als auch ein konzentrationsabhängiges Experiment gestartet. Zur Ermittlung der geeigneten Dosis der TMZ-Behandlung wurden die Zelllinien U343 und U87 mit 50, 100, 200, 500 und 1000  $\mu\text{M}$  TMZ für 24, 48, 72 und 96 h behandelt und mittels Durchflusszytometrie (Annexin V/PI) das Ausmaß an Zelltod bestimmt. Der Zeitpunkt von 96 h hatte sich bei der Einzelbehandlung mit TMZ als geeignet erwiesen (Daten nicht gezeigt), und wurde für alle weiteren Experimente beibehalten. Ergebnisse der Zelltodanalyse zeigten, dass die TMZ-Behandlung in der MGMT-positiven Zelllinie U87 weitaus moderatere Effekte im Vergleich zu der MGMT-negativen Zelllinie U343 aufwies. Interessanterweise zeigte die höchste Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  in U87 ein Ausmaß an Zelltod von 35%. Dahingegen ist die TMZ-Behandlung in den MGMT-negativen Zelllinien, wie erwartet, wesentlich wirksamer. Die Zelllinie U343 zeigt mit der niedrigsten Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  an TMZ ein stark zytotoxische Wirkung von 50%, die durch die 20fache Steigerung der Konzentration (1000  $\mu\text{M}$ ) auf fast 80% potenziert werden konnte. Anhand der Ergebnisse, wurde die Dosis von 100  $\mu\text{M}$  für 96 h für die nachstehenden Experimente verwendet.



*Abbildung 23:* Etablierungsexperiment zur Findung der geeigneten Dosis von TMZ in Gliomzellen. Die Quantifikation des Zelltods wurde nach 96 h in einer MGMT-positiven Zelllinie U87 und einer MGMT-negativen Zelllinie U343 mittels Durchflusszytometrie (Annexin V und PI) durchgeführt. Für die Dosisfindung an TMZ wurde eine Konzentrationsreihe von 50, 100, 200, 500 und 1000 µM erstellt. Die Daten entsprechen Mittelwerten  $\pm$  SEM von  $n = 4$  unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten erzielt. \*,  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Für die Ermittlung des Effekts sowohl von TMZ allein, als auch in der Kombination mit (-)-Gossypol auf Gliomzellen wurden Zellviabilitätsmessungen durchgeführt. Die Methode unterliegt dem Prinzip der Umwandlung des MTT-Reagenzes in das Endprodukt Formazan durch lebende, metabolisch aktive Zellen. Das bedeutet, dass die Umwandlung von MTT immer proportional der Viabilität der Zellen gegenüber steht. Für die Durchführung der Zellviabilitätsmessung wurde die MGMT-positive Zelllinie U87 und die MGMT-negative Zelllinie U343 mit 5, 10, 15 und 30 µM (+)-Gossypol bzw. (-)-Gossypol allein oder in Kombination mit 100 µM TMZ für 96 h behandelt. Ergebnisse des Viabilitätstest zeigten in beiden Zelllinien einen konzentrationsabhängigen Effekt sowohl auf die Einzelbehandlung, als auch einen zusätzlichen nach der Kombinationsbehandlung von (+)-Gossypol bzw. (-)-Gossypol mit TMZ. Im Vergleich (+)-Gossypol bzw. (-)-Gossypol, zeigte das (-)-Gossypol einen stärkeren zytotoxischen Effekt. Bei der Betrachtung beider Zelllinien miteinander wird deutlich, dass die MGMT-positive Zelllinie stärker sowohl auf die Monobehandlung, als auch die Kombinationsbehandlung anspricht anhand dargestellter Resultate wurde sich für die nachstehenden Experimente, für eine Konzentration von 5 µM (-)-Gossypol und 100 µM TMZ (Kombinationsbehandlung) für 96 h entschieden.

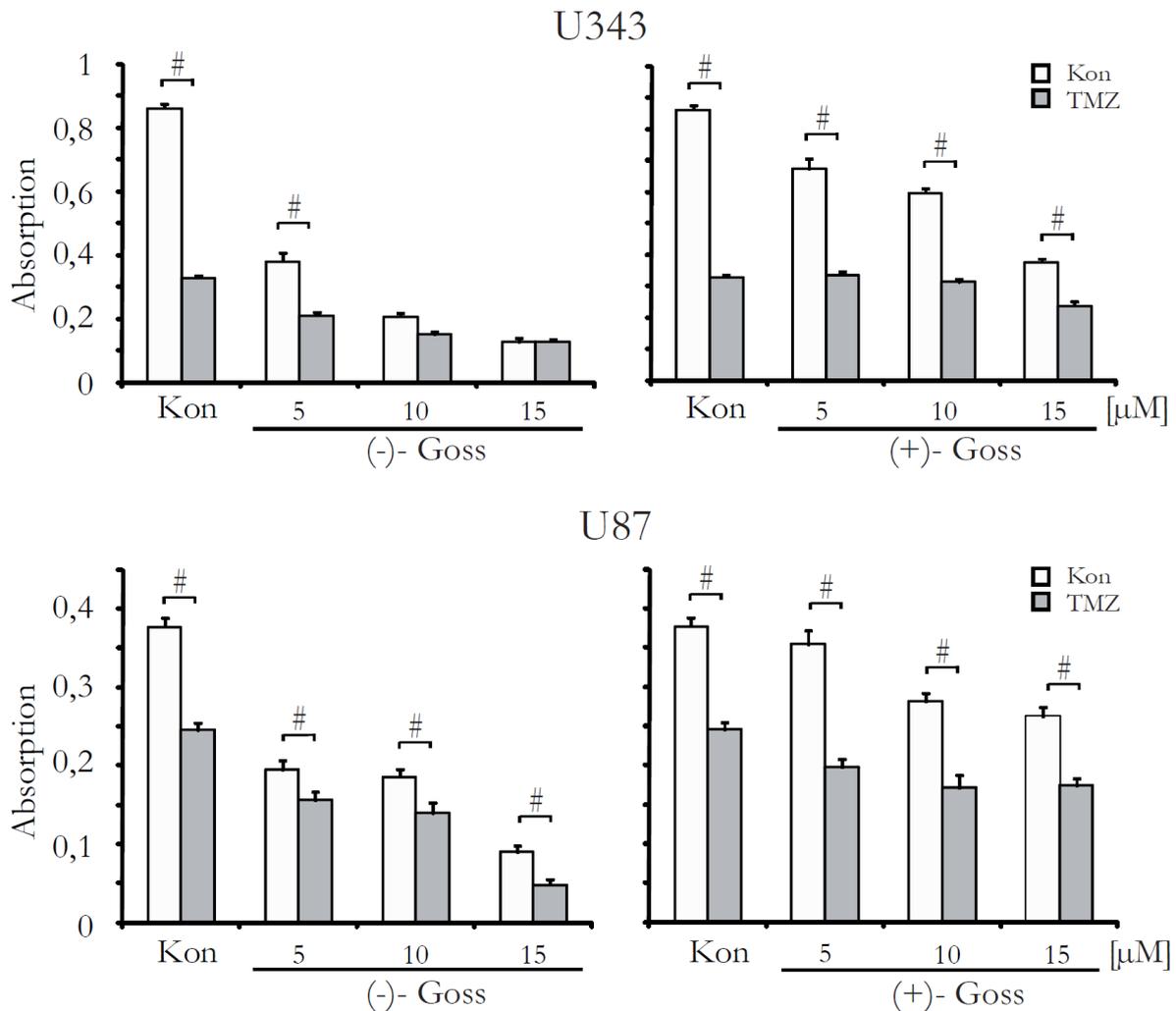
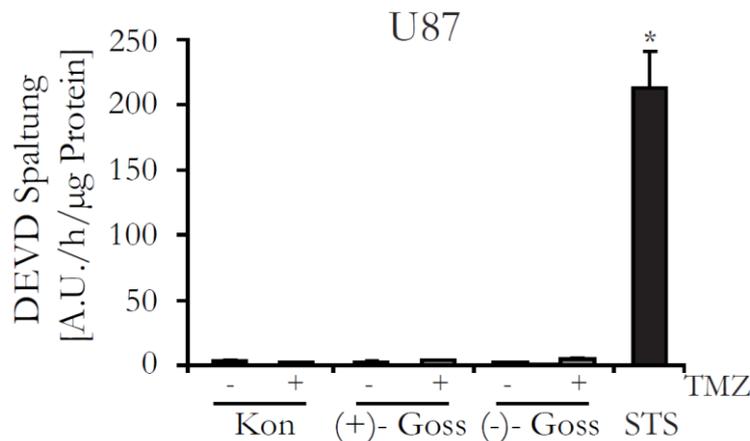


Abbildung 24: Temozolomid hat einen zusätzlichen Effekt auf den durch (-)-Gossypol induzierten Zelltod in MGMT-negativen Gliomzellen. Für die Analyse der Zellviabilität werden Zellen der MGMT-positiven Zelllinie U87 und der MGMT-negative Zelllinie U343 mit 5, 10, 15 und 30  $\mu\text{M}$  (+)-Gossypol bzw (-)-Gossypol allein oder in Kombination mit 100  $\mu\text{M}$  TMZ für 96 h behandelt. Nach Ablauf der Behandlung wird eine Zellviabilitätsmessung durchgeführt. Die Daten entsprechen Mittelwerten  $\pm$  SEM von  $n = 16$  unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten erzielt. \*,  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. #,  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle mit angegebener Behandlung

### 5.11 TEMOZOLOMID FÖRDERT DEN NICHT-APOPTOTISCHEN, CASPASE-UNABHÄNGIGEN ZELLTOD IN MGMT-NEGATIVEN GLIOMZELLEN

Um den durch die (-)-Gossypol und TMZ Kombinationsbehandlung ausgelösten Zelltod näher zu charakterisieren, und den apoptotischen Zelltod auszuschließen, wurden Zellen der MGMT-positiven Zelllinie (U87) einer Caspasen-Aktivitätsmessung unterzogen. Die Zellen der Zelllinie U87 wurden mit 5  $\mu\text{M}$  (+)-Gossypol bzw (-)-Gossypol allein oder in Kombination mit 100  $\mu\text{M}$  TMZ für 96 h behandelt. Staurosporin wurde als positiv-Kontrolle zur Induktion von Apoptose, und der dadurch einhergehenden Aktivierung von Caspasen mitgeführt. Die resultierenden Befunde zeigten keine Aktivierung an Caspasen

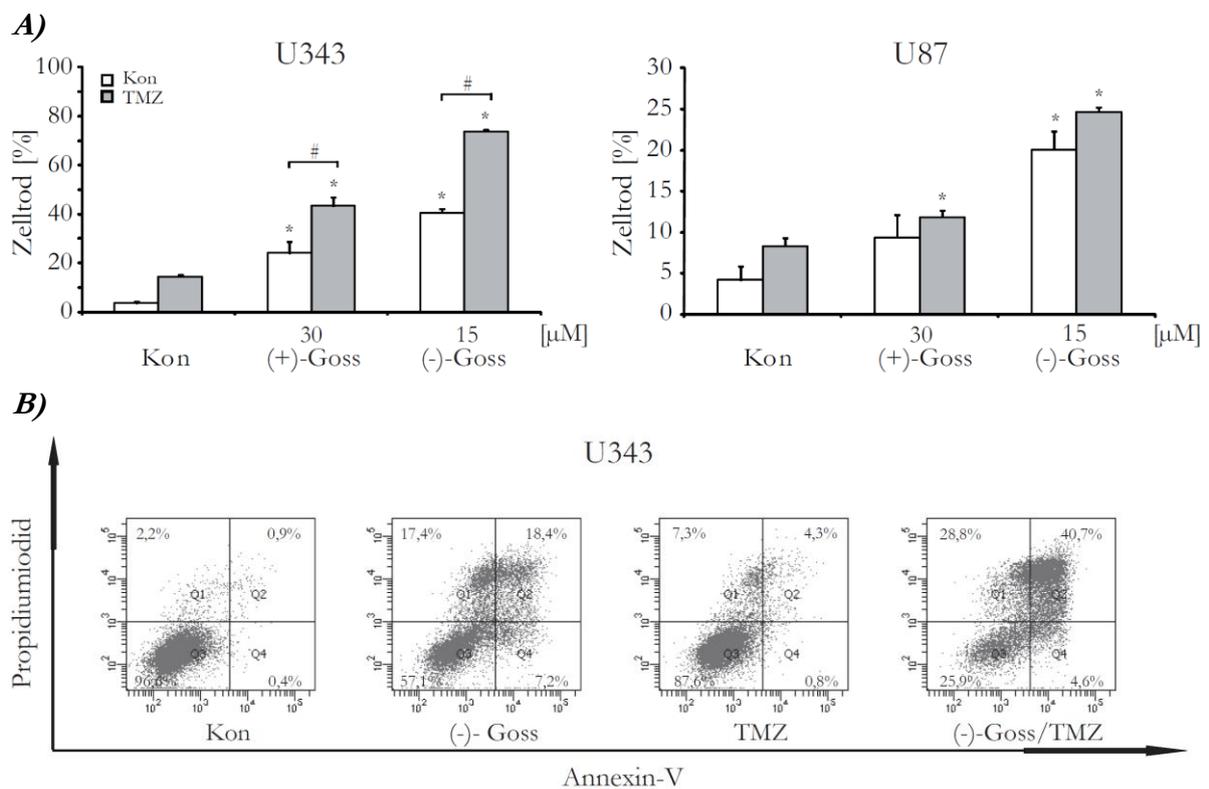
sowohl nach den Monobehandlungen, als auch den Kombinationsbehandlungen. Dies unterstreicht die Hypothese eines induzierten nicht-apoptotischen und Caspase-unabhängigen Zelltods in Gliomzellen nach Gossypol und TMZ Behandlung.



*Abbildung 25:* Temozolomid induziert einen Caspase-unabhängigen Zelltod. Die Analyse der Caspasen-Aktivität nach Einzelbehandlung bzw. Kombinationsbehandlung mit Gossypol und TMZ wurde in der MGMT-positiven Zelllinie U87 durchgeführt. Die Zellen wurden mit 5 µM (+)-Gossypol bzw. (-)-Gossypol allein oder in Kombination mit 100 µM TMZ für 96 h behandelt. Die Gesamtzellextrakte der Kulturen wurden anschließend durch Spaltung des fluorogenen Substrates Ac-DEVD-AMC [10 µM] auf Caspase-3-Aktivität hin untersucht. Die Daten entsprechen Mittelwerten ± SEM von n = 4 unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten erzielt. \*, p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

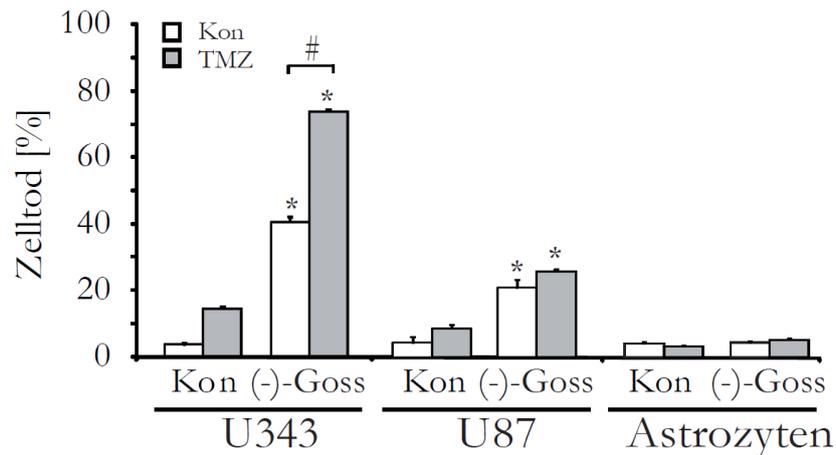
Neben der Analyse der Zellviabilität durch die Umwandlung der MTT-Reagenz, soll die zytotoxische Wirkung von TMZ allein bzw. in Kombination mit Gossypol mittels Durchflusszytometrie sowohl auf den Caspase-unabhängigen Zelltodtyp, als auch auf das Ausmaß an Zelltod hin untersucht werden. Die zelltodschädigende Wirkung von TMZ wurde allein oder in Kombination mit Gossypol ((-)-Gossypol bzw. (+)-Gossypol) nach Doppelfärbung mit Annexin V und PI in den Gliomzelllinien U343 und U87 mittels Durchflusszytometrie getestet. Zum Vergleich werden diese beiden Zelllinien für diese Experimente herangezogen, da sie sich in ihrem MGMT-Status unterscheiden. Ziel dieser Kombinationsbehandlungen, die die Inhibition von Bcl-2-Familienmitgliedern mit konventioneller klinischer Chemotherapie beinhaltet, stellen mögliche Ansätze der Therapie von MGMT-negativen Tumoren dar. Die MGMT-positive Zelllinie U87 und die MGMT-negative Zelllinie U343 wurden mit 5 µM (+)-Gossypol bzw. (-)-Gossypol allein oder in Kombination mit 100 µM TMZ für 96 h behandelt und mittels Durchflusszytometrie (AnnexinV/PI) ausgewertet. Die Resultate des Experiments verdeutlichten die stark zytotoxische Wirkung sowohl der Einzelbehandlung von Gossypol, als auch der Kombinationsbehandlung mit TMZ in der MGMT-negativen Zelllinie. Im Vergleich zur Zelllinie U343 wiesen die Behandlungen in der MGMT-positiven Zelllinie U87 nur moderate Effekte auf. Beide Zelllinien reagierten mit einer Induktion von Zelltod, wobei in der Zelllinie U87 der Zelltod nach der Kombinationsbehandlung von (-)-Gossypol und TMZ von 25% bis zu 80% in U343 gesteigert wurde.

Erstellte FACS Dot Plot Profile nach der Durchflußzytometrie-Messung stellen die Gesamtpopulation nach Doppelfärbung mit Annexin V und PI dar. Es zeichnete sich ab, dass nach der Induktion des Zelltods in beiden Zelllinien und nach allen oben beschriebenen Behandlungen keine reine Annexin V-positive Population (apoptotische Zellen) gebildet wird. Diese Ergebnisse stützen ebenfalls die Annahme eines nicht-apoptotischen Zelltods, der rein Caspase-unabhängig abläuft und offenbar einem autophagischen Mechanismus unterliegt.



*Abbildung 26:* TMZ und Gossypol induzieren einen nicht-apoptotischen Zelltod in Gliomzellen. Für die Analyse wurden die Gliomzelllinien U343 (MGMT-positiv) und U87 (MGMT-negativ) mittels Durchflusszytometrie nach Färbung mit Annexin V und PI auf das Ausmaß an Zelltod hin untersucht. *A)* Beide Zelllinien werden mit 5  $\mu\text{M}$  (+)-Gossypol bzw (-)-Gossypol allein oder mit 100  $\mu\text{M}$  TMZ in Kombination für 96 h behandelt. Quantifizierung des Zelltods, auch als repräsentatives FACS Dot Plot-Diagramm für die Zelllinie U343 nach Behandlung mit (-)-Gossypol allein oder mit TMZ *B)*. Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 4$  unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten erzielt. \*,  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. #,  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle mit angegebener Behandlung.

Es wurde ein zusätzliches Kontrollexperiment in nicht-transformierten Astrozyten geplant, um die spezifische Wirkungsweise von Gossypol und TMZ auf Gliomzellen darzustellen. Die aus Ratten stammenden Astrozyten wurden mit 5  $\mu\text{M}$  (-)-Gossypol allein oder in Kombination mit 100  $\mu\text{M}$  TMZ für 96 h behandelt. Die Anzahl an lebenden Zellen wurde nach Färbung mit Annexin V und PI mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Resultate, die aus der durchflusszytometrischen Analyse erzielt wurden, unterstreichen die spezifische Wirkung auf Gliomzellen, da nach allen oben beschriebenen Behandlungen kein Zelltod in den Astrozyten nachgewiesen werden konnte.



*Abbildung 27:* Die Kombinationsbehandlung von Gossypol und TMZ wirkt spezifisch in Gliomzellen und nicht in nicht transformierten Astrozyten. Primäre, aus Ratten stammende Astrozyten, werden auf ihr Überleben nach Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  (-)-Gossypol allein oder in Kombination mit 100  $\mu\text{M}$  TMZ für 96 h getestet. Die Zellen wurden nach Ablauf der Behandlung mit Annexin V/PI gefärbt und mittels Durchflusszytometrie das Ausmaß an Zelltod bestimmt. Zur besseren Gegenüberstellung wurden in diesem Diagramm die Zellen U343 und U87, die den gleichen Behandlungen unterliegen, mitgeführt. Mittelwerten  $\pm$  SEM von  $n = 4$  unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten erzielt. \*,  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. #,  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle mit angegebener Behandlung.

