

Medizinische Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. H. Einsele

Abteilung für Molekulare Innere Medizin

Leiter: Prof. Dr. H. Wajant

**Molekulare Mechanismen der nicht-apoptotischen
Signaltransduktion des Todesliganden TRAIL
(Apo-2 Ligand)**

Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Stella Schaffstein

aus Kronberg im Taunus

Würzburg, März 2010

Referent: Professor Dr. Harald Wajant, Molekulare Innere Medizin
Ko-Referent: Professor Dr. Ralf Bargou, Hämatologie/Internistische Onkologie

Dekan: Professor Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

24. November 2010

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	- 1 -
1.1 Bedeutung der Apoptose	- 1 -
1.2 Mechanismen der Apoptoseinduktion	- 2 -
1.2.1 Todesrezeptoren und der extrinsische Signalweg	- 3 -
1.2.2 Das Mitochondrium und der intrinsische Signalweg	- 5 -
1.2.3 Caspasen: Effektormoleküle des apoptotischen Programms	- 7 -
1.3 TRAIL und seine Rezeptoren	- 9 -
1.4 Apoptoseinduktion durch TRAIL	- 12 -
1.5 Nicht-apoptotische Signaltransduktion durch TRAIL	- 15 -
1.5.1 TRAIL und die Aktivierung von NFκB	- 16 -
1.5.1.1 NFκB reguliert die TRAIL-vermittelte Apoptose	- 18 -
1.5.1.2 TRAIL aktiviert NFκB	- 21 -
1.5.2 TRAIL und die Aktivierung von MAP Kinasen	- 22 -
1.6 TRAIL als potentielles Tumorthapeutikum.....	- 25 -
1.7 Zielsetzung.....	- 27 -
2 Materialien	- 29 -
2.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien	- 29 -
2.2 Puffer und Lösungen	- 30 -
2.3 Antikörper	- 32 -
2.4 Zelllinien	- 34 -
3 Experimentalmethoden.....	- 35 -
3.1 Kultivierung und Konservierung humaner Zelllinien.....	- 35 -

3.2 Zytotoxizitätsnachweis	36 -
3.3 IL-8-ELISA	37 -
3.3.1 Zellaussaat und Stimulation	37 -
3.3.2 Detektion.....	37 -
3.4 Westernblotanalysen	39 -
3.4.1 Herstellung von Zelllysaten	39 -
3.4.2 SDS-PAGE	40 -
3.4.3 Westernblot.....	41 -
3.4.4 Immundetektion immobilisierter Proteine.....	41 -
4 Ergebnisse	43 -
4.1 Überexpression von Bcl-XL schützt Colo 357 Zellen vor TRAIL-vermittelter Apoptose	43 -
4.2 TRAIL aktiviert in Colo 357 Zellen die MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 unabhängig vom apoptotischen Zelltod, aber abhängig von der Caspaseaktivität	46 -
4.3 In SV 80 Zellen erfolgt die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung Caspase-unabhängig	48 -
4.4 Sowohl in Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen als auch in Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen wird Caspase-8 nach TRAIL-Stimulation aktiviert	52 -
4.4.1 Caspase-3 wird nur in Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen nach TRAIL-Stimulation aktiviert	53 -
4.5 TRAIL induziert IL-8 in Colo 357 Zellen	55 -
4.5.1 Die Inhibition von JNK hemmt die TRAIL-vermittelte IL-8-Produktion in Colo 357 Zellen .	58 -
4.5.2 Die Inhibition des Proteasoms hemmt die TRAIL-vermittelte IL-8-Produktion in Colo 357 Zellen und sensitiviert die Zellen für Apoptose	61 -
5 Diskussion	65 -
5.1 Überexpression von Bcl-XL schützt Colo 357 Zellen vor TRAIL-vermittelter Apoptose	65 -
5.2 TRAIL aktiviert in Colo 357 Zellen die MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 unabhängig vom apoptotischen Zelltod, aber abhängig von der