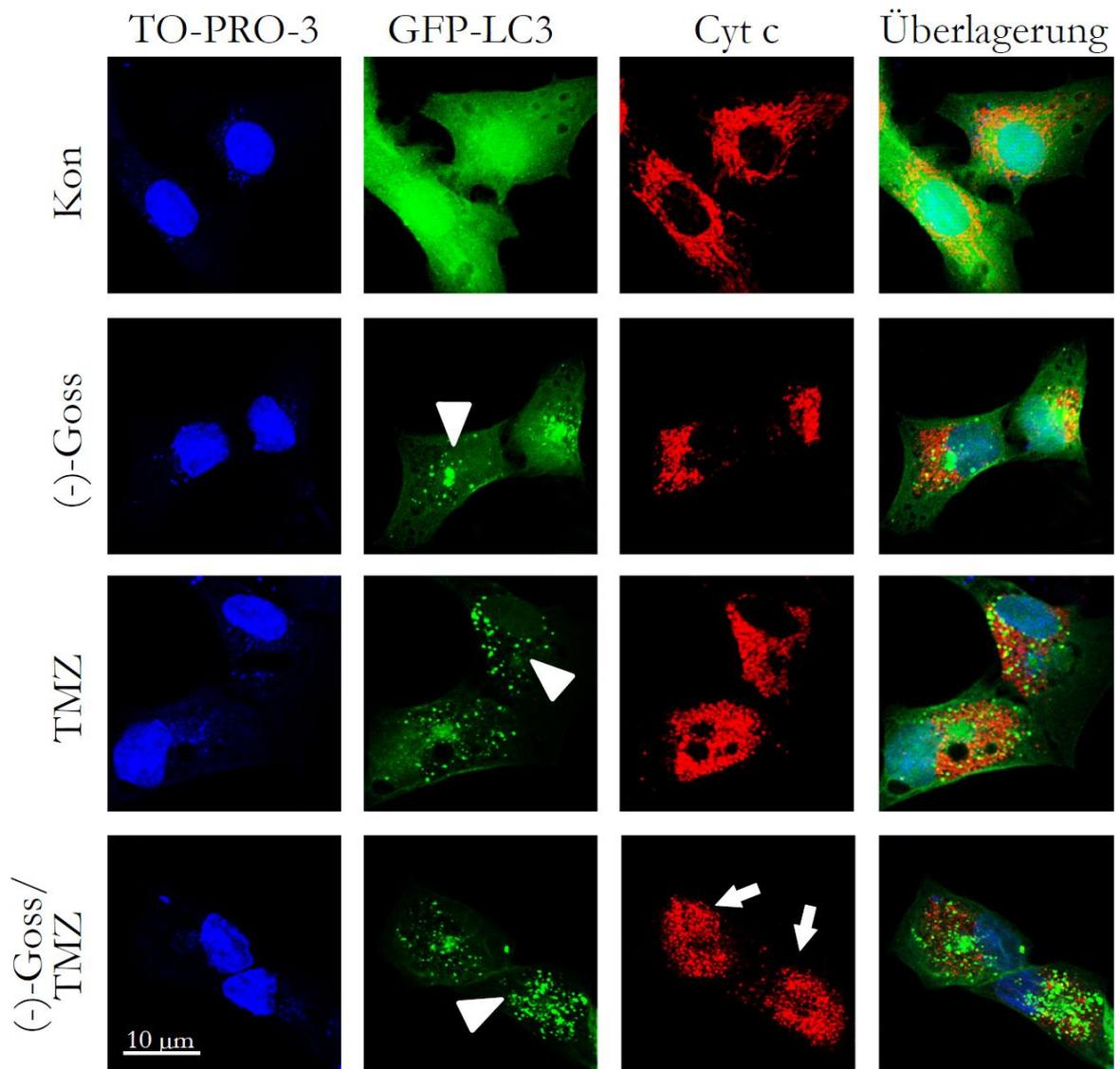
### 5.12 MITOCHONDRIALE DYSFUNKTION NACH KOMBINATIONSBEHANDLUNG MIT GOSSYPOL UND TMZ

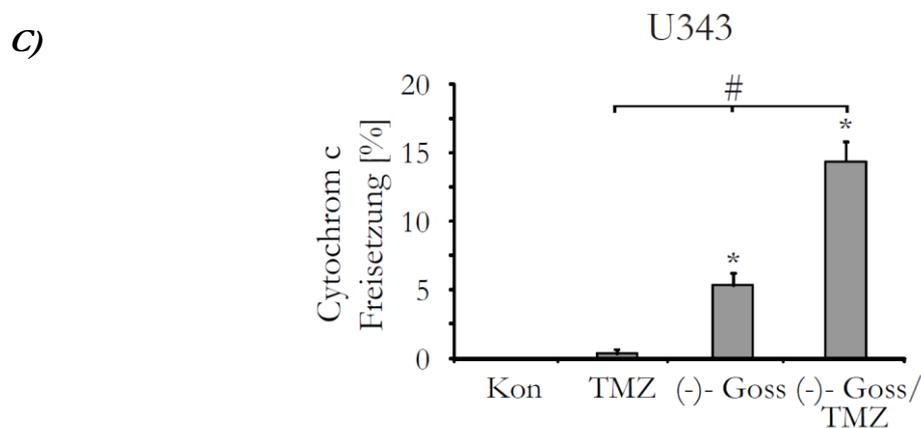
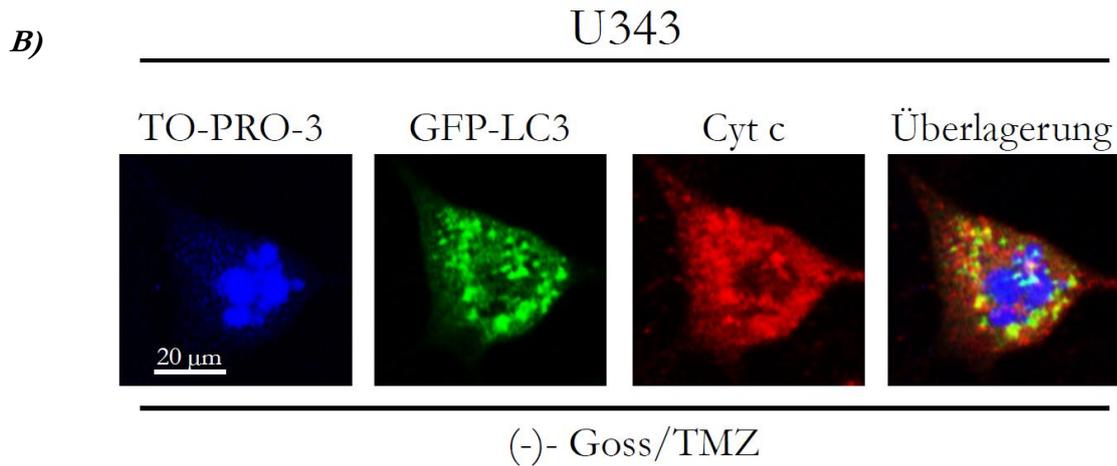
Wie zuvor in 5.8 beschrieben, konnte nachgewiesen werden, dass nach (-)-Gossypol-Behandlung der autophagische Zelltod induziert wurde. Für die nähere Charakterisierung und der zusätzlichen Ausschliessung eines nicht-autophagischen Zelltods, wurden die mit GFP-LC3 stabil transfizierten Gliomzellen den (-)-Gossypol und TMZ-Behandlungen allein und auch in Kombination unterzogen. Unter anderem wurden die Zellen zusätzlich auf die Induktion einer mitochondrialen Dysfunktion hin untersucht. Da mit der Gossypol-Behandlung eine minimale Bax-Aktivierung einhergeht, liegt nahe, dass damit auch eine Cytochrom c Freisetzung folgt. Für die Untersuchung des autophagischen Prozesses, wurden Zellen der Zelllinie U343 stabil transfiziert, mit GFP-LC3, mit 5  $\mu\text{M}$  (-)-Gossypol allein oder in Kombination mit 100  $\mu\text{M}$  TMZ für 96h behandelt. Für die Untersuchung auf Einzelzellebene wurden die U343 Zellen am Vortag auf Glasplättchen ausgebracht, mit (-)-Gossypol allein oder in Kombination mit TMZ behandelt und fixiert. Für die Untersuchung des intrinsischen mitochondrialen Signalwegs wurden die Zellen zusätzlich mit einem Antikörper, gerichtet auf Cytochrom c, versehen und mit dem Sekundärantikörper Cy3 sichtbar gemacht. Im Anschluss wurde der Kern mit TO-PRO 3 gefärbt. Mittels konfokaler Mikroskopie wurde sowohl die Verteilung der Autophagosomen, als auch die Cytochrom c Freisetzung erfasst. Für die Quantifizierung der Cytochrom c Freisetzung wurden repräsentative Bereiche ausgewählt.

Die *Abbildung 28 A)* zeigt in der Gliomzelllinie U343 unter Kontrollbedingungen ein klares zytoplasmatisches Signal, welches auf die inaktive Form von LC3 schließen lässt. Zudem wurde eine klare mitochondriale Lokalisation von Cytochrom c in den Mitochondrien beobachtet. Zellstress, der sowohl durch (-)-Gossypol, als auch durch TMZ ausgelöst wurde, zeigte sich durch eine vermehrte Autophagosomenbildung, die zusätzlich mit einer Fragmentierung der Mitochondrien einhergeht. Die Kombinationsbehandlung mit (-)-Gossypol und TMZ zeigte sowohl eine Steigerung der Autophagosomen-Bildung, als auch eine verstärkte Fragmentierung bzw. Kondensierung der Mitochondrien, welche in einigen Fällen zur Cytochrom c Freisetzung führte. Die quantitative Auswertung der Cytochrom c Freisetzung in der Gliomzelllinie U343 erfasst als Prozentanteil der Gesamtpopulation, zeigte deutlich eine Potenzierung von 1% (TMZ) über 5% ((-)-Gossypol) bis hin zu 15% in der Kombinationsbehandlung von Gossypol und TMZ. Diese Resultate zeigen zum einen eine Aktivierung des autophagischen Prozesses, zum anderen eine Cytochrom c Freisetzung, die weitestgehend nur durch die Kombinationsbehandlung induziert werden konnte. Offenbar scheint die Cytochrom c Freisetzung ein sehr spätes Ereignis zu sein, da zu diesem Zeitpunkt mehr als 70% der Zellen den Caspase-unabhängigen autophagischen Zelltod eingeleitet haben.

A)

U343





*Abbildung 28:* Die Behandlung sowohl mit Gossypol allein als auch die Kombinationsbehandlung mit TMZ potenziert den autophagischen Zelltod, welcher nach 96 h durch eine Cytochrom c Freisetzung charakterisiert ist. Für die Analyse auf Einzelzellebene wurden stabil mit GFP-LC3 transfizierte U343 Gliomzellen am Vortag der Behandlung mit 5 µM (-)-Gossypol allein oder in Kombination mit 100 µM TMZ, auf Glasplättchen ausgebracht, für 96 h behandelt, fixiert, mit einem Antikörper gerichtet auf Cytochrom c versehen und mit dem Sekundäntikörper Cy3 sichtbar gemacht. Im Anschluss wurde der Zellkern mit TO-PRO 3 [1 µM] angefärbt. Sowohl die Ausbreitung der Autophagosomen, als auch die Cytochrom c Freisetzung wurde mittels konfokalen Mikroskops auf Einzelzellebene ausgewertet und zusammengestellt. Pfeilköpfe zeigen die Ausbreitung der Autophagosomen. Pfeile zeigen die stark kondensierten und fragmentierten Mitochondrien. Maßstab 10 µm (A) bzw. 20 µm (B). C) Für eine quantitative Analyse, die den Prozentanteil der Gesamtpopulation an frei gesetztem Cytochrom c darstellt, wurden Zellen der Gliomzelllinie U343, wie in A beschrieben mit (-)-Gossypol allein oder in Kombination mit TMZ behandelt. Die Daten entsprechen Mittelwerten ± SEM von n = 3 unabhängigen Kulturen in denen 100 Zellen pro Experiment gezählt wurden. \*, p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Zur Untersuchung der mitochondrialen Dysfunktion, die mit einer Cytochrom c Freisetzung und einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials korreliert, wurden Membranpotentialmessungen durchgeführt. Untersuchungen dieser Art sollten eine Korrelation zwischen der Induktion des autophagischen Zelltods, sowie der durch die Kombinationsbehandlung ausgelöste mitochondrialen Dysfunktion untersuchen. Für die Ermittlung möglicher einhergehenden Änderungen des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) wurde die MGMT-positive Zelllinie U87 und die MGMT-negative Zelllinie U343 mit 5  $\mu\text{M}$  (-)-Gossypol allein oder in Kombination mit 100  $\mu\text{M}$  TMZ für 96 h behandelt. Als Positivkontrolle, die eine definitive Abnahme des mitochondrialen Potentials herbeiführt, wurden beide Zelllinien jeweils für 6 h mit 3  $\mu\text{M}$  STS behandelt. Für die anschließende Untersuchung mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen, wie in 4.18.3 beschrieben, vorbereitet und für die Messung des mitochondrialen Membranpotentials die Zellen zusätzlich mit dem Farbstoff TMRM [25 nM] angefärbt. Der Farbstoff TMRM wird nur in vitalen Zellen aufgenommen, da er über seine positive Ladung in den negativ geladenen Mitochondrien akkumuliert. Kommt es jedoch zu einer Depolarisation der Mitochondrienmembran, geht diese Akkumulation in den Mitochondrien verloren. Die *Abbildung 29* zeigt den Vergleich beider Zelllinien in einem Diagramm. Die Änderungen des mitochondrialen Membranpotentials wurden auf die Kontrolle normiert, das heißt die Kontrolle zeigt 100%. Die Einzelbehandlung mit (-)-Gossypol bzw. TMZ zeigt in beiden Zelllinien einen Verlust der Integrität der Mitochondrienmembran. Die Kombinationsbehandlung bildet in beiden Zelllinien einen noch drastischeren Effekt ab. Die U343 Gliomzelllinie zeigte bereits bei der Monobehandlung mit (-)-Gossypol, aber auch nach Kombinationsbehandlung, ein Absinken des Membranpotentials auf  $\sim 5\%$ . Im Vergleich zeigten die MGMT-positiven U87 Gliomzellen einen Membranpotential-Verlust von 40%. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eine einhergehende mitochondriale Dysfunktion nach Behandlung in beiden Zelllinien (U343 und U87). Zudem zeigte wie erwartet die Kombinationsbehandlung einen additiven Effekt, der aber wiederum von dem MGMT-Status der Zelle abhängig ist.

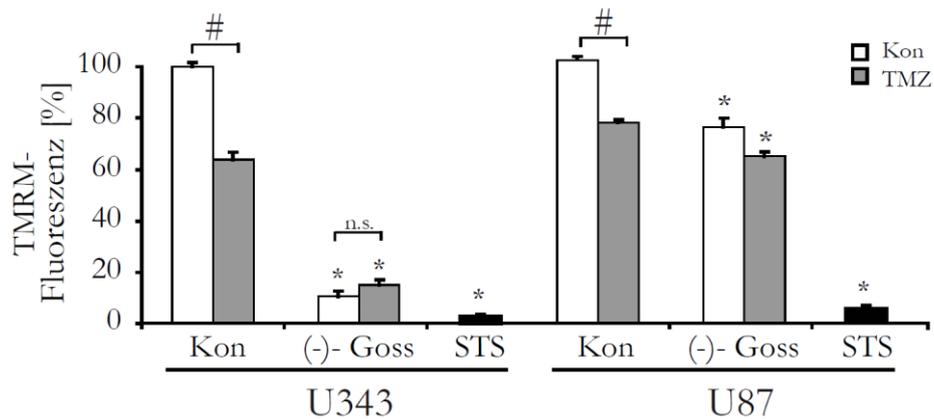
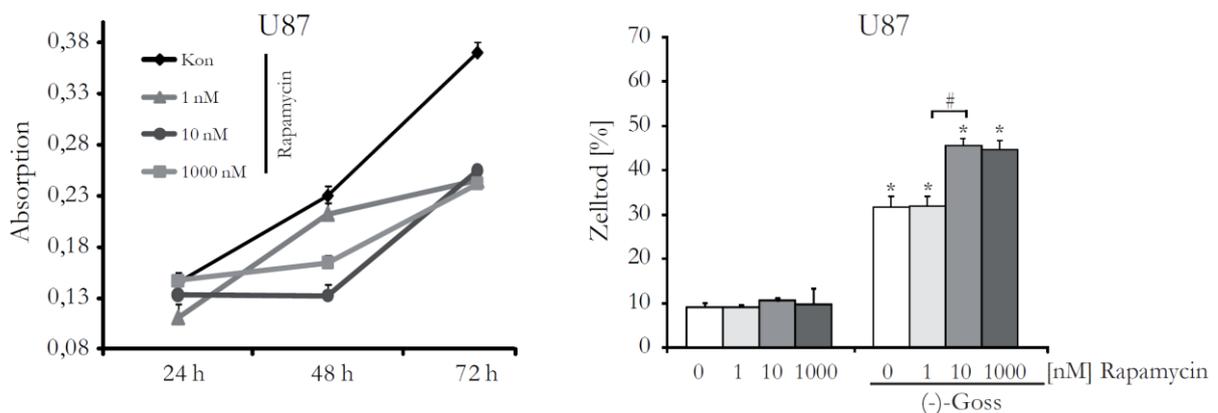


Abbildung 29: Abnahme des Membranpotentials nach Behandlung mit Gossypol und TMZ. Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) wurde mittels Durchflusszytometrie nach Färbung des mitochondrialen akkumulierenden Farbstoffs TMRM [25 nM] durchgeführt. Die MGMT-positive Zelllinie U87 und die MGMT-negative Zelllinie U343 wurden mit 5  $\mu$ M (-)-Gossypol allein oder in Kombination mit 100  $\mu$ M TMZ für 96 h behandelt. Als Positivkontrolle, die eine definitive Abnahme des mitochondrialen Potentials herbeiführt, wurden beide Zelllinien jeweils für 6 h mit 3  $\mu$ M STS behandelt. 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 Kontrolle mit angegebener Behandlung; n.s. = nicht signifikant.

### 5.13 THERAPEUTISCHE EFFEKTE VON mTOR-INHIBITOREN

Für die Angiogenese, die Proliferation und das Wachstum der Zelle, spielt die PI3K/Akt-Signalkaskade eine zentrale Rolle (Fingar und Blenis, 2004). Sowohl über die Phosphorylierung und Translation bestimmter Proteine, als auch die Inhibition der Ser/Thr-Kinase mTOR kann der autophagische Zelltod über die PI3K/Akt-Signalkaskade eingeleitet werden. Die Ser/Thr-Kinase mTOR nimmt dabei eine wichtige Rolle ein und erscheint als ein besonders geeignetes Ziel, in Tumoren die Resistenz gegenüber Apoptose zu überwinden und dadurch für eine Therapie-Sensibilisierung zu sorgen (Takeuchi et al., 2005). Zum einen konnte nach Behandlung mit dem spezifischen mTOR-Inhibitor Rapamycin, ein anti-tumoraler Effekt nachgewiesen werden (Eshleman et al., 2002; Takeuchi et al., 2005). Über die Behandlung mit dem spezifischen Inhibitor Rapamycin konnte sogar die Apoptose-Resistenz in Gliomzellen überwunden werden, da sie über die Inhibition von mTOR einen autophagischen Zelltod einleitete (He und Klionsky, 2009). Zurzeit wird in klinischen Studien bei fortgeschrittenen Tumorleiden die Behandlung mit Rapamycin als Monotherapie aber auch als Kombinationstherapie mit konventionellen klinischen Therapien hin untersucht (Cloughesy et al., 2008). Bezüglich dieser Erkenntnisse wurde die Theorie aufgestellt, durch eine mTOR Inhibition die Gliomzelle zu sensibilisieren, dadurch den autophagischen Prozess einzuleiten und mit zusätzlicher Gossypol-Behandlung allein oder in Kombination mit TMZ den Zelltod in Gliomzellen zu potenzieren.

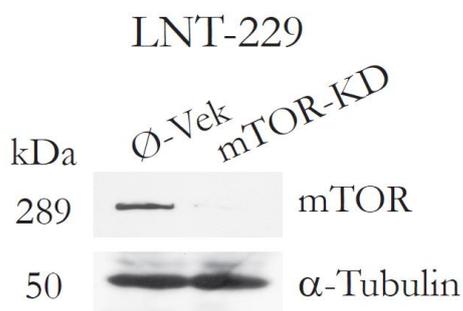
Für die Behandlung mit Rapamycin wurden zunächst Dosis- und Zeitverlaufsexperimente durchgeführt. Anhand eines Zellviabilitätstests der über einen Zeitverlauf von 24, 48 und 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Rapamycin (1, 10, 1000 nM) durchgeführt wurde, konnte keine dosisabhängige, dennoch eine moderate Zeit-abhängige Wirkung von Rapamycin in der Gliomzelllinie U87 gezeigt werden. Anscheinend hat die alleinige Inhibition des Komplexes TORC1 keinen zytotoxischen Effekt auf die Gliomzelle. Folglich wurde die Kombinationsbehandlung von Rapamycin mit dem Pan-Bcl-2-Inhibitor Gossypol fortgesetzt, um durch die zusätzliche Inhibition der anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder einen größeren Effekte auf Zelltodebene zu erzielen. Die U87 Gliomzelllinie wurden für 96 h mit den oben angegebenen Konzentrationen an Rapamycin allein oder in Kombination mit 5  $\mu$ M (-)-Gossypol behandelt. Die Quantifizierung des Zelltods wurde mittels Annexin V/PI Doppelfärbung durchflusszytometrisch durchgeführt. Resultate zeigten nach der Monobehandlung mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin ebenso keine zytotoxischen Effekte. Dahingegen konnte durch die Kombinationsbehandlung mit (-)-Gossypol ein synergistischer Effekt erzielt werden. Der Zelltod wurde durch die Kombinationsbehandlung von 5  $\mu$ M (-)-Gossypol und Rapamycin [1000 nM] von 10% bis zu 42% signifikant gesteigert werden. Bezugnehmend auf die Kombinationsbehandlung von (-)-Gossypol mit TMZ in vorangegangenen Experimenten ist die Wirkungsausmaß von Rapamycin jedoch nur moderat.



*Abbildung 30:* Die Inhibition von mTOR mittels Rapamycin in Kombinationsbehandlung mit (-)-Gossypol steigert den autophagischen Zelltod in Gliomzelllinien nur moderat. *A)* Die Gliomzelllinie U87 wurde auf ihr Proliferationsverhalten nach Behandlung mit 1, 10, 1000 nM Rapamycin über einen Zeitverlauf von 24, 48 und 72 h mittels Zellviabilitätstests hin untersucht. Die Daten entsprechen Mittelwerten  $\pm$  SEM von  $n = 16$  unabhängigen Kulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten erzielt. \*,  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. #,  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle mit angegebener Behandlung. *B)* Die quantitative Auswertung des Zelltods wurde mittels Durchflusszytomtrie nach Annexin V/PI-Doppelfärbung durchgeführt. Die Zellen der Zelllinie U87 wurden mit Rapamycin (1, 10, 1000 nM) allein oder in Kombination mit 5  $\mu$ M (-)-Gossypol für 96 h behandelt. 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.

### 5.14 RNA-INTERFERENZ GEGEN mTOR

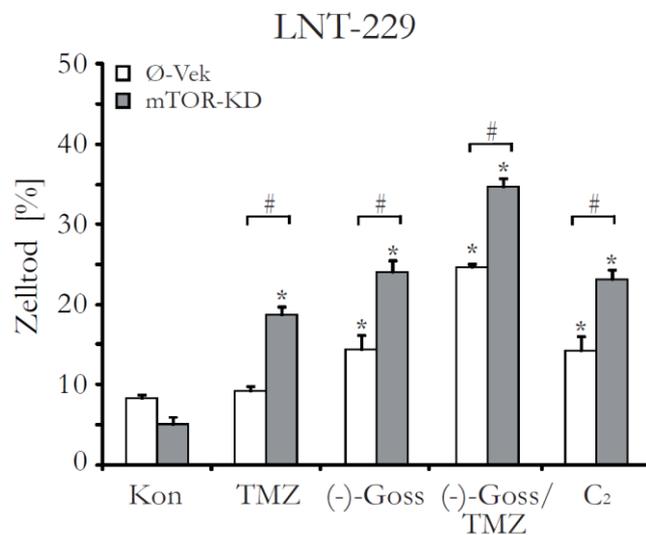
Die Ser/Thr Kinase mTOR kann, wie schon in 1.7 beschrieben, zwei Komplexe bilden. Zum Einen bildet es den mTOR/Raptor-Komplex (TORC1) und zum Anderen den mTOR/Rictor-Komplex (TORC2). Da der Inhibitor Rapamycin nur gegen den TORC1-Komplex gerichtet ist, scheinen die moderaten Effekte daher herzurühren, da der TORC2-Komplex immer noch aktiv vorliegt und der Inhibition des TORC1-Komplexes offenbar entgegen wirkt. Hinsichtlich dieser Problematik wurde sich für eine stabile Repression von mTOR in der Gliomzelllinie LNT-229 entschieden. Die stabile Repression von mTOR wurde mittels Immunoblot gerichtet mit einem Antikörper gegen die Ser/Thr-Kinase mTOR nachgewiesen.



*Abbildung 31:* Darstellung des stabilen Knockdowns der Ser/Thr-Kinase mTOR. LNT-229 Gliomzellen (Ronellenfitsch et al., 2009) wurden sowohl mit einem pLKO-Kontrollvektor (Ø-Vek) als auch mit einem Repressions-Plasmid, gerichtet auf mTOR transduziert. Für die Etablierung wurden Gesamtzellextrakte der Kulturen hergestellt und die Repression von mTOR auf Proteinebene ermittelt. α-Tubulin diente dabei als Ladekontrolle.

Da die Blockade beider mTOR-Komplexe TORC1 und TORC2 durch die pharmakologische Inhibition mit Rapamycin nicht erreicht wurde, wurde mit der Gliomzelllinie LNT-229, die den stabilen Knockdown von mTOR trägt, weitergearbeitet. Der Einfluss der stabilen Repression von mTOR sollte auf mögliche zytotoxische Effekte hin untersucht werden. Zusätzlich sollte der Einfluss der Behandlung sowohl mit dem Pan-Bcl-2-Inhibitor (-)-Gossypol allein, als auch mit der Kombinationsbehandlung mit TMZ in den mTOR-Knockdown-Zellen analysiert werden. Für diese Untersuchungen wurden LNT-229 Gliomzellen (Ø-Vek, mTOR-KD) mit 5 µM (-)-Gossypol allein, sowie in Kombination mit 100 µM TMZ für 96 h behandelt. Als Positivkontrolle zur Induktion eines autophagischen Zelltods wurden zusätzlich LNT-229 Zellen mit 25 µM C<sub>2</sub>-Ceramid für 24 h behandelt (Hetschko et al., 2008). Der Anteil an toten Zellen wurde durch Doppelfärbung mit Annexin V und PI mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Resultate der Zelltodbestimmung zeigten in den mTOR-Knockdown-Zellen einen starken zytotoxischen Effekt nach allen angegebenen Behandlungen. Die Kombinationsbehandlung mit (-)-Gossypol und TMZ zeigte in den Kontrollzellen (Ø-Vek) ein Ausmaß an Zelltod von 25%. Im Vergleich dazu zeigten die mTOR-Knockdown-Zellen nach dieser Kombinationsbehandlung einen Zelltod von 37%. Offenbar ist die Inhibition beider Komplexe TORC1 und TORC2 notwendig, um den Zelltod in Gliomzellen zu potenzieren. Zusätzlich wurde sowohl dieses Experiment, auch als ein Kontrollexperiment durchgeführt. Da der induzierte Zelltod durch (-)-Gossypol allein oder in Kombination mit TMZ den autophagischen

Zelltod einleitet, scheint offenbar der PI3K/Akt-Signalweg involviert zu sein, zumal über die zusätzliche Inhibition von mTOR der Zelltod in Gliomzellen gesteigert werden konnte.



*Abbildung 32:* Die Inhibition von mTOR trägt zur Sensitivierung in Gliomzellen bei. LNT-229 Gliomzellen sowohl mit dem Kontrollvektor (Ø-Vek) behandelt, als auch mit dem mTOR-Knockdown wurden mit 5 µM (-)-Gossypol allein, sowie in Kombination mit 100 µM TMZ für 96 h behandelt. Als Positivkontrolle zur Induktion eines autophagischen Zelltods wurden zusätzlich LNT-229 Zellen mit 25 µM C<sub>2</sub>-Ceramid für 24 h behandelt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Zelltod nach Doppelfärbung mit Annexin V/PI gemessen. Die Daten entsprechen Mittelwerten ± SEM von n = 4 unabhängigen Kulturen \*, p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. #, p < 0,05 im Vergleich zur angegebenen Behandlung.

Der Zelltodmechanismus der Autophagie wird über eine Anreicherung an Autophagosomen, die alle abzubauenen Zellbestandteile mit ihrer Membran umschließen, charakterisiert. Autophagosomen fusionieren am Ende der Kaskade mit den stark aziden Lysosomen. Nach der Fusion werden die Zellkomponenten in ihre monomeren Strukturen zerlegt. Eine verstärkte Anreicherung von Autophagosomen und aziden Vesikeln korreliert ebenfalls mit einer verstärkten Induktion des autophagischen Prozesses. Es kam als nächstes die Frage auf, ob der zytotoxische Effekt von (-)-Gossypol und TMZ in den mTOR-Knockdown LNT-229 Gliomzellen, tatsächlich mit einer Anreicherung an aziden Lysosomen assoziiert ist. Für diese Analyse wurden LNT-229 Kontrollzellen (Ø-Vek), sowie mTOR-Knockdown-Zellen mit 5 µM (-)-Gossypol allein, sowie in Kombination mit 100 µM TMZ für 96 h behandelt. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen wie in 4.18.4 beschrieben für die Durchflusszytometrie vorbereitet und mit dem Farbstoff LysoTracker Red angefärbt. Durch die Akkumulation des Farbstoffs in den aziden Vesikeln lässt sich mittels Durchflusszytometrie das Ausmaß an Lysosomen-Aktivierung in der Zelle detektieren, wobei die Induktion der lysosomalen Aktivität durch den Anstieg der Fluoreszenzintensität des Farbstoffs gewertet wird. Durchflusszytometrisch erstellte LysoTracker-Histogramme veranschaulichen die Anreicherung an aziden Vesikeln sowohl nach den Einzelbehandlungen mit (-)-Gossypol und TMZ, als auch der Kombinationsbehandlung in den

Kontrollzellen. Der Knockdown von mTOR verstärkt diese Anreicherung noch weiter. Zusammenfassend korreliert die zytotoxische Wirkung von Gossypol und TMZ mit einer verstärkten Induktion der lysosomalen Prozesses, die über eine Inhibition von mTOR gesteigert werden kann. Zum einen, deutet dieser Befund darauf hin, dass die Behandlung mit Gossypol und TMZ eine zelltodfördernde Wirkung auf Gliomzellen hat und zum anderen ist ein intakter autophagischer Flux zu beobachten, der mit einer Autophagosomen- und Lysosomenbildung assoziiert ist.

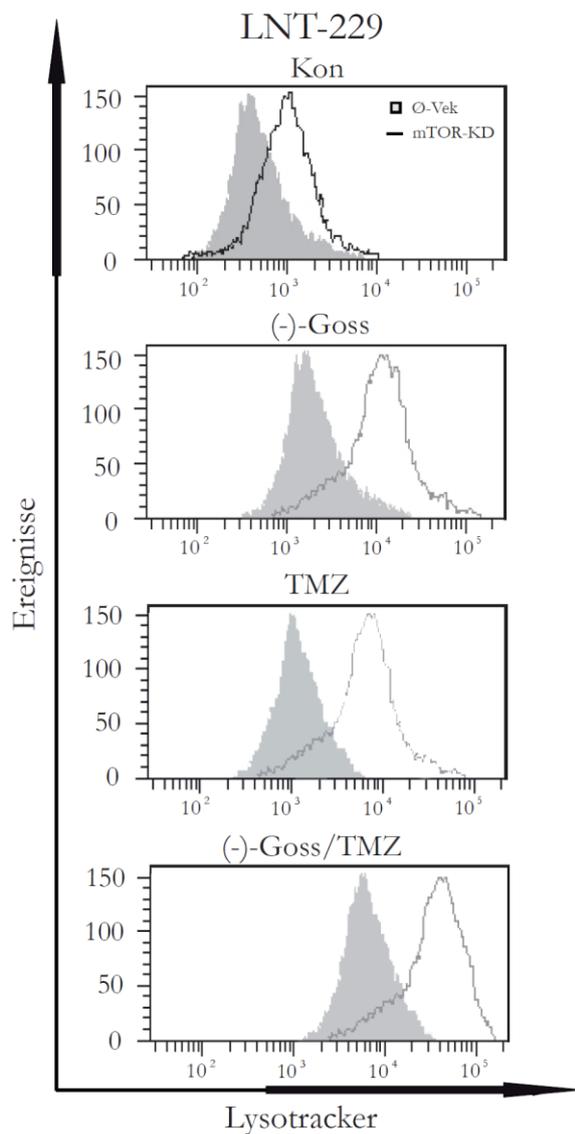


Abbildung 33: mTOR Inhibition steigert die lysosomale Aktivität in Gliomzellen. Über die Akkumulation des Farbstoffs LysoTracker-Red in die aziden Vesikel lässt sich mittels Durchflusszytometrie das Ausmaß an Lysosomen-Aktivierung in der Zelle detektieren. Für diese Analyse wurden sowohl LNT-229 Kontrollzellen ( $\emptyset$ -Vek), als auch LNT-229 mTOR-Knockdown-Zellen mit  $5 \mu\text{M}$  (-)-Gossypol allein, sowie in Kombination mit  $100 \mu\text{M}$  TMZ für 96 h behandelt. Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit LysoTracker-Red-DND-99 [ $25 \text{ nM}$ ] angefärbt. Repräsentative Histogramme wurden für diese Analyse ausgewählt. Ähnliche Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten rekonstruiert.

5.15 AUSWIRKUNGEN DER mTOR INHIBITION AUF DIE MITOCHONDRIALE FUNKTION

Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation apoptotischer und nicht apoptotischen Prozessen. Auftretende Phänomene verschiedener Zelltodmechanismen unterliegen dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ). Zelltodfördernde Mechanismen, die durch die Behandlungen mit Gossypol und TMZ in LNT-229 Gliomzellen induziert wurden, sollen unter anderem auch auf mitochondrialer Ebene untersucht werden. Für die Analyse werden sowohl LNT-229 Kontrollzellen, als auch mTOR-Knockdown-Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  (-)-Gossypol allein, sowie in Kombination mit 100  $\mu\text{M}$  TMZ für 96 h behandelt. Als Positivkontrolle, die den unwiderruflichen Abfall des Membranpotentials durch eingeleitete Apoptose herbei führen sollte, wurden die Zellen für 6 h mit 3  $\mu\text{M}$  STS behandelt. Für die Messung des Membranpotentials werden die Zellen für die Durchflusszytometrie vorbereitet und mit dem Mitochondrien-akkumulierenden Farbstoff TMRM [25 nM] angefärbt. Befunde der Messung zeigten, dass die LNT-229 mTOR-Knockdown-Zellen wesentlich sensitiver reagierten, und bereits nach der Monobehandlung mit (-)-Gossypol und der Kombinationsbehandlung mit TMZ das mitochondriale Membranpotential um 90% sank. Zudem konnte in den LNT-229 Kontrollzellen ebenfalls ein Absinken des Membranpotentials beobachtet werden. Die Monobehandlung mit (-)-Gossypol zeigte in den Kontrollzellen ein Membranpotential von 45%. Im Vergleich dazu, ließ die Kombinationsbehandlung das Potential auf 25% absinken.

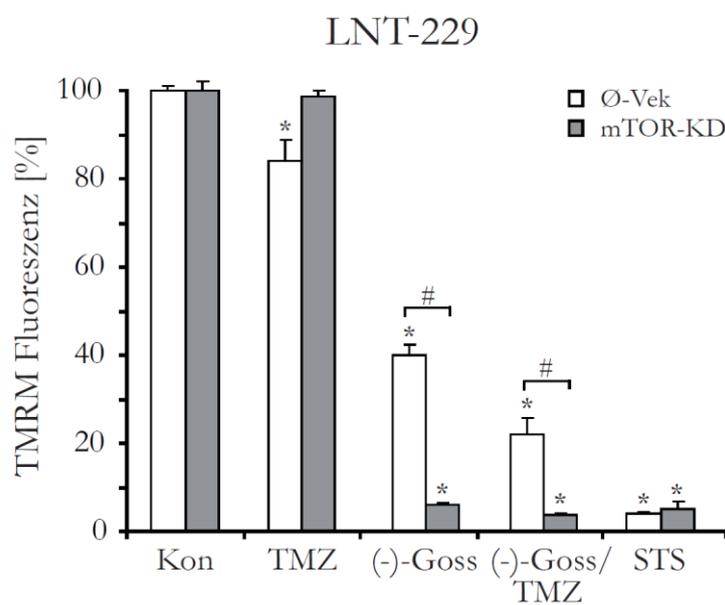


Abbildung 34: Mit der Inhibition von mTOR geht eine mitochondriale Dysfunktion einher. Das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) wurde mittels Durchflusszytomtrie nach Färbung mit dem Farbstoff TMRM [25 nM] gemessen. Sowohl LNT-229 Kontrollzellen ( $\emptyset$ -Vek), als auch mTOR-Knockdown-Zellen wurden mit 5  $\mu\text{M}$  (-)-Gossypol allein sowie in Kombination mit 100  $\mu\text{M}$  TMZ für 96 h behandelt. Als Positivkontrolle wurden die beiden Kulturen der LNT-229 Gliomzelllinie mit 3  $\mu\text{M}$  STS für 6 h behandelt. Die Daten entsprechen Mittelwerten  $\pm$  SEM von n = 4 unabhängigen Kulturen \*, p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. #, p < 0,05 im Vergleich angegebener Behandlung. Die spezifische Wirkung von (-)-Gossypol auf Gliomzellen und die Einleitung des autophagischen

Prozesses sollte durch ein zusätzliches Kontrollexperiment unterstrichen werden. Das Pflanzen-Alkaloid Vincristin bindet an mikrotubuläre Proteine, wodurch eine Depolymerisation herbeigeführt wird. Diese Depolymerisierung verhindert die Spindelformation und arretiert die Mitose in der Metaphase. Daher wirkt dieses Alkyant als Mitosehemmer und leitet speziell in Gliomzellen Apoptose ein (Glaser und Weller, 2001, Ronellenfitsch et al., 2009).

Es wurde ein weiteres Kontrollexperiment geplant, um sowohl die Spezifität von (-)-Gossypol hinsichtlich der Einleitung des autophagischen Prozesses, als auch die darin verwickelte Rolle der Ser/Thr-Kinase mTOR genauer zu untersuchen. Für diese Fragestellung wurden LNT-229 Kontrollzellen, sowie LNT-229 mTOR-Knockdown-Zellen mit der Apoptose-induzierenden Substanz Vincristin behandelt. Die Zellen wurden mit 100, 150 und 300 nM Vincristin für 72 h behandelt. Nach Ablauf der Inkubation wurde das Ausmaß an Zelltod nach Doppelfärbung mit Annexin V/PI mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Ergebnisse zeigten, dass die Kontrollzellen wesentlich sensitiver auf die Behandlung reagierten. Dahingegen zeigten interessanterweise die mTOR-Knockdown-Zellen eine starke Resistenz gegenüber der Vincristin-Behandlung. Die zuvor erbrachten Befunde zeigten, dass durch Blockade von mTOR der autophagische Zelltod nach Gossypol-Behandlung allein oder in Kombination mit TMZ eingeleitet wurde. Es findet offenbar nach Gossypol-Behandlung eine Beclin-1-Aktivierung statt, die spezifisch Gliomzellen über die autophagische Signalkaskade in den Zelltod treibt. Bezugnehmend auf diese Ergebnisse, hat die Kinase mTOR anscheinend eine duale Funktion inne, die zum einen protektiv, zum anderen auch zelltod-fördernd wirken kann (Castedo et al., 2002).

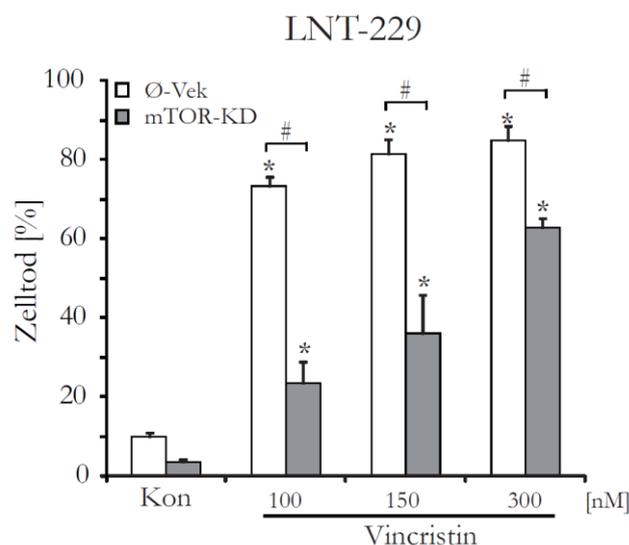
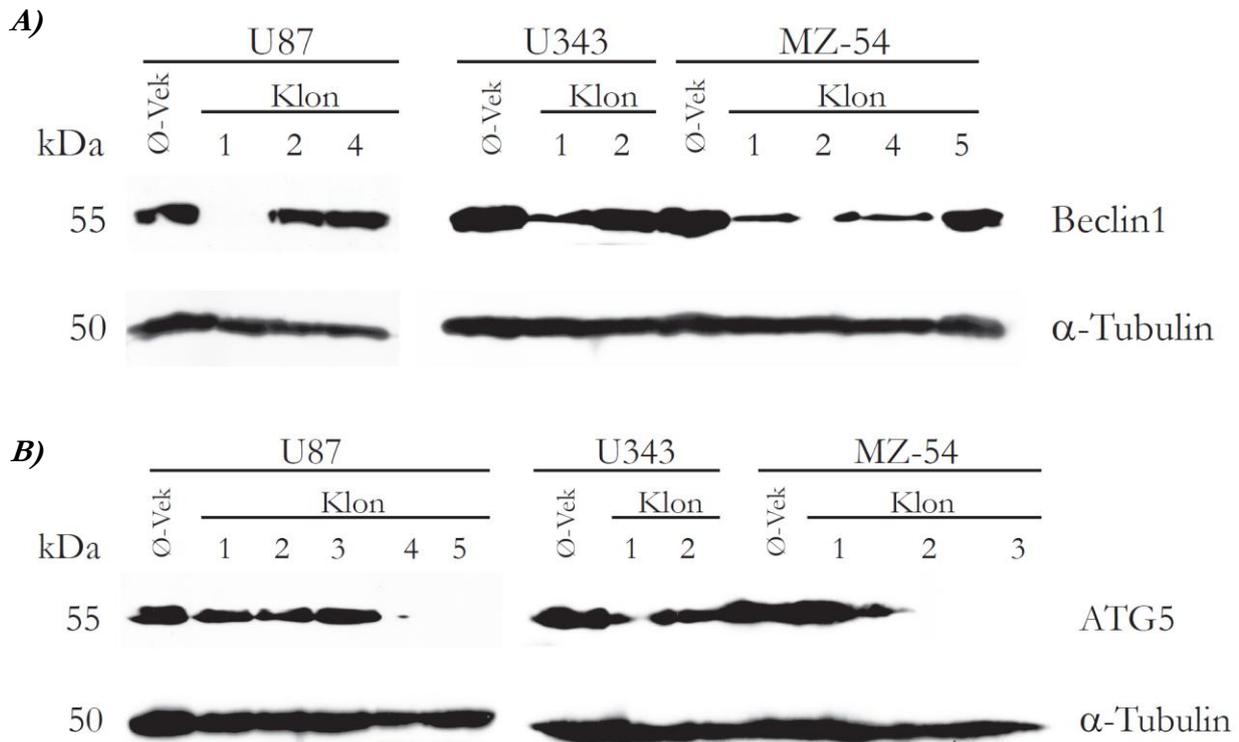


Abbildung 35: Der mTOR-Knockdown reduziert den Zelltod nach der Behandlung mit der Apoptose-induzierenden Substanz Vincristin. LNT-229 Kontrollzellen (Ø-Vek), sowie mTOR-Knockdown-Zellen wurden mit 100, 150 und 300 nM Vincristin für 72 h behandelt. Mittels Doppelfärbung (Annexin V/PI) und Durchflusszytometrie wurde der Anteil an toten Zellen gegenüber der Gesamtpopulation bestimmt. 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.

### 5.16 DIE INDUKTION DES AUTOPHAGISCHEN ZELLTODES DURCH GOSSYPOL KANN IN GLIOMZELLEN DURCH DEPLETION VON BECLIN1 UND ATG5 AUFEGHOBEN WERDEN

Die Ser/Thr-Kinase mTOR, welche in dem PI3K/AKT-Signalweg die tragende Rolle spielt, kann den autophagischen Prozess regulieren. Nach Inhibition von mTOR kann der autophagische Prozess eingeleitet werden. Unter physiologischen Bedingungen (Nährstoffmangel u.ä.) kommt es zu einer natürlichen Inhibition von mTOR und zur Induktion der Autophagie. Dieser Zustand führt zur Aktivierung weiterer Komplexe, dem Beclin/ATG6-Komplex, welcher nachgestellte ATG-Proteine aktiviert. Dies bedeutet, dass erst durch die Aktivierung von Beclin1 die Bildung des frühen Autophagosoms aktiviert wird, die folglich den Prozess der Elongation über die Komplexbildung von ATG5-ATG12 kontrolliert. Um die These zu erhärten, dass durch Gossypol-Behandlung spezifisch der autophagische Prozesse ausgelöst wird, wurde durch einen lentiviralen Knockdown die Expression von Beclin1 und ATG5 reprimiert, um die damit einhergehende Inhibition der Autophagie zu gewährleisten. Für die anstehenden Experimente wurde in den Gliomzellen U343, U87 und MZ-54 ein lentiviraler stabiler Knockdown von Beclin1 und ATG5 herbeigeführt und mittels Immunoplot der Knockdown in der jeweiligen Zelllinie analysiert. Etablierungsarbeiten zeigten, dass nur eine Zielsequenz in der jeweiligen Zelllinie einen Knockdown herbei führen konnte. Weitere Analysen wurden dementsprechend nur mit dem Klon, welcher den optimalen Knockdown trug, fortgeführt.

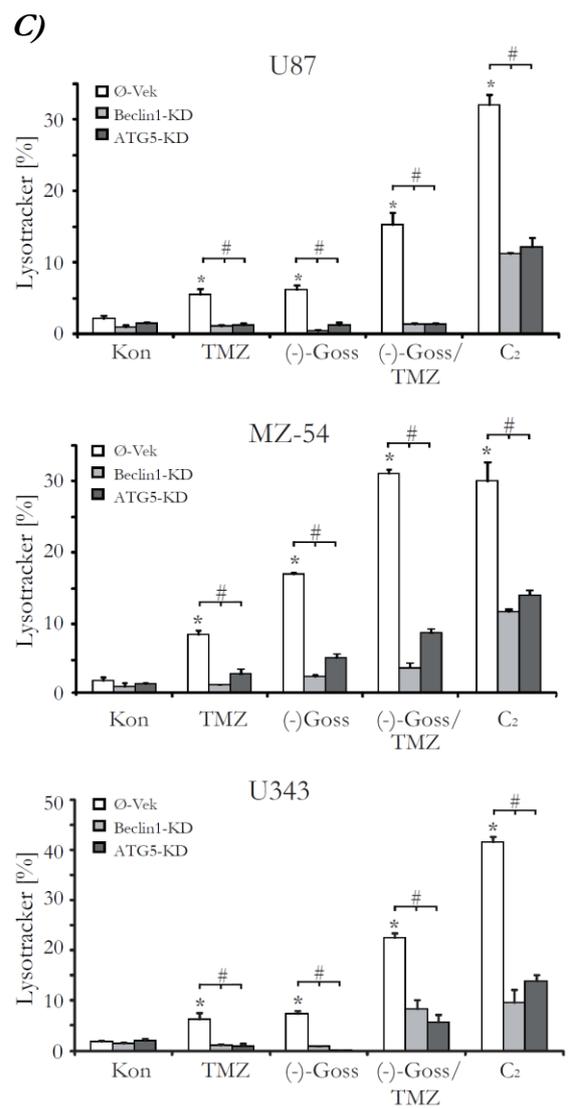
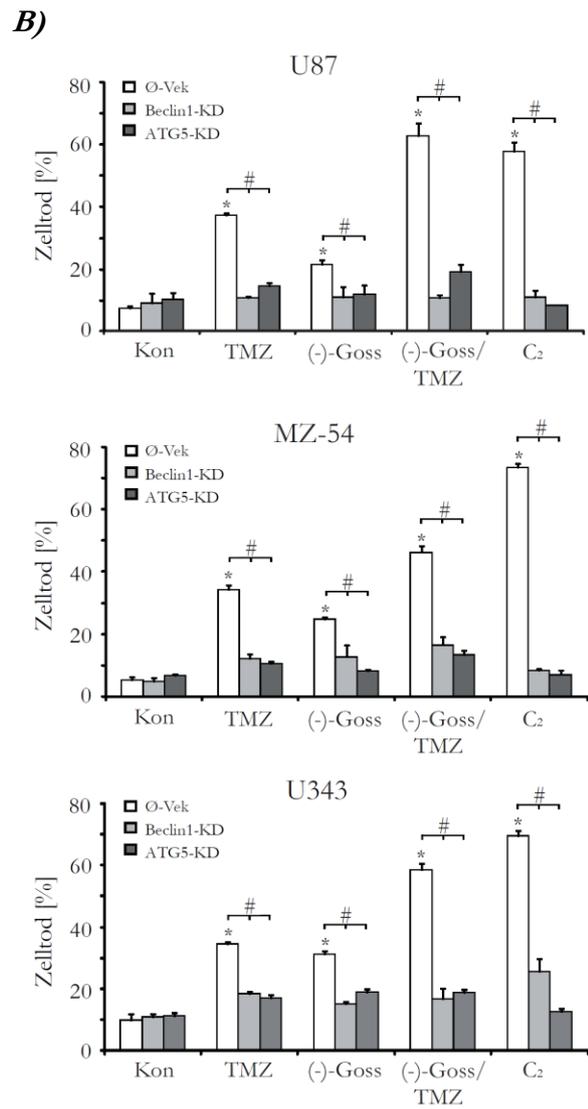
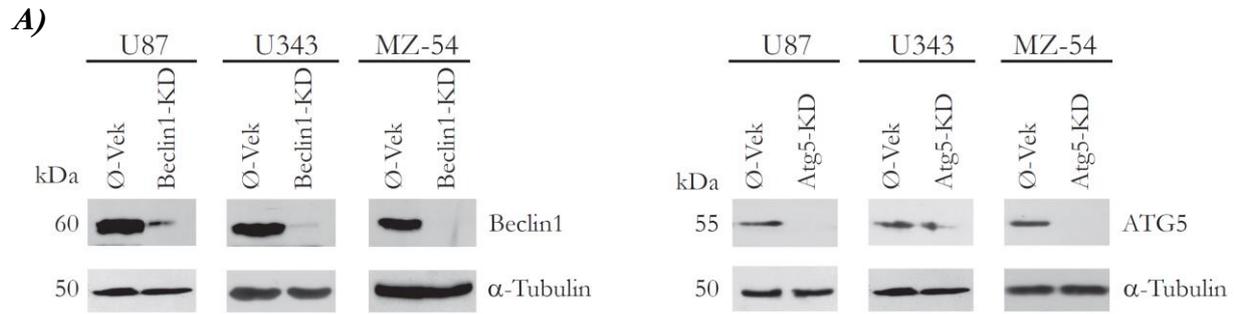


*Abbildung 36:* Für die Erzeugung dauerhaft verringerter Proteinexpressionen, wurden von der Firma SIGMA-Aldrich angebotene Mission® shRNA Transduktions-Partikel verwendet. Die Etablierung des stabilen lentiviralen Knockdowns von Beclin1 *A)* und ATG5 *B)* wurde in den Zelllinien U343, U87 und MZ-54 durchgeführt, wobei nur durch eine der fünf Zielsequenzen die Geninhibition in jeweiliger Zelllinie erreicht werden konnte. Gesamtzelllysate wurden von den Kulturen (Kontrollzellen Ø-Vek, sowie Knockdown von Beclin1 und ATG5) hergestellt und mittels Immunoblot, mit den Antikörpern gerichtet auf ATG5 und Beclin1, die Geninhibition dargestellt. α-Tubulin diente als Ladekontrolle.

Quantitative Zelltodanalysen, die mittels Durchflusszytometrie durchgeführt wurden, sollten die Annahme der durch die Geninhibition von ATG5 bzw. Beclin1 verursachten Blockade des autophagischen Prozesses, unterstützen. Sowohl Kontrollkulturen (Ø-Vek), als auch die Knockdown-Klone von ATG5 und Beclin1 wurden von den Gliomzelllinien U343, U87 und MZ54 mit 5 µM (-)-Gossypol allein, oder in Kombination mit 100 µM TMZ für 96 h behandelt. Als Autophagie-auslösende Substanz wurden zusätzlich alle oben genannten Zellen ebenfalls mit 25 µM C<sub>2</sub>-Ceramid für 24 h behandelt. Nach spezifischer Anfärbung mit Annexin V/PI konnten die bereits gezeigten Daten in den Kontrollzellen von U343 und U87 bestätigt werden (5.11). Die Zelltodanalysen zeigten in allen Gliomkontrollzellen ein erhöhtes Ausmaß an Autophagie. Im Vergleich zeigte der spezifische Knockdown von ATG5 und Beclin1 in den Gliomzellen U343, U87 und MZ-54 einen dramatischen Rückgang des Zelltods. Da dieser Rückgang des Zelltods in allen drei Gliomzelllinien zu beobachten war, scheint tatsächlich der durch Gossypol vermittelte Prozess Zelltod-fördernd zu sein, welcher von einer autophagischen Signalkaskade gekennzeichnet ist. Die Blockade des autophagischen Prozesses, vermittelt durch den stabilen Knockdown von ATG5 und Beclin1 korreliert ebenso mit einer Abnahme des lysosomalen Aktivität. Um dieser Feststellung nachzugehen, wurde die Ausbreitung an aziden Vesikeln, in allen drei Gliomzelllinien

(Ø-Vek, Beclin1- und ATG5-Knockdown) mittels LysoTracker-Färbung analysiert. Die Gliomzellen U343, U87 und MZ54 (Kontrollzellen, sowie Knockdown-Zellen: ATG5 und Beclin1) wurden wie oben beschrieben mit Gossypol, TMZ und C<sub>2</sub>-Ceramid behandelt. Für die Messung der lysosomalen Aktivität wurde der spezifisch akkumulierende Farbstoff LysoTracker Red DND 99 [25 nM], der durch seine Affinität zu sauren Kompartimenten charakterisiert ist, für die Durchflusszytometrie verwendet. Die Messung zeigte in den Kontrollzellen aller Gliomzelllinien eine starke Induktion der lysosomalen Aktivität. Dahingegen konnte durch den Knockdown von Beclin1 und ATG5, wie oben beschrieben, sowohl der Zelltod, als auch hier die Aktivität lysosomaler Prozesse drastisch auf ein Minimum von unter 10% in allen Zelllinien verringert werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der induzierte Zelltod nach Behandlung sowohl mit Gossypol allein, als auch in Kombination mit TMZ mit einem autophagischen Zelltod assoziiert ist. Darauf stützend weist der spezifische Knockdown der autophagischen Regulatoren, ATG5 und Beclin1, eine fast komplette Inhibition der Autophagie nach Gossypol und TMZ Behandlung auf. Die Aktivierung der lysosomalen Aktivität in den Kontrollzellen im Vergleich zu den Knockdown-Zellen verdeutlicht einen intakten autophagischen Flux, welcher mit einer Aktivierung sowohl autophagosomaler, als auch lysosomaler Strukturen korreliert.



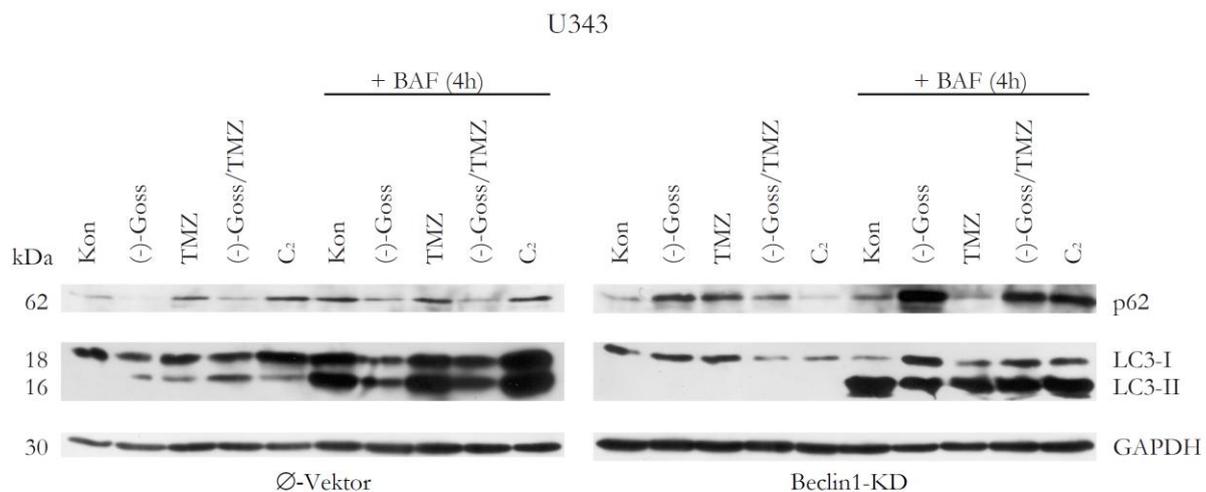
*Abbildung 37:* Die lentivirale Knockdown von Beclin1 und ATG5 führt zur Inhibition der Autophagie. Gliomzelllinien, wie U343, MZ-54 und U87, transduziert sowohl mit dem Kontrollvektor ( $\emptyset$ -Vek), als auch Klone den Knockdown von ATG5 bzw. Beclin1 tragend *A)* wurden mit 5  $\mu$ M (-)-Gossypol allein oder in Kombination mit 100  $\mu$ M TMZ für 96 h behandelt. Als Autophagie-auslösende Substanz wurden zusätzlich alle genannten Zellen mit 25  $\mu$ M C<sub>2</sub>-Ceramid für 24 h behandelt. *B)* Sowohl die quantitative Auswertung des Zelltods nach Annexin V/PI-Doppelfärbung als auch *C)* das Ausmaß an lysosomaler Aktivität wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Daten entsprechen Mittelwerten  $\pm$  SEM von n = 4 unabhängigen Kulturen \*, p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. #, p < 0,05 im Vergleich der Kontrollzellen zu den Knockdown-Zellen.

#### 5.17 DER GOSSYPOL-INDUZIERTER ZELLTOD IST DURCH EINEN INTAKTEN AUTOPHAGISCHEN FLUX GEKENNZEICHNET

Der Prozess der Autophagie kann in drei Abschnitte unterteilt werden: Initiation, Exekution und Maturation (Levine und Deretic, 2007). Wie schon in der Einleitung (1.4) beschrieben, wird das zyttoplasmatische LC3-I während der Konjugationsphase der Autophagie in die innere und äußere, in der sich bildende Isolationsmembran eingebaut. Anhand der Konversion des zyttoplasmatischen LC3-I Proteins in seine lipidierte, membrangebundene Form LC3-II kann das Ausmaß der Autophagie bestimmt werden, da mit der Anreicherung von LC3-II der Grad der Autophagosomenbildung korreliert (Kabeya et al., 2000). Da jedoch die LC3-II Form aufgrund seiner Lokalisation in dem Autophagosom nur für kurze Halbwertszeit darzustellen ist, eignet es sich, einen zweiten Marker, der die Autophagieaktivität einer Zelle nachweist, zusätzlich anzufügen. Für diese Untersuchung wurde das p62-Protein, welches als zusätzlicher selektiver Autophagiemarker fungiert, verwendet. Das Protein p62 bindet an das inaktive LC3-I. Nach Aktivierung des autophagischen Prozesses bindet das LC3-II in die Autophagosomenmembran, wodurch das p62-Protein in das Autophagosom gelangt und abgebaut wird.

Für die Sicherstellung eines intakten autophagischen Fluxes nach (-)-Gossypol-Behandlung sollte auf Proteinebene sowohl die Konversion von LC3-I zu LC3-II, als auch die Degradation von p62 untersucht werden. Zur Untersuchung der autophagischen Aktivität auf Proteinebene wurde die Gliomzelllinie U343 verwendet. Für die Analyse wurden die beiden Zellkulturen, Kontrollzellen ( $\emptyset$ -Vek) und Beclin1-Knockdown mit 5  $\mu$ M (-)-Gossypol allein, oder in Kombination mit 100  $\mu$ M TMZ für 96 h behandelt. Die Positivkontrolle wurde durch die Behandlung mit 25  $\mu$ M C<sub>2</sub>-Ceramid für 24 h dargestellt. Als zusätzliche Kontrolle, die den autophagischen Flux in der Zelle hemmt, wurde der spezifische Inhibitor Bafilomycin A1 verwendet. Er unterbindet die Fusion von Autophagosom mit dem Lysosom, wodurch die Signalkaskade der Degradation inhibiert wird. Die Behandlung mit Bafilomycin A1 [10 nM] wurde für 4 h durchgeführt. Die Veränderungen nach den Behandlungen auf Proteinebene für LC3-I und LC3-II bzw. p62 bestimmen zu können, wurde mittels Immunoblot, gerichtet mit den Antikörpern sowohl gegen beide Formen des LC3, als auch gegen p62, die Proteinmenge nachgewiesen.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle konnte nach den Einzelbehandlungen sowohl mit (-)-Gossypol und TMZ, als auch der Kombinationsbehandlung eine Konversion von LC3-I zu LC3-II beobachtet werden. Dies deutet auf einen intakten autophagischen Flux hin. Die stärkste Zunahme der LC3-II-Form konnte nach der Kombinationsbehandlung beobachtet werden. Die zusätzliche Behandlung mit dem Inhibitor Bafilomycin A1, der die Fusion von Autophagosom und Lysosom hemmt, äußerte sich durch eine drastische Anreicherung beider Formen des LC3-Proteins. Desweiteren wurde die Degradation von p62 auf Proteinebene analysiert. Es stellte sich heraus, dass nach der Kombinationsbehandlung von (-)-Gossypol und TMZ eine deutliche Degradierung durch die Aktivierung des autophagischen Prozesses stattgefunden hat. Die zusätzliche Behandlung mit dem Inhibitor Bafilomycin A1 blockierte den Abbau von p62. Zum Vergleich wurden neben den Kontrollzellen die Beclin1-Knockdown-Zellen mit den oben erwähnten Behandlungen auf Proteinebene hin untersucht. Es stellte sich wie erwartet heraus, dass die Konversion von LC3-I zu LC3-II komplett geblockt wurde, da durch das fehlende Beclin1-Protein die Autophagosomenbildung ausblieb. Durch Bafilomycin A1 wurde zwar eine Konversion von LC3-I zu LC3-II veranlasst, erscheint aber im Gegenzug zur Kontrolllinie wesentlich geringer. Das p62-Protein konnte sowohl durch die Nichtbildung des Autophagosoms, als auch durch die Behandlung mit Bafilomycin A1, nicht degradiert werden.

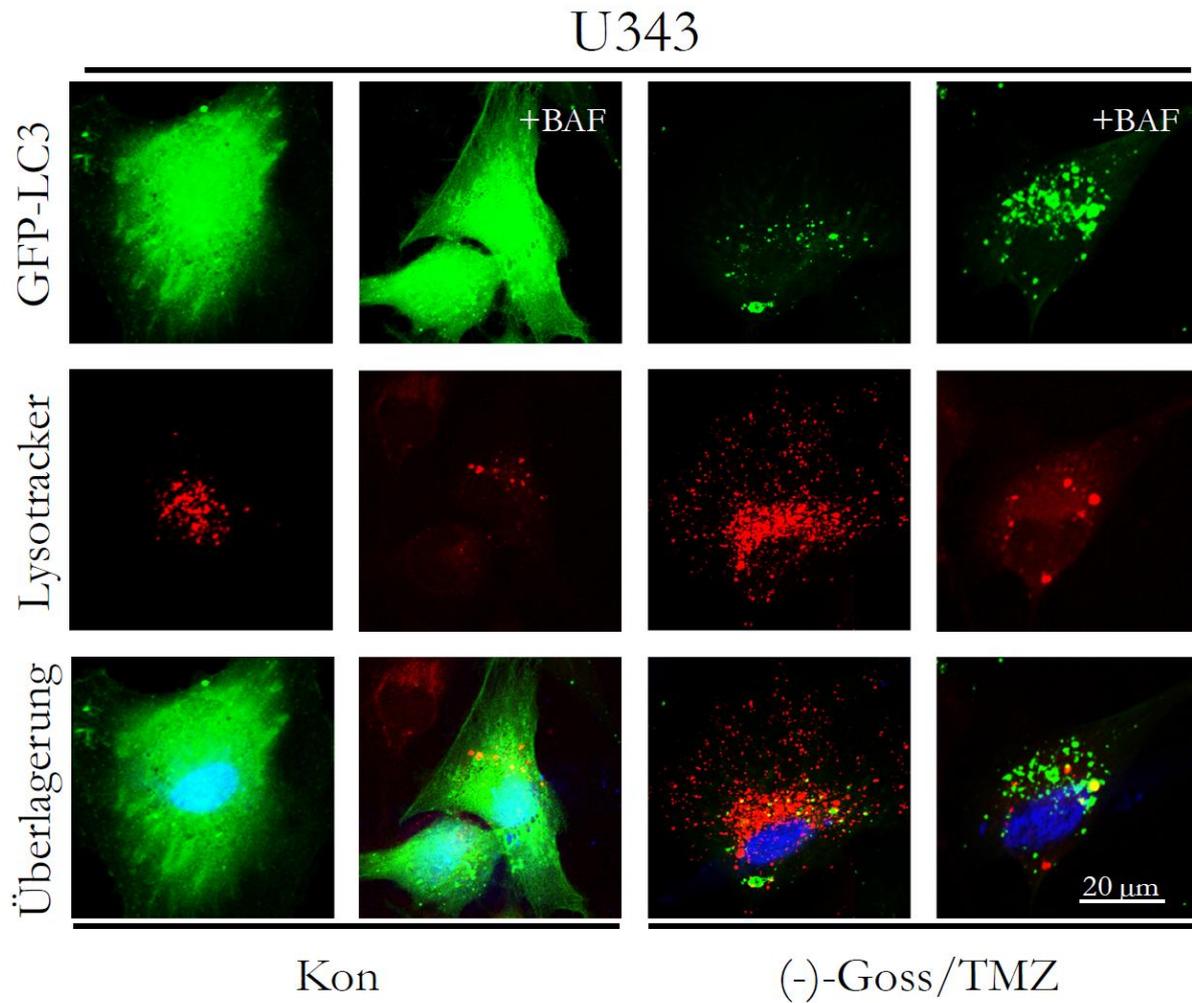


*Abbildung 38:* Intakter autophagischer Flux in Gliomzellen nach Gossypol und TMZ Behandlung. Zur Untersuchung der autophagischen Aktivität auf Proteinebene wurde die Gliomzelllinie U343 verwendet. Für die Ermittlung der Autophagieaktivität wurden die beiden Zellkulturen, Kontrollzellen (Ø-Vek) und Beclin1-Knockdown mit 5 µM (-)-Gossypol allein oder in Kombination mit 100 µM TMZ für 96 h behandelt. Die Positivkontrolle wurde durch die Behandlung mit 25 µM C<sub>2</sub>-Ceramid für 24 h dargestellt. Zusätzlich wurden die Zellen einer Behandlung mit dem spezifischen Inhibitor Bafilomycin A1 [10 nM] für 4 h unterzogen. Gezeigt ist der Immunoblot gerichtet auf die Isoformen des LC3-, sowie des p62-Proteins. Gesamtzelllysate wurden nach allen Behandlungen generiert und mittels Immunoblot die Expressionsniveaus von LC3 und p62 bestimmt. GAPDH diente dabei als Ladekontrolle.

Um die Resultate des intakten autophagischen Fluxes nach (-)-Gossypol-Behandlung zunehmend zu untermauern, wurde ein spezifisch konstruiertes Plasmid verwendet, welches die Ausbreitung sowohl von Autophagosomen, als auch Lysosomen gleichzeitig in der Zelle aufzeichnet. Das Plasmid verfügt über zwei hintereinander gelagerte Sequenzen, die zum einen das Signal für mRFP und für GFP tragen. Da das GFP-Signal in aziden Vesikeln abgebaut wird, können nur durch die mRFP-Fluoreszenz, welches wesentlich stabiler bei niedrigen pH-Werten ist, Lysosomen dargestellt werden. Dies bedeutet, das Autophagosomen mit beiden Fluoreszenzsignalen (mRFP, GFP) gleichzeitig dargestellt werden. Wohingegen Lysosomen, nur mit der mRFP-Fluoreszenz abgebildet werden. Diese Eigenschaft des speziell dafür entwickelten Plasmids, konnte unsere Fragestellung des intakten autophagischen Fluxes nach Gossypol und TMZ Kombinationsbehandlung in der Zelle optimal darstellen. Dazu wurden U343 Gliomzellen transient mit dem mRFP-GFP-LC3-Plasmid transfiziert und mit 5  $\mu\text{M}$  Gossypol und 100  $\mu\text{M}$  TMZ für 72 h behandelt. Für die Hemmung des autophagischen Fluxes wurden die Zellen zusätzlich mit 10 nM Bafilomycin A1 für 4 h behandelt. Für die entsprechende Auswertung auf Einzelzellebene mittels konfokaler Mikroskopie wurden die Kerne zusätzlich mit TO-PRO3 [1  $\mu\text{M}$ ] angefärbt. Ergebnisse nach konfokal-mikroskopischer Analyse zeigten unter Kontrollbedingungen ein klares zytoplasmatisches Signal von LC3 in beiden Kanälen (mRFP und GFP). Die Behandlung von Bafilomycin A1 zeigte eine leichte Induktion von Autophagosomen. Interessanterweise konnte wie erwartet nach der Kombinationsbehandlung von Gossypol und TMZ eine starke Induktion an Autophagosomen (mRFP und GFP) und Lysosomen und Autophagolysosomen (mRFP) beobachtet werden. Dieser Flux von Autophagosomen zu Lysosomen konnte wiederum durch die Gabe von Bafilomycin A1 vollständig geblockt werden, da in der Zelle eine starke Anreicherung von Autophagosomen, aber keine von Lysosomen abgebildet wurde (mRFP und GFP). Daten dieser Untersuchung bestätigen diese der Immunoblot-Analyse. Sowohl die Behandlung mit Gossypol allein, als auch in Kombination mit TMZ, leiten den autophagischen Prozess, über die Integrierung des LC3-II-Proteins in die sich neu gebildeten Autophagosomen und über die Degradation von p62 ein. Dies spiegelt sich ebenso durch die Konversion von LC3-I zu LC3-II und durch die Zunahme an Lysosomen wider.



Als letztes Experiment, um die nicht gestörte Lysosomale Aktivität in Gliomzellen nach Gossypol und TMZ Behandlung zu unterstreichen wurden die Zellen auf Einzelzellebene untersucht. Die Gliomzelllinie U343 wurde mit 5  $\mu\text{M}$  (-)-Gossypol allein oder in Kombination mit 100  $\mu\text{M}$  TMZ für 96 h behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen einer Behandlung mit dem spezifischen Inhibitor Bafilomycin A1 [10 nM] für 4 h unterzogen. Mittels Färbung mit dem Farbstoff LysoTracker Red, konnte die lysosomale Aktivität innerhalb der lebenden Zelle dargestellt werden. Wie in Abschnitt 5.11 beschrieben, geht mit der Behandlung mit Gossypol und TMZ in Kombination eine starke Aktivierung des autophagischen Prozesses einher, der ebenfalls durch eine Ausdehnung an Lysosomen und Autophagosomen gekennzeichnet ist. Bei Betrachtung der Zellen auf Einzelzellebene, zeigte sich unter Kontrollbedingungen eine moderate Anzahl an aziden Vesikeln, die durch die Kombinationsbehandlung stark erhöht wurde. Durch die zusätzliche Gabe des Inhibitors Bafilomycin A1 [10 nM] wurde der autophagische Flux von Autophagosomen zu Lysosomen vollständig geblockt. Dies bildet sich durch ein komplettes Verschwinden der LysoTracker-Färbung ab. Zusammengefasst teilen uns diese Daten mit, dass nach Behandlung mit Gossypol und TMZ ein intakter autophagischer Flux nach Aktivierung der Autophagie in Gliomzellen induziert wird. Aufgrund dieser Daten ist bewiesen, dass die Zelltod-Resistenz in Gliomzellen über die Aktivierung eines autophagischen Zelltods nach Gabe von (-)-Gossypol überwunden wurde.



*Abbildung 40:* Die lysosomale Aktivität wird nach Gossypol und TMZ Behandlung nicht gestört. Die lysosomale Ausbreitung wurde spezifisch mittels Lysotracker Red Färbung in lebenden U343 Gliomzellen dargestellt. Die Gliomzelllinie U343 wurde am Vortag auf Glasplättchen ausgebracht, und für 72 h mit 5 µM (-)-Gossypol und 100 µM TMZ in Kombination behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem Inhibitor Bafilomycin A1 [10 nM] für 4 h behandelt. Die Zellkerne wurden mit TO-PRO3 [1 µM] und die aziden vesikulären Strukturen mit Lysotracker Red angefärbt. Analyse auf Einzelzellebene wurde mittels konfokalen Mikroskops durchgeführt. Maßstab 20 µm.

## VI DISKUSSION

Das anaplastische Astrozytom (WHO Grad III) und das hochmaligne Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV) sind die häufigsten und bösartigsten Tumore des zentralen Nervensystems (Hulleman und Helin, 2005; Ashby und Ryken, 2006), die binnen weniger Monate zum Tod des betroffenen Patienten führen können. Die schlechte Prognose ist zum einen darauf zurück zu führen, dass diese Tumoren eine ausgeprägte Invasivität aufweisen. Tumorzellen lösen sich aus dem Zellverband und migrieren in das umliegende gesunde Gewebe. Daher ist es besonders schwierig, eine vollständige chirurgische Resektion des Tumors zu gewährleisten. Das hohe Ausmaß der Invasion ist auch der Hauptgrund für die hohe Rezidivquote und macht es unumgänglich, neue Wege der Therapie zu erforschen, um das Überleben der Patienten zu verlängern, ihnen eine bessere Lebensqualität zu ermöglichen und die Aussicht auf ein längeres progressionsfreies Leben zu gewährleisten. Das aggressive Wachstumsverhalten und die ausgeprägte Resistenz gegenüber verfügbaren Therapien wie Bestrahlung und Chemotherapie sind Hauptgründe für die schlechte Prognose für Patienten mit malignen Gliomen, die sich in den letzten Jahren leider nur unwesentlich verbessert hat.

Viele Chemotherapeutika und Bestrahlung entfalten ihre therapeutischen Effekte über die Aktivierung der Apoptose, auch wenn diese Aktivierung keineswegs zielgerichtet erfolgt. Bei malignen Gliomen gibt es allerdings keinerlei Evidenzen, dass durch die momentan verwendeten Therapien in nennenswertem Umfang Apoptose induziert wird. Von besonderer Bedeutung für die Zelltodresistenz von Gliomen scheint die erhöhte endogene Expression von Proteinen der Bcl-2-Subfamilie (Cory und Adams, 2002; Hetschko et al., 2008) zu sein die sowohl apoptotische, als auch nicht apoptotische Formen des Zelltodes antagonisieren und partiell redundante Funktionen erfüllen. Die Entschlüsselung der genauen molekularen Mechanismen und der entscheidenden zellulären Faktoren, die der Zelltodresistenz zugrunde liegen, scheint daher der bestmögliche Ansatz zu deren Überwindung zu sein. Anhand verstandener Schlüsselfunktionen, die für die Resistenz von entscheidender Bedeutung sind, könnten Strategien entwickelt werden, die die Sensibilisierung oder die direkte Elimination von Gliomzellen zum Ziel haben.

Die hohe Resistenz gegenüber dem klassischen programmierten Zelltod, der Apoptose, ist ein auffallendes Merkmal des malignen Glioms (Bogler und Weller, 2002; Steinbach und Weller, 2004). Die Aktivierung der pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder Bax und Bak ist der initiale Schritt für die Induktion des intrinsischen mitochondrialen apoptotischen Signalweges. Diese Aktivierung schließt unter anderem durch die Porenbildung an der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP), initiiert durch Bax und Bak, eine Freisetzung von Smac/Diablo, Endonuklease G und Cytochrom c, welches die Bildung des Apoptosoms fördert (Kroemer et al., 2007). Wichtige inhibitorische Regulatoren des intrinsischen Signalweges, sind die anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie. Sie sind in der Lage, durch Bildung einer hydrophoben Tasche aus den BH-Domänen 1-3, die alpha-helikale Struktur pro-apoptotische Proteine zu binden, gleichzeitig zu hemmen und folglich den Ablauf der Apoptose zu unterbinden (Willis und Adams, 2005).

Anti-apoptotische Proteine, wie Bcl-2 und Bcl-xL, oder auch Bcl-w und Mcl-1 sind in Glioblastomen hoch exprimiert (Jiang et al., 2003; Hetschko et al., 2008). Zudem steht diese Überaktivierung vermutlich im starkem Zusammenhang mit der Apoptose-Resistenz in Gliomen (Hetschko et al., 2008). Neben der Regulation der Apoptose durch anti-apoptotische Bcl-2-Proteine, besitzen diese die Fähigkeit auch Caspase-unabhängige Zelltodmechanismen, darunter den Signalweg der Autophagie, zu regulieren (Shimizu et al., 2004; Pattingre et al., 2005; Maiuri et al., 2007b; Oberstein et al., 2007).

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand daher die Frage, ob tatsächlich die Überexpression der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine mit der hohen Resistenz korreliert. Demgemäß wurden zu Beginn RNAi-Experimente durchgeführt, die spezifisch Bcl-2 bzw. Bcl-xL transient reprimieren sollten. Gliome zeichnen sich ebenfalls durch ihre extrem hohen Grad an Tumorphoxie aus, die mit der Resistenz gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung korreliert (Jensen, 2006). In vorherigen experimentellen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte festgestellt werden, dass Gliomzelllinien unterschiedlich auf Hypoxie reagieren und adaptiert sind. Diese Adaptation steht ebenfalls im Zusammenhang mit der Resistenz gegenüber apoptotischer Stimuli (Hetschko et al., 2008). Aufgrund dieser Hypothese wurde eine Anoxie-sensitive (MZ-54) mit einer Anoxie-resistenten Gliomzelllinie (U343) verglichen, in denen durch sequenzspezifische RNAi-Oligonukleotide eine Depletion des Proteins Bcl-2 bzw. Bcl-xL hervorgerufen wurde. Durch die Depletion von Bcl-2 bzw. Bcl-xL konnte eine verstärkte Sensibilisierung gegen einen Sauerstoffentzug in beiden Gliomzelllinien beobachtet werden, welcher in Gliomzellen eine nicht-apoptotische Form des Zelltodes auslöste. Diese Resultate unterstreichen die Hypothese, dass anti-apoptotische Bcl-2-Proteine entscheidend zur Resistenz gegen nicht-apoptotische Zelltodprogramme beitragen (Fulda et al., 2002a).

Um die möglichen therapeutischen Konsequenzen dieser Befunde zu untersuchen, wurden Inhibitoren eingesetzt, die spezifisch die Aktivität der anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder unterdrücken sollten. Studien aus den vergangenen Jahren zeigen, dass Vertreter dieser Wirkstoffklasse tumorsensibilisierend wirken können und vielversprechende Kombinationstherapien zu herkömmlichen klinischen Behandlungsformen sein könnten (Cory und Adams, 2002; Shoemaker et al., 2006; Kroemer et al., 2007). Für die mögliche Sensibilisierung von Gliomzellen gegenüber konventionellen chemotherapeutischen Substanzen wurden die synthetisch hergestellten BH3-Mimetika BH3I-2', HA14-1 und ABT-737 eingesetzt. Diese binden kompetitiv an die BH3-Bindetasche von Bcl-2-ähnlichen Proteinen und blockieren somit die Heterodimerisierung mit pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern. Die beiden Inhibitoren BH3I-2' und HA14-1 binden spezifisch nur Bcl-2 und Bcl-xL, wogegen ABT-737 die Proteine Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w inhibiert (Lessene et al., 2008; Kang und Reynolds, 2009). Zudem wurde der aus der Baumwollpflanze gewonnene Pan-Bcl-2-Inhibitor (-)-Gossypol eingesetzt. Dieser Inhibitor wirkt als BH3-Mimetikum sehr potent, da er spezifisch die gesamte Gruppe der Bcl-2-Subfamilie (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w und Mcl-1) inhibiert (Lessene et al., 2008; Kang und Reynolds, 2009).

Das von dem Hersteller Ascenta entwickelte (-)-Gossypol, auch mit dem Synonym AT-101 gekennzeichnet, besitzt einen hohen Stellenwert in der klinischen Entwicklung (Liu et al., 2009, Lian et al.,

2010). Klinische Studien, die sowohl die Verträglichkeit und Sicherheit des Medikaments (Phase I), als auch die Überprüfung des Therapiekonzepts und Findung der geeigneten Dosis (Phase II) einschließt, werden bei oraler Applikation zur Zeit schon bei Glioblastom-Studien durchgeführt (<http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00390403>). Darüber hinaus wurde schon in anderen Tumoren die Phase III mit einer AT-101-Behandlung eingeleitet (<http://clinicaltrials.gov>).

Interessanterweise konnte in den Gliomzelllinien lediglich eine limitierte Sensitivierung nach Einzelbehandlung mit BH3I-2` und HA14-1 beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte nach Behandlung mit dem Pan-Bcl-2-Inhibitor (-)-Gossypol Zelltod in signifikantem Ausmaß induziert werden. Dies spricht dafür, dass die alleinige Inhibierung von Bcl-2 und Bcl-xL nicht ausreicht, um in Gliomzelllinien effizient den Zelltod auszulösen (Hetschko et al., 2008). Das BH3-Mimetikum ABT-737 welches Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w spezifisch inhibieren kann, induzierte in den Zelllinien U343 und MZ-54 detektierbaren Zelltod, der bei vergleichbaren Konzentrationen jedoch wesentlich moderater im Vergleich zur Behandlung mit (-)-Gossypol ausfällt. Da der Pan-Bcl-2-Inhibitor (-)-Gossypol zusätzlich das Protein Mcl-1 blockiert und auch dessen Degradation bewirkt, scheint die zusätzliche inhibition von Mcl-1 ein maßgeblicher Faktor zu sein, Gliomzellen für den Zelltod zu sensibilisieren.

Bezüglich dieser Hypothese wurde in anderen Arbeiten (Tagscherer et al., 2008) ebenfalls das Phänomen beobachtet, dass die zusätzlich Inhibierung von Mcl-1 entscheidend für die Aktivierung des intrinsischen Zelltods in Gliomzellen ist (Nijhawan et al., 2003). Das anti-apoptotische Protein Mcl-1 wird in niedriggradigen Astrozytomen ebenfalls schon sehr hoch exprimiert (Krajewski et al., 1997), wodurch dem Protein eine prominente Rolle bei der Inhibierung des mitochondrialen intrinsischen Apoptose-Signalweges zukommt.

Über den Einsatz von BH3-Mimetika, die eine Inhibierung anti-apoptotischen Mitglieder, im speziellen Mcl-1, induzieren, könnte eine Sensitivierung gegenüber der Apoptose in Gliomen erreicht werden. Möglicherweise bietet die Behandlung mit den BH3-Mimetika nicht den ausreichenden zytotoxischen Effekt, wodurch weitere Sensitizer, wie z.B. TRAIL, welcher als Ligand über den FAS-Rezeptor wirkt und darüber hinaus den extrinsischen Signalweg der Apoptose induziert, benötigt werden. Konzepte dieser Art wurden ebenfalls in Studien von Fulda untersucht, die in Gliomzellen über die Smac-Sensitivierung und TRAIL-Behandlung Zelltod in diesen Zellen induzieren konnten (Fulda et al., 2002b).

Neben ihrer Bedeutung für die Apoptose und die Autophagie sind anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder in der Lage anti-oxidativ zu wirken, da sie in der Zelle die Redox-Homöostase über die Bildung anti-oxidativer Enzyme fördern, und ebenfalls die Level des zellulären Gluthations (GSH) (Jang und Surh, 2003) hoch halten. Dadurch werden die Zellen vor oxidativen Stress (Bestrahlung und verschiedene Chemotherapeutika), verursacht durch schädliche Sauerstoffradikale (engl. reactive oxygen species, ROS), die an den Mitochondrien als Nebenprodukte der Zellatmung entstehen, geschützt. An den Mitochondrien beruht dieser Schutzmechanismus auf der Inhibierung der Permeabilisierung der äußeren Membran des Mitochondriums (MOMP) und der mitochondrialen Dysfunktion durch Bcl-2 Proteine. Die

Wirkung der BH3-Mimetika, im speziellen (-)-Gossypol scheint die bestehende Redox-Homöostase, über die Inhibierung der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine, zu überwinden. Darüber hinaus kann (-)-Gossypol unter Umständen selbst oxidativen Stress auslösen, wodurch es zu DNA-Schäden kommen kann. In vielen Studien wurde dies belegt (Azad et al., 2009; Chen et al., 2009), wohingegen oxidativer Stress den Prozess der Autophagie auch stimulieren kann. Zudem wurde in der Studie von Ko (Ko et al., 2007) gezeigt, dass (-)-Gossypol ein potenter Aktivator des oxidativen Stresses in Kolonkarzinomzellen ist. Diese Befunde legen einen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und dem durch (-)-Gossypol induzierten autophagische Zelltod in Gliomzellen nahe. Interessanterweise wurde Mcl-1 als Regulator des Zellüberlebens, über die Aktivierung verschiedener Kinasen, wie c-Jun N-terminale Kinase oder auch über Ser/Thr-Protein-Kinasen beschrieben. Da über die Behandlung mit (-)-Gossypol das Protein Mcl-1 spezifisch degradiert wird, was darüber hinaus für die Zelle eine Stresssituation darstellt, scheint die Inhibierung von Mcl-1 über die Aktivität verschiedener Kinasen (JNKs und GSK3) zu wirken, die den Zelltod in Gliomen fördern (Morel et al., 2009).

Andere Studien diskutieren kontrovers, ob (-)-Gossypol ebenfalls alternative Mechanismen in Gang setzen kann, die nicht in Verbindung mit seiner Funktion als BH3 Mimetikum stehen, sondern andere zelluläre Faktoren zum Ziel haben. Für eine Untersuchung des apoptotischen Zelltods in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF-Zellen), konnte ein Bax/Bak-unabhängiger Zelltod, der über eine Behandlung mit (-)-Gossypol verursacht wurde, induziert werden. Dieser Beweis unterstreicht, dass die zytotoxische Wirkung von (-)-Gossypol nicht allein durch die Inhibierung von Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w und Mcl-1 herrührt (Lei et al., 2006; Vogler et al., 2009). Allerdings wurde ähnlich zu dem Nur-77-abgeleiteten Peptid NuBCP-9 (Kolluri et al., 2008) postuliert, dass (-)-Gossypol die Konformation des Bcl-2-Proteins spezifisch ändern kann, es eine pro-apoptische Wirkung besitzt und somit die Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Bax und Bak nicht essentiell für diesen Zelltod-induzierten Stimulus ist (Lei et al., 2006). Zusätzlich zu dem möglicherweise auftretenden Effekt der BH3-Mimetika auf oxidativen Stress weisen diese Beobachtungen auf die zelltodfördernden Effekte von Gossypol in Bax/Bak defizienten Zellen hin.

Das DNA-reparierende Enzym O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA-Methyltransferase (MGMT) liegt in einem Großteil der malignen Gliome epigenetisch inaktiviert vor. Darüber hinaus ist das MGMT-Enzym bzw. die MGMT-Promotormetylierung ein etablierter Marker für das klinische Outcome eines Patienten der mit dem alkylierenden Chemotherapeutikum Temozolomid (TMZ) behandelt wird (Hegi et al., 2005; Stupp et al., 2005b; Sabharwal und Middleton, 2006; Krex et al., 2007). Unsere Experimente zeigten, dass in der MGMT-defizienten Zelllinie U343 durch (-)-Gossypol-Gabe in der Kombination mit TMZ ein weitaus höherer Zelltod verursacht werden konnte, im Vergleich zur Einzelbehandlung mit den jeweiligen Substanzen. Zudem zeigte sich, dass mit der TMZ Behandlung eine Induktion des autophagischen Zelltodes (Typ II-Zelltod) einhergeht. Im Gegensatz dazu konnte dies nicht in der Gliomzelllinie U87 gezeigt werden, welche durch eine MGMT-Enzymaktivität gekennzeichnet ist (Hegi et al., 2005, Chahal et al., 2010) spiegeln sich die Befunde vieler klinischer Daten wider, dass Tumore mit dieser Methylierung ein schlechteres Ansprechen auf die Therapie zeigen. Die Zelllinie U87 zeigt einen deutlich niedrigeren

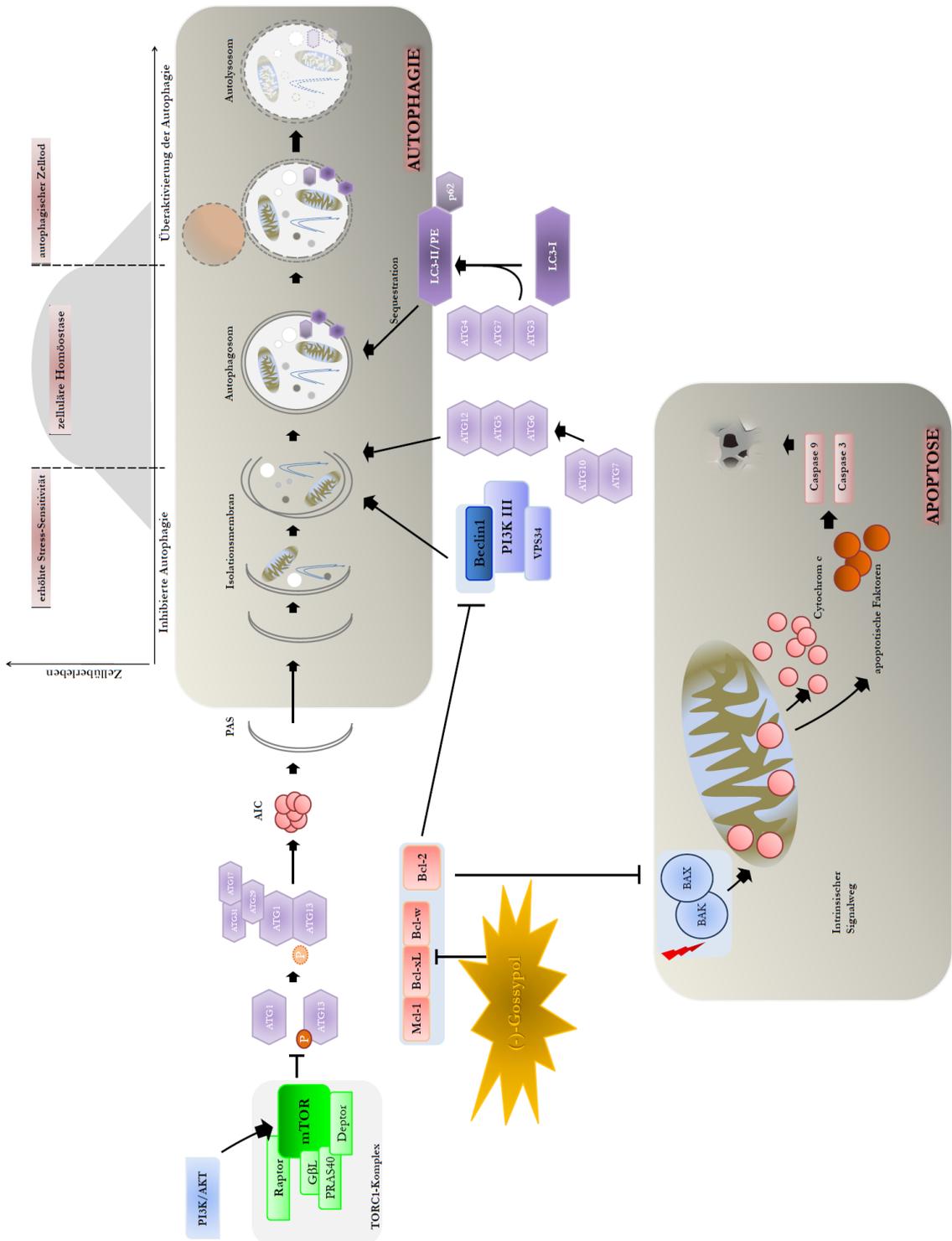
Zelltod sowohl nach Einzelbehandlung, als auch nach Kombinationsbehandlung mit (-)-Gossypol und TMZ im Vergleich zur Gliomzelllinie U343 (MGMT-positiv). Zusammenfassend scheint die MGMT-Promotormethylierung in den Gliomzellen eine bedeutende Rolle in der Resistenz gegenüber TMZ zu spielen (Hegi et al., 2005; Alonso et al., 2007).

Obwohl primär endogener metabolischer Stress mit einer protektiven Form des autophagischen Prozesses beantwortet wird, die die Zelle bei kurzzeitigem Nährstoffmangel überleben lässt und dabei entbehrliche Proteine, Organellen u.a. degradiert, kann bei einer verstärkten Überaktivierung von Autophagie der autophagische Zelltod eingeleitet werden, der nicht mehr umkehrbar für die Zelle ist (Gozuacik und Kimchi, 2004). Unsere Experimente und die daraus resultierenden Daten zeigten, dass sowohl durch alleinige Behandlung mit (-)-Gossypol, als auch durch die Kombinationsbehandlung mit TMZ in Gliomzellen der Typ II-Zelltod induziert wird. Dieser Zelltod, wird durch eine Kern-Kondensierung, durch ein Zellschrumpfen und durch eine verstärkte Translokation des GFP-LC3-Markers zu den Autophagosomen gekennzeichnet. Ebenfalls zeigten Experimente nach (-)-Gossypol-Gabe bzw. Kombinationsbehandlung mit TMZ, dass das aktive GFP-LC3-II durch den autophagischen Flux von den Autophagosomen zu den Lysosomen gelangt, wodurch folglich die Degradierung von nicht mehr benötigten bzw. schädigenden Zellbestandteilen veranlasst wird. Der induzierte autophagische Zelltod war assoziiert mit einer zusätzlichen Cytochrom c Freisetzung in einem kleinen Teil von 15% zur Gesamtzellpopulation, die aber nicht zur Aktivierung von Caspasen führte, noch ging sie mit einer lysosomalen Dysfunktion einher, war aber durch eine verringertes mitochondriales Membranpotential gekennzeichnet. Die vorliegenden Resultate unterstreichen die Annahme, dass der durch (-)-Gossypol verursachte Zelltod weder von einer lysosomalen Permeabilisierung und Dysfunktion, noch von einer Aktivierung des intrinsischen apoptotischen Signalwegs abhängt.

Der endogene Hauptregulator der Autophagie ist die Ser/Thr-Kinase mTOR. Jüngste Ergebnisse belegen, dass erst durch die Inhibierung der beiden mTOR-Komplexe TORC1 und TORC2 die Aktivierung des autophagischen Prozesses effizient vorangetrieben wird (Sini et al., 2010; Wang et al., 2009). In Analogie dazu zeigten unsere Experimente, dass die alleinige Inhibierung von TORC1, induziert durch den Inhibitor Rapamycin, sowohl eine moderate Proliferationshemmung, als auch einen bedingten zytotoxischen Effekt bewirkte. Die Kombinationsbehandlung von Rapamycin löste ebenfalls keine Sensibilisierung in der Gliomzelllinie U87 für die mit (-)-Gossypol behandelten Zellen aus. Dahingegen konnte durch die Inhibierung von TORC1 und TORC2 durch einen spezifischen stabilen Knockdown von mTOR in LNT-229 Zellen, die Zellen gegenüber der alleinigen Behandlung sowohl mit (-)-Gossypol allein, als auch durch die Kombinationsbehandlung mit TMZ sensibilisiert werden. Dies spricht dafür, dass die zusätzliche Inhibierung von TORC2 eine essentielle Rolle für die Induktion der Autophagie spielt (Sini et al., 2010; Iwamaru et al., 2007). Im Vergleich zu den Daten des mTOR-Knockdowns, zeigten die stabilen Knockdown-Klone von ATG5 und Beclin1 in den drei Gliomzelllinien U343, U87, MZ-54 einen drastisch verminderten Zelltod, in Bezug auf die Kontrollzellen, und in Abhängigkeit der Behandlungen

mit (-)-Gossypol und der Kombination mit TMZ. Die Proteine ATG5 und Beclin1, die bei der Initiierung der präautophagosomalen Strukturen beteiligt sind, scheinen essentiell für den durch (-)-Gossypol induzierten Zelltod zu sein. Zudem wird der dramatische Rückgang des Zelltods in den beiden ATG5- und Beclin1-Knockdown-Zellen sowohl mit einer verringerten lysosomalen Aktivität gekennzeichnet, als auch mit einer blockierten Konversion von LC3-I zu LC3-II. Experimente, nach Behandlung sowohl mit (-)-Gossypol allein, als auch in Kombination mit TMZ, veranschaulichen einen intakten autophagischen Flux, durch eine erhöhte lysosomale Aktivität charakterisiert ist. Dieser wird sowohl durch die Konversion von LC3-I zu der lipidierten aktiven Form LC3-II, als auch durch die Degradierung des autophagischen Substrats p62/SQSTM1 gekennzeichnet. Ein zusätzliches Kontrollexperiment mit dem Inhibitor Bafilomycin A1 blockiert den einhergehenden autophagischen Flux, da er die Fusion von Autophagosom mit Lysosom hemmt, wodurch der autophagische Zelltod blockiert wird.

Zusammenfassend zeigen die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Resultaten eine beträchtliche Sensibilisierung von Gliomzellen, die nur über eine Aktivierung des autophagischen Zelltods erreicht werden konnte. Die Induktion der Autophagie, verursacht durch den Pan-Bcl-2-Inhibitor (-)-Gossypol löst in Gliomzellen über die Hemmung aller Bcl-2-Proteine und gleichzeitiger Degradierung von Mcl-1 einen Caspase-unabhängigen autophagischen Zelltod in Apoptose-resistenten Gliomzelllinien aus. Aufgrund der differenziellen Effekte des Pan-Bcl-2-Inhibitors (-)-Gossypol im Vergleich zu anderen BH3-Mimetika, die den autophagischen Zelltod über die Hemmung aller anti-apoptotischen Familienmitglieder auslöst, hat die nicht-erreichte Degradierung von Mcl-1, im speziellen durch ABT-737 verursacht, nur bedingte Effekte auf die Sensitivierung von Gliomzellen. Daher scheint das Konzept einer Sensitivierung von Gliomen nur mit einer gleichzeitigen Antagonisierung von Mcl-1 ein vielversprechender neuer Therapieansatz zu sein.



*Abbildung 41:* Die molekulare Wirkungsweise des Pan-Bcl-2-Inhibitors (-)-Gossypol. (-)-Gossypol, inhibiert alle anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Subfamilie. Über die Inhibition kann zum einen der intrinsische apoptotische Signalweg der Apoptose induziert werden. Die Induktion beginnt mit einer Aktivierung der pro-apoptotischen Familienmitglieder Bax und Bak, die über den MOMP-Prozess an den Mitochondrien verschiedene apoptotische Faktoren, wie z.B: das Cytochrom c in das Zytosol entlassen. Nach der Entlassung dieser Faktoren werden weitere Effektor-Caspasen (Caspase-3 und -9) aktiviert, die folglich die Apoptose einleiten.

Zum anderen kann (-)-Gossypol den autophagischen Prozess über die Inhibition der anti-apoptotischen Proteine, wie Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w und Mcl-1 einleiten. Die Induktion des autophagischen Zelltods geschieht über die Aktivierung von Beclin1 und dessen Komplexbildung mit weiteren Faktoren, wie VPS31 und PI3K III. Zusätzlich wird unter Nährstoffmangel und einer einhergehenden Inhibition von PI3K/AKT der TORC1-Komplex nicht gebildet. Dies führt ebenfalls zu einer Aktivierung der Signalkaskade, an dem weitere ATG-Proteine beteiligt sind. Die Überaktivierung des autophagischen Prozesses führt zum Zelltod der Zelle. Über die Bildung des autophagischen Initiations Komplexes (AIC) und über die Bildung der präautophagosomalen Struktur (PAS) wird das Autophagosomen gebildet. Die Bildung des Autophagosomen involviert sowohl weitere ATG-Proteine, als auch die Integration des LC3/PE-Proteins. Nach der Fusion des Autophagosomen mit dem Lysosomen werden alle von der Membran umschlossenen Bestandteile der Zelle, auch das p62-Protein mittels saurer Hydrolasen in den Autolysosomen degradiert.

## VII ZUSAMMENFASSUNG

Primäre Hirntumore des Zentralen Nervensystems (gehen aus Nervenzellen, Gliazellen, Hirnhäute (Meningen) und auch Hirngefäße aus. Das anaplastische Astrozytom, Oligodendrogliom und Oligoastrozytom (WHO-Grad III) und auch die bösartigste Form, das Glioblastoma multiforme (WHO-Grad IV) bilden den wesentlichen Anteil der astrozytären Tumoren. Bedingt durch die ungünstige Prognose für Patienten mit Glioblastomen bedarf es einer Optimierung der therapeutischen Maßnahmen. Die momentane Therapie besteht nach Konstitution des Patienten und der Lokalisation des Tumors meist aus der Operation mit angeschlossener Strahlen- und eventueller adjuvanten Chemotherapie. Die Prognose ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie der Ausbreitung und der Lokalisation des Tumors und hat sich in den letzten Jahren leider nur unwesentlich verbessert, da immer noch von einer medianen Überlebenszeit des Patienten zwischen 8 und 15 Monaten im Falle eines Glioblastoms ausgegangen werden kann. Die Entstehung und Progression von malignen Tumorerkrankungen sind eng mit Störungen und Defekten in Signalwegen, die das Zellüberleben und den Zelltod regulieren, verknüpft. Aberrationen, wie die Blockade von Tumorsuppressorgenen, oder die Aktivierung bzw. Überexpression von Onkogenen, führen zur veränderten Expression von Zelltod-inhibitorischen Genen wie den anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern, und letztendlich zu Abweichungen der normalen zellulären Homöostase. Veränderungen dieser Art bewirken, dass Tumorzellen die Fähigkeit erhalten, unkontrolliert zu proliferieren, infiltrativ zu wachsen und eine eigene Vaskularisierung zu initiieren. Tumorzellen besitzen eine erhöhte Apoptose- und Zelltodresistenz, die maßgeblich durch die stark erhöhte Expression von anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen gekennzeichnet ist. In der vorliegenden Arbeit stand daher die Fragestellung im Mittelpunkt, inwieweit anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Familie zur Resistenz von malignen Gliomzellen gegen die Apoptose und den autophagischen Zelltod beitragen und wie diese Mechanismen gezielt überwunden werden können.

Die Blockade der vier Familienmitglieder der Bcl-2-Subfamilie (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w) wurde über den Einsatz von spezifischen Inhibitoren, den sogenannten BH3-Mimetika, vermittelt. BH3-Mimetika besitzen eine hohe Affinität zur Bindungstasche der Bcl-2-Proteine, wobei durch die Bindung eine Blockade des Proteins hervorgerufen wird. Die eingesetzten BH3-Mimetika haben unterschiedliche Bindungsprofile und können daher ein, zwei oder mehrere Proteine der Bcl-2-Familie inhibieren. Die verwendeten Inhibitoren BH3I-2', HA14-1 und ABT-737, die nur eine limitierte Wirkung auf den Zelltod von Gliomzellen entfalteten, sind allesamt nicht in der Lage, Mcl-1 zu blockieren. Deshalb wurde zusätzlich ein Pan-Bcl-2-Inhibitor, das (-)-Gossypol, verwendet. Dieser Inhibitor hemmt alle anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder, und steigerte über die Inhibition und Degradation von Mcl-1 effizient den Zelltod von Gliomzellen. Dagegen zeigte die (-)-Gossypol-Behandlung in nicht transformierte Astrozytenkulturen keine zytotoxischen Effekte.

Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass durch das BH3-Mimetikum (-)-Gossypol ein autophagischer Zelltod induziert wird. Unter der Verwendung eines charakteristischen Markerproteins, dem LC3-Protein, konnte nach Induktion des nicht-apoptotischen, autophagischen Zelltodes durch (-)-Gossypol eine Translokation von GFP-LC3 in die Autophagosomen und Autolysosomen festgestellt werden.

Viele Gliome weisen eine Methylierung des MGMT-Promotors auf, die es den Zellen erschwert, schnell DNA-Schäden zu reparieren. Aufgrund dieser Methylierung sind diese Tumoren sensitiv für eine Behandlung mit alkylierenden Substanzen (Temozolomid). Auf Grundlage dieser Beobachtungen wurden die kombinatorischen Effekte von BH3 Mimetika und Temozolomid in MGMT-positiven (U87) und MGMT-negativen (U343) Gliomzelllinien verglichen, wobei sich lediglich in MGMT-negativen U343-Gliomzellen signifikante, kombinierte Effekte ergaben. Dieser Zelltod war mit einer Potenzierung der Autophagie assoziiert, nicht jedoch mit einer Aktivierung von Caspasen und einer lysosomalen Dysfunktion.

Die Depletion des endogenen Autophagieinhibitors mTOR bewirkte nach den Behandlungen mit (-)-Gossypol und TMZ einen zusätzlichen zytotoxischen Effekt. Im Gegensatz dazu wurde durch lentivirale RNA-Interferenz gegen die Autophagiegene ATG5 und Beclin1 eine potente Reduktion der zellulären Autophagie und des autophagischen Zelltodes erreicht. Insgesamt unterstreichen diese Daten die zentrale Rolle von Bcl-2 Proteinen für die Regulation der Autophagie und legen nahe, dass durch (-)-Gossypol und (-)-Gossypol in Kombination mit Temozolomid in Gliomzellen zytotoxische Autophagie induziert wird.

## VIII LITERATURVERZEICHNIS

- Acker T, Plate KH (2002) A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology. *J Mol Med* 80:562-575.
- Albarosa R, Colombo BM, Roz L, Magnani I, Pollo B, Cirenei N, Giani C, Conti AM, DiDonato S, Finocchiaro G (1996) Deletion mapping of gliomas suggest the presence of two small regions for candidate tumor-suppressor genes in a 17-cM interval on chromosome 10q. *Am J Hum Genet* 58:1260-1267.
- Alonso MM, Gomez-Manzano C, Bekele BN, Yung WK, Fueyo J (2007) Adenovirus-based strategies overcome temozolomide resistance by silencing the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter. *Cancer Res* 67:11499-11504.
- Alva AS, Gultekin SH, Baehrecke EH (2004) Autophagy in human tumors: cell survival or death? *Cell Death Differ* 11:1046-1048.
- Asai A, Miyagi Y, Sugiyama A, Gamanuma M, Hong SH, Takamoto S, Nomura K, Matsutani M, Takakura K, Kuchino Y (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* 19:259-268.
- Ashby LS, Ryken TC (2006) Management of malignant glioma: steady progress with multimodal approaches. *Neurosurg Focus* 20:E3.
- Ashford TP, Porter KR (1962) Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol* 12:198-202.
- Azad MB, Chen Y, Gibson SB (2009) Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment. *Antioxid Redox Signal* 11:777-790.
- Badie B, Goh CS, Klaver J, Herweijer H, Boothman DA (1999) Combined radiation and p53 gene therapy of malignant glioma cells. *Cancer Gene Ther* 6:155-162.
- Baehrecke EH (2005) Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:505-510.
- Balakrishnan K, Wierda WG, Keating MJ, Gandhi V (2008) Gossypol, a BH3 mimetic, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 112:1971-1980.
- Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre JY (2003) Primary brain tumours in adults. *Lancet* 361:323-331.
- Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP (2007) CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 67:4010-4015.
- Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 171:603-614.
- Bogler O, Weller M (2002) Apoptosis in gliomas, and its role in their current and future treatment. *Front Biosci* 7:e339-353.
- Bouchier-Hayes L, Lartigue L, Newmeyer DD (2005) Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 115:2640-2647.
- Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G (2005) Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 11:3155-3162.
- Burton EC, Prados MD (2000) Malignant gliomas. *Curr Treat Options Oncol* 1:459-468.
- Cain K, Bratton SB, Cohen GM (2002) The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 84:203-214.
- Carrington JC, Ambros V (2003) Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301:336-338.
- Castedo M, Ferri KF, Kroemer G (2002) Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro- and anti-apoptotic. *Cell Death Differ* 9:99-100.
- Chahal M, Xu Y, Lesniak D, Graham K, Famulski K, Christensen JG, Aghi M, Jacques A, Murray D, Sabri S, Abdulkarim B (2010) MGMT modulates glioblastoma angiogenesis and response to the tyrosine kinase inhibitor sunitinib. *Neuro Oncol*.
- Chakravarti A, Noll E, Black PM, Finkelstein DF, Finkelstein DM, Dyson NJ, Loeffler JS (2002) Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. *J Clin Oncol* 20:1063-1068.
- Chen Y, Azad MB, Gibson SB (2009) Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ* 16:1040-1052.

- Cloughesy TF, Yoshimoto K, Nghiemphu P, Brown K, Dang J, Zhu S, Hsueh T, Chen Y, Wang W, Youngkin D, Liao L, Martin N, Becker D, Bergsneider M, Lai A, Green R, Oglesby T, Koletto M, Trent J, Horvath S, Mischel PS, Mellinghoff IK, Sawyers CL (2008) Antitumor activity of rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma. *PLoS Med* 5:e8.
- Codogno P, Meijer AJ (2005) Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2:1509-1518.
- Collins VP (2004) Brain tumours: classification and genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75 Suppl 2:ii2-11.
- Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2:647-656.
- Cory S, Huang DC, Adams JM (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22:8590-8607.
- Coultas L, Strasser A (2003) The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol* 13:115-123.
- Cuervo AM (2004) Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol* 14:70-77.
- Cuervo AM, Bergamini E, Brunk UT, Droge W, French M, Terman A (2005) Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy* 1:131-140.
- Daniel NN, Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116:205-219.
- Degterev A, Yuan J (2008) Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:378-390.
- Degterev A, Lugovskoy A, Cardone M, Mulley B, Wagner G, Mitchison T, Yuan J (2001) Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL. *Nat Cell Biol* 3:173-182.
- Denault JB, Salvesen GS (2002) Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev* 102:4489-4500.
- Desagher S, Martinou JC (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10:369-377.
- DiAugustine RP (1974) Lung concentric laminar organelle. Hydrolase activity and compositional analysis. *J Biol Chem* 249:584-593.
- Diaz-Troya S, Perez-Perez ME, Florencio FJ, Crespo JL (2008) The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* 4:851-865.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42.
- Dunn WA, Jr. (1990) Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* 110:1923-1933.
- Edinger AL, Thompson CB (2003) Defective autophagy leads to cancer. *Cancer Cell* 4:422-424.
- Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, Seliger B, Pettersson RF, Collins VP (1991) Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res* 51:2164-2172.
- Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7:663-698.
- Eshleman JS, Carlson BL, Mladek AC, Kastner BD, Shide KL, Sarkaria JN (2002) Inhibition of the mammalian target of rapamycin sensitizes U87 xenografts to fractionated radiation therapy. *Cancer Res* 62:7291-7297.
- Fas SC, Fritzsche B, Suri-Payer E, Kramer PH (2006) Death receptor signaling and its function in the immune system. *Curr Dir Autoimmun* 9:1-17.
- Feng WY, Liu FT, Patwari Y, Agrawal SG, Newland AC, Jia L (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* 121:332-340.
- Fengsrud M, Roos N, Berg T, Liou W, Slot JW, Seglen PO (1995) Ultrastructural and immunocytochemical characterization of autophagic vacuoles in isolated hepatocytes: effects of vinblastine and asparagine on vacuole distributions. *Exp Cell Res* 221:504-519.
- Fingar DC, Blenis J (2004) Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 23:3151-3171.
- Fink SL, Cookson BT (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 73:1907-1916.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Fulda S, Meyer E, Debatin KM (2002a) Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* 21:2283-2294.
- Fulda S, Wick W, Weller M, Debatin KM (2002b) Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat Med* 8:808-815.
- Galluzzi L, Kroemer G (2008) Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell* 135:1161-1163.

- Gellerich FN, Trumbeckaite S, Opalka JR, Seppet E, Rasmussen HN, Neuhoff C, Zierz S (2000) Function of the mitochondrial outer membrane as a diffusion barrier in health and diseases. *Biochem Soc Trans* 28:164-169.
- Geng J, Klionsky DJ (2008) The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep* 9:859-864.
- Glaser T, Weller M (2001) Caspase-dependent chemotherapy-induced death of glioma cells requires mitochondrial cytochrome c release. *Biochem Biophys Res Commun* 281:322-327.
- Golfischer S, Kikkawa Y, Hoffman L (1968) The demonstration of acid hydrolase activities in the inclusion bodies of type II alveolar cells and other lysosomes in the rabbit lung. *J Histochem Cytochem* 16:102-109.
- Gozuacik D, Kimchi A (2004) Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23:2891-2906.
- Green DR (2005) Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121:671-674.
- Greijer AE, van der Wall E (2004) The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* 57:1009-1014.
- Gupta T, Sarin R (2002) Poor-prognosis high-grade gliomas: evolving an evidence-based standard of care. *Lancet Oncol* 3:557-564.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Harris CC (1996) p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* 17:1187-1198.
- He C, Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43:67-93.
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352:997-1003.
- Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI (2003) Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15178-15183.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776.
- Hermisson M, Klumpp A, Wick W, Wischhusen J, Nagel G, Roos W, Kaina B, Weller M (2006) O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *J Neurochem* 96:766-776.
- Hetschko H, Voss V, Senft C, Seifert V, Prehn JH, Kogel D (2008) BH3 mimetics reactivate autophagic cell death in anoxia-resistant malignant glioma cells. *Neoplasia* 10:873-885.
- Holmquist GP, Ashley T (2006) Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution. *Cytogenet Genome Res* 114:96-125.
- Huang DC, Tschopp J, Strasser A (2000) Bcl-2 does not inhibit cell death induced by the physiological Fas ligand: implications for the existence of type I and type II cells. *Cell Death Differ* 7:754-755.
- Huang J, Klionsky DJ (2007) Autophagy and human disease. *Cell Cycle* 6:1837-1849.
- Huang WP, Klionsky DJ (2002) Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Struct Funct* 27:409-420.
- Hulleman E, Helin K (2005) Molecular mechanisms in gliomagenesis. *Adv Cancer Res* 94:1-27.
- Ichimura K, Schmidt EE, Miyakawa A, Goike HM, Collins VP (1998) Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes Chromosomes Cancer* 22:9-15.
- Ichimura K, Bolin MB, Goike HM, Schmidt EE, Moshref A, Collins VP (2000a) Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res* 60:417-424.
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, Noda T, Ohsumi Y (2000b) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408:488-492.
- Igney FH, Krammer PH (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2:277-288.
- Iwamaru A, Kondo Y, Iwado E, Aoki H, Fujiwara K, Yokoyama T, Mills GB, Kondo S (2007) Silencing mammalian target of rapamycin signaling by small interfering RNA enhances rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells. *Oncogene* 26:1840-1851.
- Jaattela M (2002) Programmed cell death: many ways for cells to die decently. *Ann Med* 34:480-488.

- Jaattela M (2004) Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* 23:2746-2756.
- Jacobson BH, Caldwell B, Kulling FA (1997a) Comparison of hiking stick use on lateral stability while balancing with and without a load. *Percept Mot Skills* 85:347-350.
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC (1997b) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88:347-354.
- Jang JH, Surh YJ (2003) Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function. *Biochem Pharmacol* 66:1371-1379.
- Janus TJ, Kyritsis AP, Forman AD, Levin VA (1992) Biology and treatment of gliomas. *Ann Oncol* 3:423-433.
- Jensen RL (2006) Hypoxia in the tumorigenesis of gliomas and as a potential target for therapeutic measures. *Neurosurg Focus* 20:E24.
- Jiang H, Gomez-Manzano C, Aoki H, Alonso MM, Kondo S, McCormick F, Xu J, Kondo Y, Bekele BN, Colman H, Lang FF, Fueyo J (2007) Examination of the therapeutic potential of Delta-24-RGD in brain tumor stem cells: role of autophagic cell death. *J Natl Cancer Inst* 99:1410-1414.
- Jiang Z, Zheng X, Rich KM (2003) Down-regulation of Bcl-2 and Bcl-xL expression with bispecific antisense treatment in glioblastoma cell lines induce cell death. *J Neurochem* 84:273-281.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J* 19:5720-5728.
- Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 150:1507-1513.
- Kamnasaran D (2009) Stem cells and models of astrocytomas. *Clin Invest Med* 32:E166-179.
- Kang MH, Reynolds CP (2009) Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 15:1126-1132.
- Karlbom AE, James CD, Boethius J, Cavenee WK, Collins VP, Nordenskjold M, Larsson C (1993) Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10. *Hum Genet* 92:169-174.
- Kaufmann SH, Earnshaw WC (2000) Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 256:42-49.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.
- Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y (2001) Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 152:519-530.
- Kim J, Klionsky DJ (2000) Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 69:303-342.
- Kim J, Scott SV, Klionsky DJ (2000) Alternative protein sorting pathways. *Int Rev Cytol* 198:153-201.
- Kim JY, Ahn HJ, Ryu JH, Suk K, Park JH (2004) BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *J Exp Med* 199:113-124.
- Kim R, Emi M, Tanabe K (2006) Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer Chemother Pharmacol* 57:545-553.
- Kimmelman AC, Ross DA, Liang BC (1996) Loss of heterozygosity of chromosome 10p in human gliomas. *Genomics* 34:250-254.
- Kimura S, Noda T, Yoshimori T (2007) Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* 3:452-460.
- Kirchhoff H, Maass C, Runge M, Franz B, Schmidt R, Quentmeier H, Muhlradt PF (1992) Tetrazolium [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] reduction by mycoplasmas. *Int J Syst Bacteriol* 42:506-508.
- Kleihues P, Ohgaki H (2000) Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. *Toxicol Pathol* 28:164-170.
- Kleihues P, Soylemezoglu F, Schauble B, Scheithauer BW, Burger PC (1995) Histopathology, classification, and grading of gliomas. *Glia* 15:211-221.
- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:215-225; discussion 226-219.
- Klionsky DJ (2005) The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci* 118:7-18.

- Klionsky DJ (2007) Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:931-937.
- Klionsky DJ, Emr SD (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290:1717-1721.
- Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, Baba M, Baehrecke EH, Bahr BA, Ballabio A, Bamber BA, Bassham DC, Bergamini E, Bi X, Biard-Piechaczyk M, Blum JS, Bredesen DE, Brodsky JL, Brumell JH, Brunk UT, Bursch W, Camougrand N, Cebollero E, Cecconi F, Chen Y, Chin LS, Choi A, Chu CT, Chung J, Clarke PG, Clark RS, Clarke SG, Clave C, Cleveland JL, Codogno P, Colombo MI, Coto-Montes A, Cregg JM, Cuervo AM, Debnath J, Demarchi F, Dennis PB, Dennis PA, Deretic V, Devenish RJ, Di Sano F, Dice JF, Difiglia M, Dinesh-Kumar S, Distelhorst CW, Djavaheri-Mergny M, Dorsey FC, Droge W, Dron M, Dunn WA, Jr., Duszenko M, Eissa NT, Elazar Z, Esclatine A, Eskelinen EL, Fesus L, Finley KD, Fuentes JM, Fueyo J, Fujisaki K, Galliot B, Gao FB, Gewirtz DA, Gibson SB, Gohla A, Goldberg AL, Gonzalez R, Gonzalez-Estevez C, Gorski S, Gottlieb RA, Haussinger D, He YW, Heidenreich K, Hill JA, Hoyer-Hansen M, Hu X, Huang WP, Iwasaki A, Jaattela M, Jackson WT, Jiang X, Jin S, Johansen T, Jung JU, Kadowaki M, Kang C, Kelekar A, Kessel DH, Kiel JA, Kim HP, Kimchi A, Kinsella TJ, Kiselyov K, Kitamoto K, Knecht E, et al. (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4:151-175.
- Ko CH, Shen SC, Yang LY, Lin CW, Chen YC (2007) Gossypol reduction of tumor growth through ROS-dependent mitochondria pathway in human colorectal carcinoma cells. *Int J Cancer* 121:1670-1679.
- Kogel D, Reimertz C, Mech P, Poppe M, Fruhwald MC, Engemann H, Scheidtmann KH, Prehn JH (2001) Dlk/ZIP kinase-induced apoptosis in human medulloblastoma cells: requirement of the mitochondrial apoptosis pathway. *Br J Cancer* 85:1801-1808.
- Kolluri SK, Zhu X, Zhou X, Lin B, Chen Y, Sun K, Tian X, Town J, Cao X, Lin F, Zhai D, Kitada S, Luciano F, O'Donnell E, Cao Y, He F, Lin J, Reed JC, Satterthwait AC, Zhang XK (2008) A short Nur77-derived peptide converts Bcl-2 from a protector to a killer. *Cancer Cell* 14:285-298.
- Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S (2005) The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* 5:726-734.
- Kourtis N, Tavernarakis N (2009) Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death Differ* 16:21-30.
- Krajewski S, Krajewska M, Ehrmann J, Sikorska M, Lach B, Chatten J, Reed JC (1997) Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1, and Bax in tumors of central and peripheral nervous system origin. *Am J Pathol* 150:805-814.
- Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, Weller M, Schackert G (2007) Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 130:2596-2606.
- Krings T, Reinges MH, Erberich S, Kemeny S, Rohde V, Spetzger U, Korinth M, Willmes K, Gilsbach JM, Thron A (2001) Functional MRI for presurgical planning: problems, artefacts, and solution strategies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70:749-760.
- Kroemer G, Martin SJ (2005) Caspase-independent cell death. *Nat Med* 11:725-730.
- Kroemer G, Jaattela M (2005) Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 5:886-897.
- Kroemer G, Levine B (2008) Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:1004-1010.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87:99-163.
- Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G (2005) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2:1463-1467.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lavrik IN, Golks A, Krammer PH (2005) Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 115:2665-2672.
- Lefranc F, Kiss R (2006) Autophagy, the Trojan horse to combat glioblastomas. *Neurosurg Focus* 20:E7.
- Lei X, Chen Y, Du G, Yu W, Wang X, Qu H, Xia B, He H, Mao J, Zong W, Liao X, Mehrpour M, Hao X, Chen Q (2006) Gossypol induces Bax/Bak-independent activation of apoptosis and cytochrome c release via a conformational change in Bcl-2. *Faseb J* 20:2147-2149.
- Leist M, Jaattela M (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:589-598.

- Lessene G, Czabotar PE, Colman PM (2008) BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 7:989-1000.
- Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323-331.
- Levine B (2007) Cell biology: autophagy and cancer. *Nature* 446:745-747.
- Levine B, Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6:463-477.
- Levine B, Yuan J (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 115:2679-2688.
- Levine B, Deretic V (2007) Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 7:767-777.
- Levine B, Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132:27-42.
- Levine B, Kroemer G (2009) Autophagy in aging, disease and death: the true identity of a cell death impostor. *Cell Death Differ* 16:1-2.
- Li LY, Luo X, Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412:95-99.
- Lian J, Wu X, He F, Karnak D, Tang W, Meng Y, Xiang D, Ji M, Lawrence TS, Xu L (2010) A natural BH3 mimetic induces autophagy in apoptosis-resistant prostate cancer via modulating Bcl-2-Beclin1 interaction at endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ*.
- Liu G, Kelly WK, Wilding G, Leopold L, Brill K, Somer B (2009) An open-label, multicenter, phase I/II study of single-agent AT-101 in men with castrate-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 15:3172-3176.
- Liu X, Dai S, Zhu Y, Marrack P, Kappler JW (2003) The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity* 19:341-352.
- Lockshin RA, Zakeri Z (2004) Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2405-2419.
- Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120:237-248.
- MacFarlane M, Williams AC (2004) Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep* 5:674-678.
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G (2007a) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:741-752.
- Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G (2007b) Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *Embo J* 26:2527-2539.
- Majeski AE, Dice JF (2004) Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2435-2444.
- Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146:3-15.
- Martinou JC, Desagher S, Antonsson B (2000) Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat Cell Biol* 2:E41-43.
- Matsushita M, Suzuki NN, Obara K, Fujioka Y, Ohsumi Y, Inagaki F (2007) Structure of Atg5-Atg16, a complex essential for autophagy. *J Biol Chem* 282:6763-6772.
- Maurer U, Charvet C, Wagman AS, Dejardin E, Green DR (2006) Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell* 21:749-760.
- Meijer AH, van der Sar AM, Cunha C, Lamers GE, Laplante MA, Kikuta H, Bitter W, Becker TS, Spaink HP (2008) Identification and real-time imaging of a myc-expressing neutrophil population involved in inflammation and mycobacterial granuloma formation in zebrafish. *Dev Comp Immunol* 32:36-49.
- Meijer AJ, Codogno P (2004) Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2445-2462.
- Meijer AJ, Codogno P (2006) Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease. *Mol Aspects Med* 27:411-425.
- Melendez A, Neufeld TP (2008) The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story. *Development* 135:2347-2360.
- Meng Y, Tang W, Dai Y, Wu X, Liu M, Ji Q, Ji M, Pienta K, Lawrence T, Xu L (2008) Natural BH3 mimetic (-)-gossypol chemosensitizes human prostate cancer via Bcl-xL inhibition accompanied by increase of Puma and Noxa. *Mol Cancer Ther* 7:2192-2202.
- Merrill JE, Jonakait GM (1995) Interactions of the nervous and immune systems in development, normal brain homeostasis, and disease. *Faseb J* 9:611-618.

- Mirimanoff RO, Gorlia T, Mason W, Van den Bent MJ, Kortmann RD, Fisher B, Reni M, Brandes AA, Curschmann J, Villa S, Cairncross G, Allgeier A, Lacombe D, Stupp R (2006) Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 24:2563-2569.
- Mizushima N (2007) Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21:2861-2873.
- Mizushima N, Yoshimori T, Levine B (2010) Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140:313-326.
- Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T (2002) Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct* 27:421-429.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451:1069-1075.
- Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhiya T, Ohsumi Y, Yoshimori T (2001) Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* 152:657-668.
- Mohamed N, Li J, Ferreira CS, Little SF, Friedlander AM, Spitalny GL, Casey LS (2004) Enhancement of anthrax lethal toxin cytotoxicity: a subset of monoclonal antibodies against protective antigen increases lethal toxin-mediated killing of murine macrophages. *Infect Immun* 72:3276-3283.
- Morel C, Carlson SM, White FM, Davis RJ (2009) Mcl-1 integrates the opposing actions of signaling pathways that mediate survival and apoptosis. *Mol Cell Biol* 29:3845-3852.
- Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y (2007) Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 130:165-178.
- Nelson JS, Tsukada Y, Schoenfeld D, Fulling K, Lamarche J, Peress N (1983) Necrosis as a prognostic criterion in malignant supratentorial, astrocytic gliomas. *Cancer* 52:550-554.
- Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X (2003) Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 17:1475-1486.
- Noda T, Ohsumi Y (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* 273:3963-3966.
- Oberstein A, Jeffrey PD, Shi Y (2007) Crystal structure of the Bcl-XL-Bcl-1 peptide complex: Bcl-1 is a novel BH3-only protein. *J Biol Chem* 282:13123-13132.
- Ohgaki H (2005) Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology* 25:1-7.
- Ohgaki H, Kleihues P (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109:93-108.
- Ohgaki H, Kleihues P (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170:1445-1453.
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282:24131-24145.
- Paoluzzi L, Gonen M, Gardner JR, Mastrella J, Yang D, Holmlund J, Sorensen M, Leopold L, Manova K, Marcucci G, Heaney ML, O'Connor OA (2008) Targeting Bcl-2 family members with the BH3 mimetic AT-101 markedly enhances the therapeutic effects of chemotherapeutic agents in in vitro and in vivo models of B-cell lymphoma. *Blood* 111:5350-5358.
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122:927-939.
- Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ, Codogno P (2000) Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem* 275:992-998.
- Petiot A, Pattingre S, Arico S, Meley D, Codogno P (2002) Diversity of signaling controls of macroautophagy in mammalian cells. *Cell Struct Funct* 27:431-441.
- Petros AM, Nettesheim DG, Wang Y, Olejniczak ET, Meadows RP, Mack J, Swift K, Matayoshi ED, Zhang H, Thompson CB, Fesik SW (2000) Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. *Protein Sci* 9:2528-2534.
- Pettmann B, Henderson CE (1998) Neuronal cell death. *Neuron* 20:633-647.
- Puthalakath H, Strasser A (2002) Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ* 9:505-512.

- Rainov NG, Soling A, Heidecke V (2006) Novel therapies for malignant gliomas: a local affair? *Neurosurg Focus* 20:E9.
- Richter BW, Duckett CS (2000) The IAP proteins: caspase inhibitors and beyond. *Sci STKE* 2000:pe1.
- Rieux-Laucat F, Fischer A, Deist FL (2003) Cell-death signaling and human disease. *Curr Opin Immunol* 15:325-331.
- Ronellenfisch MW, Brucker DP, Burger MC, Wolking S, Tritschler F, Rieger J, Wick W, Weller M, Steinbach JP (2009) Antagonism of the mammalian target of rapamycin selectively mediates metabolic effects of epidermal growth factor receptor inhibition and protects human malignant glioma cells from hypoxia-induced cell death. *Brain* 132:1509-1522.
- Ruiz i Altaba A, Sanchez P, Dahmane N (2002) Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer* 2:361-372.
- Sabharwal A, Middleton MR (2006) Exploiting the role of O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) in cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 6:355-363.
- Salzman M (1990) Malignant glioma management. *Neurosurg Clin N Am* 1:49-63.
- Saraste A, Pulkki K (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45:528-537.
- Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C (1993) Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 14:131-136.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17:1675-1687.
- Schmid D, Dengjel J, Schoor O, Stevanovic S, Munz C (2006) Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens. *J Mol Med* 84:194-202.
- Schweitzer T, Vince GH, Herbold C, Roosen K, Tonn JC (2001) Extraneural metastases of primary brain tumors. *J Neurooncol* 53:107-114.
- Semenza GL (2001) Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease. *Pediatr Res* 49:614-617.
- Shapiro JR (2002) Genetic alterations associated with adult diffuse astrocytic tumors. *Am J Med Genet* 115:194-201.
- Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 6:1221-1228.
- Shintani T, Klionsky DJ (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 306:990-995.
- Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, St Clair R, Baljevic M, White I, Jin DK, Chadburn A, Murphy AJ, Valenzuela DM, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, D'Angelica M, Kemeny N, Lyden D, Rafii S (2008) CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest* 118:2111-2120.
- Shoemaker AR, Oleksijew A, Bauch J, Belli BA, Borre T, Bruncko M, Deckwirth T, Frost DJ, Jarvis K, Joseph MK, Marsh K, McClellan W, Nellans H, Ng S, Nimmer P, O'Connor JM, Oltersdorf T, Qing W, Shen W, Stavropoulos J, Tahir SK, Wang B, Warner R, Zhang H, Fesik SW, Rosenberg SH, Elmore SW (2006) A small-molecule inhibitor of Bcl-XL potentiates the activity of cytotoxic drugs in vitro and in vivo. *Cancer Res* 66:8731-8739.
- Silke J, Hawkins CJ, Ekert PG, Chew J, Day CL, Pakusch M, Verhagen AM, Vaux DL (2002) The anti-apoptotic activity of XIAP is retained upon mutation of both the caspase 3- and caspase 9-interacting sites. *J Cell Biol* 157:115-124.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63:5821-5828.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432:396-401.
- Sini P, James D, Chresta C, Guichard S Simultaneous inhibition of mTORC1 and mTORC2 by mTOR kinase inhibitor (2010) AZD8055 induces autophagy and cell death in cancer cells. *Autophagy* 6.
- Smith JS, Jenkins RB (2000) Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. *Front Biosci* 5:D213-231.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.
- Steinbach JP, Weller M (2004) Apoptosis in gliomas: molecular mechanisms and therapeutic implications. *J Neurooncol* 70:245-254.

- Steinbach JP, Wolburg H, Klumpp A, Weller M (2005) Hypoxia sensitizes human malignant glioma cells towards CD95L-induced cell death. *J Neurochem* 92:1340-1349.
- Stram Y, Kuzntzova L (2006) Inhibition of viruses by RNA interference. *Virus Genes* 32:299-306.
- Stupp R, van den Bent MJ, Hegi ME (2005a) Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep* 5:198-206.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005b) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987-996.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446.
- Tagscherer KE, Fassl A, Campos B, Farhadi M, Kraemer A, Bock BC, Macher-Goeppinger S, Radlwimmer B, Wiestler OD, Herold-Mende C, Roth W (2008) Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 27:6646-6656.
- Tait SW, Green DR (2008) Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene* 27:6452-6461.
- Takeuchi H, Kondo Y, Fujiwara K, Kanzawa T, Aoki H, Mills GB, Kondo S (2005) Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer Res* 65:3336-3346.
- Tanida I, Nishitani T, Nemoto T, Ueno T, Kominami E (2002) Mammalian Apg12p, but not the Apg12p.Apg5p conjugate, facilitates LC3 processing. *Biochem Biophys Res Commun* 296:1164-1170.
- Thompson AR, Doelling JH, Suttangkakul A, Vierstra RD (2005) Autophagic nutrient recycling in Arabidopsis directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant Physiol* 138:2097-2110.
- Thorburn A (2008) Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis* 13:1-9.
- Tohma Y, Gratas C, Van Meir EG, Desbaillets I, Tenan M, Tachibana O, Kleihues P, Ohgaki H (1998) Necrogenesis and Fas/APO-1 (CD95) expression in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:239-245.
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228:1440-1443.
- Tsukada M, Ohsumi Y (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333:169-174.
- Vajkoczy P, Menger MD (2004) Vascular microenvironment in gliomas. *Cancer Treat Res* 117:249-262.
- Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2002) HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 277:445-454.
- Vogler M, Weber K, Dinsdale D, Schmitz I, Schulze-Osthoff K, Dyer MJ, Cohen GM (2009) Different forms of cell death induced by putative BCL2 inhibitors. *Cell Death Differ* 16:1030-1039.
- von Deimling A, von Ammon K, Schoenfeld D, Wiestler OD, Seizinger BR, Louis DN (1993) Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol* 3:19-26.
- von Deimling A, Eibl RH, Ohgaki H, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Kleihues P, Chung RY, Wiestler OD, Seizinger BR (1992a) p53 mutations are associated with 17p allelic loss in grade II and grade III astrocytoma. *Cancer Res* 52:2987-2990.
- von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Hoell T, Chung RY, Martuza RL, Schoenfeld DA, Yasargil MG, Wiestler OD, et al. (1992b) Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 77:295-301.
- Wang J, Whiteman MW, Lian H, Wang G, Singh A, Huang D, Denmark T (2009) A non-canonical MEK/ERK signaling pathway regulates autophagy via regulating Beclin 1. *J Biol Chem* 284:21412-21424.
- Wang JL, Liu D, Zhang ZJ, Shan S, Han X, Srinivasula SM, Croce CM, Alnemri ES, Huang Z (2000) 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* 97:7124-7129.

- Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1996) Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 6:217-223; discussion 223-214.
- Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 175:231-237.
- Willis SN, Adams JM (2005) Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 17:617-625.
- Wischhusen J, Naumann U, Ohgaki H, Rastinejad F, Weller M (2003) CP-31398, a novel p53-stabilizing agent, induces p53-dependent and p53-independent glioma cell death. *Oncogene* 22:8233-8245.
- Wolter KG, Wang SJ, Henson BS, Wang S, Griffith KA, Kumar B, Chen J, Carey TE, Bradford CR, D'Silva NJ (2006) (-)-gossypol inhibits growth and promotes apoptosis of human head and neck squamous cell carcinoma in vivo. *Neoplasia* 8:163-172.
- Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B (1987) Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:6899-6903.
- Wright CW, Duckett CS (2005) Reawakening the cellular death program in neoplasia through the therapeutic blockade of IAP function. *J Clin Invest* 115:2673-2678.
- Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, Ong CN, Codogno P, Shen HM Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 285:10850-10861.
- Wunderlich W, Fialka I, Teis D, Alpi A, Pfeifer A, Parton RG, Lottspeich F, Huber LA (2001) A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal/lysosomal compartment. *J Cell Biol* 152:765-776.
- Yarden Y, Ullrich A (1988) Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 57:443-478.
- Yorimitsu T, Klionsky DJ (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2:1542-1552.
- Yu L, Strandberg L, Lenardo MJ (2008) The selectivity of autophagy and its role in cell death and survival. *Autophagy* 4:567-573.
- Zamzami N, Kroemer G (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:67-71.
- Zhao Q, Morales CR (2000) Identification of a novel sequence involved in lysosomal sorting of the sphingolipid activator protein prosaposin. *J Biol Chem* 275:24829-24839.
- Ziegler DS, Kung AL, Kieran MW (2008) Anti-apoptosis mechanisms in malignant gliomas. *J Clin Oncol* 26:493-500.
- Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ (2000) Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* 14:391-396.

## VIII ANHANG

## PLASMIDKARTEN

## 9.1 TANDEM PLASMID: MRFP-EGFP/TFLC3

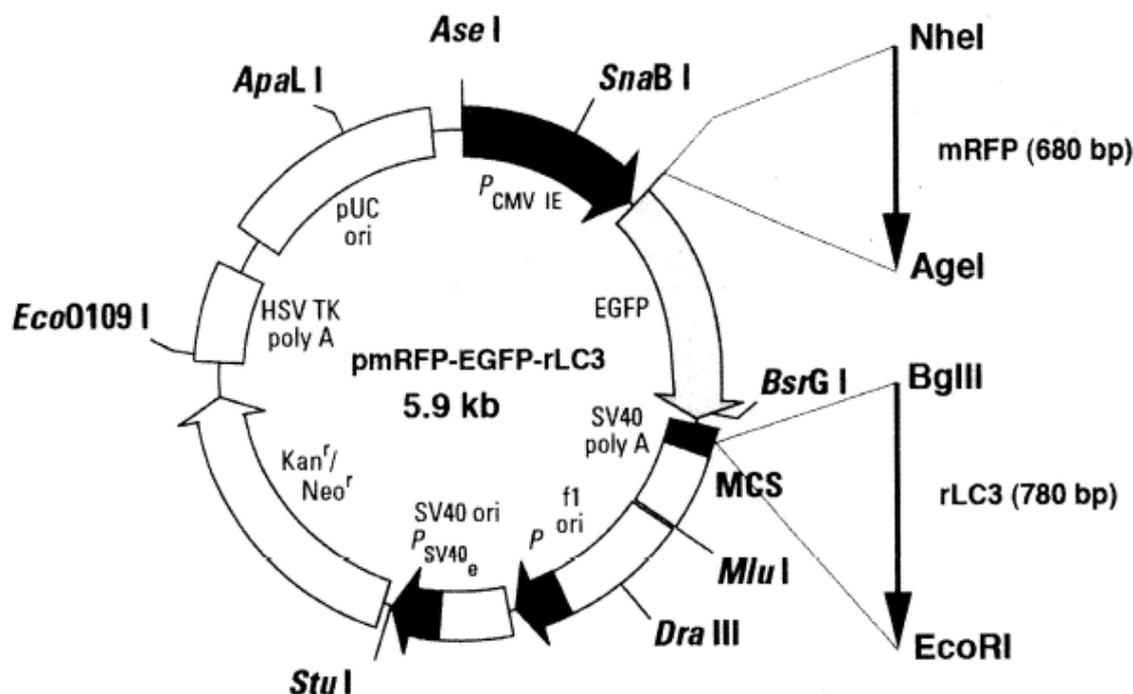


Abbildung 42: Generierung des Tandem-Plasmids mRFP-EGFP/tFLC3

cDNA LC3 wurde über RT-PCR aus Ratten Gehirn total cDNA mit Hilfe der Primer LC3-s5 (5'-CCGGAATTCATGCCGTCCGAGAAGACCTT-3') und LC3-rc3 (5'-TTCGAATTCGCACCATAGTTATAAACCAG-3') generiert

und über die EcoRI-Schnittstelle in den Expressions-Vektor pCI-neo (Promega, Madison, WI) ligiert.

Für die Herstellung von pGFP-LC3, wurde die LC3 cDNA über die Schnittstellen Bg/II und EcoRI in den pEGFP-C1-Vektor ligiert (Clontech Laboratories).

Das mRFP-Plasmid wurde aus der Arbeitsgruppe Dr. Roger Y. Tsien (Univ. California, San Diego) bezogen.

Die Konstruktion des Tandem Plasmids mRFP-GFP-LC3 wurde über die Schnittstellen NheI und Agel des 5' und 3' Endes die mRFP cDNA über die Primer

NheI\_mRFP (5'-GAGAGCTAGCGGCCACCATGGCCTCCTCCGAGGAC-3') und

Agel\_mRFP (5'-GAGAACCGGTCCACCACCGGCGGTGGAGTGGCG-3') in

das pEGFP-LC3 Plamid ligiert.

## 9.2 PLASMID: TOPO-MCL-1

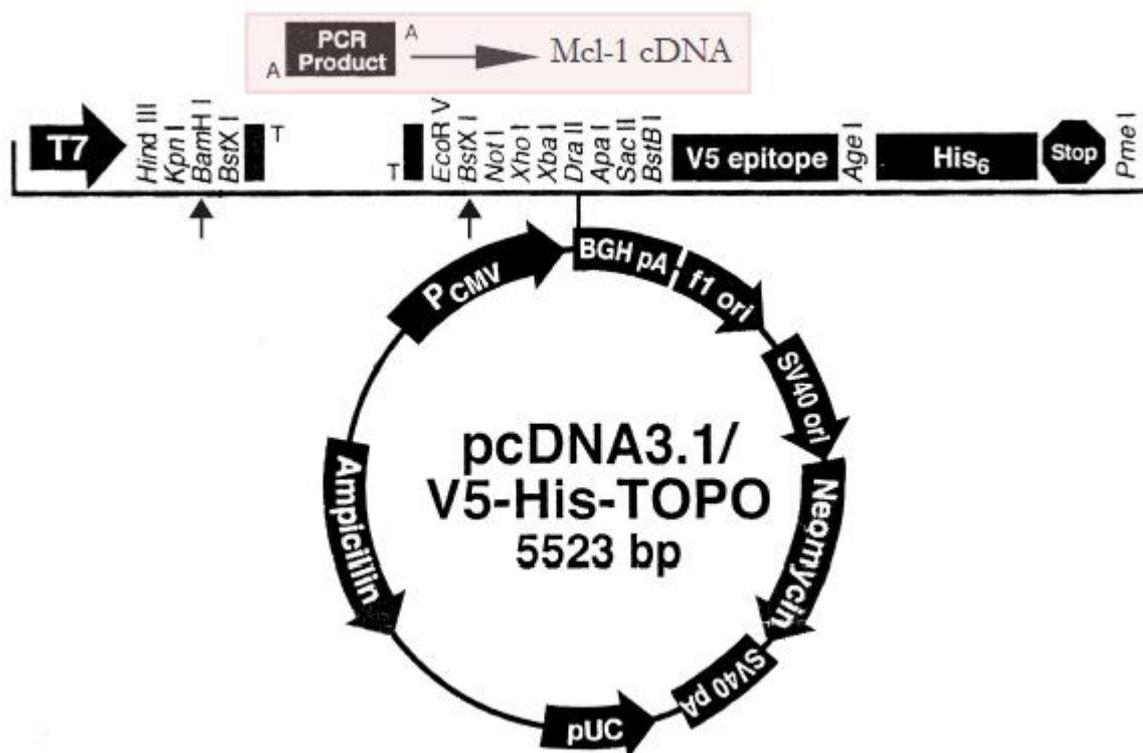


Abbildung 42: Generierung des Plasmids TOPO-Mcl-1

CMV Promotor: 209-863

T7 Promotor: 863-882

Multiple Cloning Site: 902-1019

TOPO-Cloning Site: 953-954

V5 Epitop: 1020-1061

Polyhistidin Tag: 1071-1088

BGH rev Priming Site: 1111-1128

BGH-Polyadenylationssignal: 1110-1324

f1 origin of replication: 1387-1800

SV40 Promotor: 1865-2190

Neomycin Resistenz: 2226-3020

SV40-Polyadenylationssignal:3039-3277

pUC: 3709-4382

Ampicillin Resistenz: 4527-5387

Über die Schnittstellen BamH I und BstX I wurde die humane Mcl-1 cDNA in den Vektor pcDNA 3.1/V5-His-TOPO ligiert.

9.3 PLASMID: EGFP-LC3

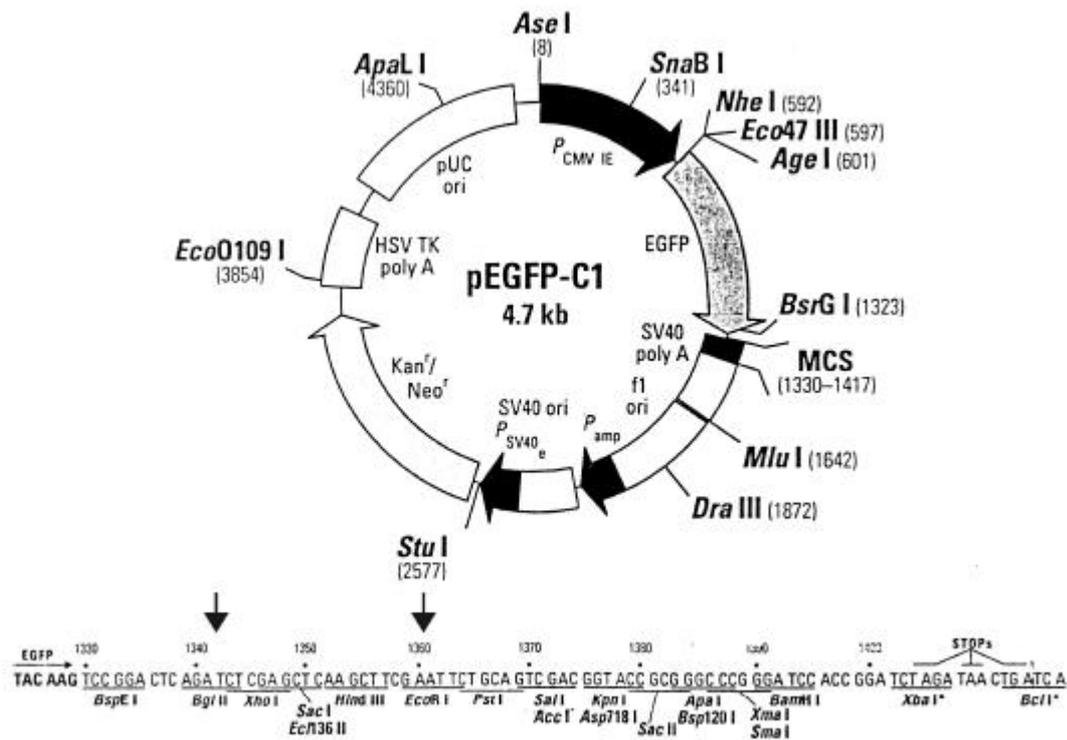


Abbildung 43: Generierung des Plasmids EGFP-LC3

cDNA LC3 wurde generiert über RT-PCR aus Ratten Gehirn total cDNA mit Hilfe der Primer LC3-s5 (5'-CCGGAATTCATGCCGTCCGAGAAGACCTT-3') und LC3-rc3 (5'-TTCGAATTCGCACCATAGTTATAAACCAG-3') und über die EcoRI-Schnittstelle in den Expressions Vektor pCI-neo (Promega, Madison, WI) ligiert. Für die Herstellung von pGFP-LC3, wurde die LC3 cDNA über die Schnittstellen Bg/II und EcoRI in den pEGFP-C1-Vektor ligiert (Clontech Laboratories).

## X ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3-MA	3-Methyladenin
%	Prozent
(-)-Goss	(-)-Gossypol
(+)-Goss	(+)-Gossypol
°C	Grad Celsius
A	Ampère
Abb.	Abbildung
Ac-DEVD-AMC	Acetyl-DEVD-7-amido-methylcoumarin
add	auffüllen auf
$\alpha$	alpha
$\emptyset$	Leervektor
AIF	engl. Apoptosis inducing Factor
APAF	engl. Apoptotic protease-activating factor-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATG	engl. autophagy related
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$	beta
BAF	Bafilomycin A1
Bak	Bcl-2 antagonist/killer
Bax	Bcl-assoziertes x-Protein
BCA	Bichinonsäure
Bcl-2	engl. B-Cell Lymphoma-2
Bcl-xL	engl. Bcl-2 like 1
Beclin1	engl. coiled-coil, myosin-like BCL2 interacting protein
BH	Bcl-2-Homologie
Bid	engl. BH3 interacting domain death agonist
BME	Basal Medium Eagle
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl. Bovine serum albumin)
ca.	Circa
Caspase	Cysteinyl-aspartat-spezifische Protease
CDK4	engl. cyclin-dependent-kinase 4,
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[3-Cholamidopropyl]-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cy	Cyanin
Cyt c	Cytochrom c

Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin 5'-Triphosphat
DD	engl. Death domain
DEAE	Diethylaminoethyl
DED	engl. Death Effector Domain
DEVVD	Tetrapeptid: Asp-Glu-Val-Asp
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium DMSO
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
ECL	engl. Enhanced Chemiluminiscence
EDTA	Ethylentetraminessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraminessigsäure
Endo G	Endonuklease G
et al.	et alli(und andere)
FACS	engl. Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	engl. Fas-associated Death Domain
FASL	engl. FAS ligand
FCS	Fötale Kälberserum
FLUOS	5(6)-Carboxy-fluorescein-N-hydroxysuccinimidester
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	engl. green fluorescent protein
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
h	engl. Hour, Stunde
HCl	Salzsäure (Chlorwasserstoff)
HEPES	N-(2-Hydroxyethylen)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich Peroxidase
IAP	engl. Inhibitor of apoptosis,
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KD	Knockdown
kDa	Kilodalton
Kon	Kontrolle
L	Liter
LC3-	engl. light chain 3

M	Molar
Mcl-1	Myeloid-cell-leukemia 1
MDM2	engl. mouse double minute 2
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MGMT	Methylguanin-methyl-Transferase
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	engl. multiplicity of infection, Multiplizität der Infektion
mRFP	engl. monomeric red fluorescent protein
mTOR	engl. mammalian target of rapamycin
mTORC1	engl. mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC2	engl. mammalian target of rapamycin complex 2
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazoliumbromid
MZ-	Mainz-
n =	Stichprobenumfang, Anzahl an unabhängigen Experimenten
n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NuBCP-9	Nur77-derived Bcl-2-converting peptide with 9 amino acids
OD	optische Dichte
P =	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pH	pontus hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Ionenkonzentration)
PDGFR	engl. plateled derived growth factor receptor
Phospho-	phosphoryliert
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositol 3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluorid
PTEN	engl. phosphatase and tensin homologue deleted from chromosom 10
Puro	Puromycin
p53	engl. tumorsuppressor gene 53
RFP	engl. red fluorescent protein
rictor	engl. rapamycin-insensitive companion of mTOR
RISC	engl. RNA-Induced Silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz

RNase	Ribonuklease
scr	engl. scrambled
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
siRNA	Small Interfering RNAs
Smac/DIABLO	engl. second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low pI
sqstm	engl. sequestosome
STS	Staurosporin
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMRM	Tetramethylrhodaminmethylester
TMZ	Temozolomid
TORC1	engl. target of rapamycin complex 1
TORC2	engl. target of rapamycin complex 2
U	Unit(s)
u. a.	unter anderem
ÜE	Überexpression
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	engl. Vascular Endothelial Growth Factor
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotential
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{L}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar

---

## XI LEBENSLAUF

### ***Persönliche Daten***

*Name* Valerie Voss  
*Geburtsdatum* 11.08.1981  
*Geburtsort* Darmstadt  
*Familienstand* ledig  
*Mutter* Jutta Voss, geb. Raschke  
*Vater* Martin Voss

### ***Schulischer Werdegang***

1987-1991 *Grundschule:* Gersprenzschule Reinheim  
1991-1993 *Förderstufe:* Kurt-Schumacher-Schule Reinheim  
1993-2001 *Gymnasium:* Albert-Einstein-Schule Groß-Bieberau  
2001 *Abitur*

### ***Akademischer Werdegang:***

2001-2006 Technische Universität Darmstadt (Biologie)  
2007 *Diplomarbeit:* Technische Universität Darmstadt, Klinikum der J. W. Goethe Universität Frankfurt am Main, Experimentelle Neurochirurgie unter der Leitung von Herrn Priv. Doz. Dr. Donat Kögel; Thema: Apoptose-Resistenz in Glioblastomen: Molekulare Mechanismen und neue Therapien, Note: sehr gut  
2007 Dipl. Biologin, Note: sehr gut  
2007 *Promotionsstudiengang* (Biologie), Klinikum der J. W. Goethe Universität Frankfurt am Main, Experimentelle Neurochirurgie unter der Leitung von Herrn Priv. Doz. Dr. Donat Kögel; Thema: Die Rolle von Bcl-2 Familienmitgliedern für die Zelltod-Resistenz von malignen Gliomen  
2010 Abschluss der Promotion

Frankfurt am Main, den 26.07.2010

### 11.1 AKADEMISCHE LEHRER

Meine akademischen Lehrer, waren folgende:

Buschinger, Dancker, Dencher, Engelkamp, Friedl, Galuske, Gassen, Giersch, Göringer, Himstedt, Holstein, Kletzin, Kluge, Kober, Nixdorff, Langner, Layer, Lindner, Lüttge, Pfeifer, Reggelin, Schwabe-Kratochwil, Wollenweber

### 11.2 PUBLIKATIONSLISTE

2008 Hetschko\*, H., Voss\*, V., Senft, C., Seifert, V., Prehn, J. H., and Kögel, D. (2008). BH3 mimetics reactivate autophagic cell death in anoxia-resistant malignant glioma cells. *Neoplasia* 10, 873-885. (\*geteilte Erstautorenschaft)

2008 Hetschko, H., Voss, V., Seifert, V., Prehn, J. H., and Kögel, D. (2008). Upregulation of DR5 by proteasome inhibitors potently sensitizes glioma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Febs J* 275, 1925-1936.

2008 Hetschko, H., Voss, V., Horn, S., Seifert, V., Prehn, J. H., and Kögel, D. (2008). Pharmacological inhibition of Bcl-2 family members reactivates TRAIL-induced apoptosis in malignant glioma. *J Neurooncol* 86, 265-272.

2010 Gessler, F., Voss, V., Dutzmann, S., Seifert, V., Gerlach, R., and Kögel, D. Inhibition of tissue factor/protease-activated receptor-2 signaling limits proliferation, migration and invasion of malignant glioma cells. *Neuroscience* 165, 1312-1322.

2010 Voss, V., Senft, C., Lang, V., Ronellenfisch, M. W., Steinbach, J. P., Seifert, V., and Kögel, D. (2010). The Pan-Bcl-2 Inhibitor (-)-Gossypol Triggers Autophagic Cell Death in Malignant Glioma. *Mol Cancer Res*.

Eingereicht:

2010 Gessler, F., Voss, V., Dutzmann, S., Seifert, V., Gerlach, R., and Kögel  
Knockdown of TFPI-2 promotes migration and invasion of glioma cells

### 11.3 KONGRESSBEITRÄGE

#### 11.3.1 POSTERPRÄSENTATIONEN

- 4 & 9/2008 ICNF-Symposium, „Neuroscience in Frankfurt“, J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main  
BH3 mimetics re activate caspase-independent cell death in anoxia-resistant malignant glioma  
Hetschko H., Voss V., Senft C., Seifert V., Prehn J., Kögel D.
- 9/2008 16<sup>th</sup> Euroconference on Apoptosis & 5<sup>th</sup> Swiss Apoptosis Meeting, European Cell Death Organisation ECDO Bern, Schweiz  
BH3 mimetics re-activate caspase-independent cell death in anoxia-resistant malignant glioma.  
Voss V, Hetschko H, Senft C, Seifert V, Acker T, Prehn J, Kögel D
- 12/2009 Brain Tumor 2008, Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin Berlin  
Reactivation of cell death by (-)-gossypol in apoptosis-resistant malignant glioma.  
Voss V, Hetschko H, Senft C, Seifert V, Prehn J, Kögel D.
- 5/2009 60<sup>th</sup> annual meeting of German Society of Neurosurgery (DGNC), Joint Meeting with the Benelux and Bulgaria, Münster  
Reactivation of cell death by (-)-gossypol in apoptosis-resistant malignant glioma  
Voss V, Hetschko H, Senft C, Hetschko H, Seifert V, Kögel D.
- 9/2009 17<sup>th</sup> Euroconference on Apoptosis, European Cell Death Organisation ECDO, Paris, Frankreich  
Pan-Bcl-2 inhibitors induce autophagic cell death in malignant glioma  
Voss V, Hetschko H, Senft C, Hetschko H, Seifert V, Kögel D.
- 10/2009 DGNC Sektionstagung Neuroonkologie, Bonn  
Die Rolle von Tissue Factor für Zellmigration und Zellinvasion von niedrig- und hochgradigen Gliomen  
Gessler F, Dützmann S, Voss V, Seifert V, Gerlach R, Kögel D.
- 11/2009 1. UCT Science Day, J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main  
Pan-Bcl-2 inhibitors induce autophagic cell death in malignant glioma  
Voss V, Hetschko H, Senft C, Hetschko H, Seifert V, Kögel D.

- 11/2009 1. UCT Science Day, J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main  
Inhibition of Tissue Factor signaling limits proliferation, migration and invasion  
in low-grade and high-grade glioma cells  
Gessler F, Voss V, Dützm ann S, Seifert V, Gerlach R, Kögel D.
- 3/2010 International Brain Tumor Research Conference, Seeheim-Jugenheim  
Knockdown of mTOR sensitizes glioma cells to autophagic cell death induced by  
(-)-Gossypol, but not to apoptosis  
Voss V., Ronellenfitsch Michael W., Steinbach Joachim P., Seifert V., Kögel D.
- 3/2010 International Brain Tumor Research Conference, Seeheim-Jugenheim Wild type  
IDH1 protects glioma cells against oxidative stress and cell death: Implications  
for therapy resistance and clinical outcome  
Kögel D., Capper D., Mohrenz Isabelle V., Weißert S., Voss V., Putsch S., Balss  
J., Langhans Claus D., Okun Jürgen G., von Deimling A.
- 3/2010 International Brain Tumor Research Conference, Seeheim-Jugenheim Tissue  
Factor/PAR-2 signalling in glioma – important pathway in tumour cell migration  
and invasion  
Gessler F., Dützm ann S., Voss V., Seifert V., Gerlach R., Kögel D.

## XII DANKSAGUNG

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an meinen Doktorvater PD Dr. Donat Kögel richten, Dein Zuspruch, all die wertvollen Ratschläge und Deine konstruktive Kritik haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Nicht nur in fachspezifischen, sondern auch in privaten Gesprächen sorgten Deine Ideen und Ratschläge für einen Denkanstoß und vorallem Unterstützung.

Auch Ihnen Frau Prof. Süß möchte ich herzlich für Ihre Betreuung und Übernahme meiner thematischen Fragestellung danken.

Ferner möchte ich Ihnen Herrn Prof. Zimmermann und Ihnen Herrn Prof. Kössl für die Begutachtung meiner Doktorarbeit danken.

Vielen lieben Dank an das gesamte Labor der Experimentellen Neurochirurgie.

Steffi Chang, Michael Klinkenberg, Isabelle Mohrenz, Maike Priester, Stafanie Rakel, Jakob Weissenberger und Andreas Zymny, und auch ehemaligen Mitgliedern wie Katerina Copanaki und Holger Hetschko möchte ich für eure Unterstützung, anregende Gespräche bei köstlichem Kaffee, und für die schöne Zusammenarbeit in freundschaftlicher Atmosphäre danken. Ein besonderer Dank an Dich liebe Hildegard König für Deine stetige Hilfsbereitschaft im Labor und für die leckeren selbstgebackenen Köstlichkeiten.

Ein großes Dankeschön möchte ich an all meine Freunde richten - für Euren Rückhalt, für Eure Hilfe und dafür, dass Ihr immer ein offenes Ohr für mich habt.

Mein herzlichster Dank gebührt Dir Florian Geßler. Du unterstützt mich mit Deiner unausschöpfbaren Liebe, Geduld und Kraft. Du begleitest mich mit Rat und Tat zur jeglichen Lebensstunde und inspirierst mich mit Deinen liebevollen Worten immer wieder von neuem. Danke für das Lesen meiner Arbeit und deine unermüdlichen konstruktiven Anregungen, an denen Du niemals gespart hast. Es ist so schön, dass es Dich gibt.

Zum Schluss möchte ich Dir lieber Mama und Dir liebem Papa gemeinsam mit Dir meinem lieben Bruder für Eure grenzenlose und uneingeschränkte, liebevolle Unterstützung danken. Ihr habt immer meine innere Ausgeglichenheit und Stärke aufgebaut und gefestigt. Ohne Euch wäre ich nie in dieser glücklichen Position, da ich mich immer auf Euch verlassen kann, wann immer ich Euch brauche. Papa, Du kannst das alles leider nicht mehr mit erleben, aber ich weiß, Du wärest stolz auf mich.

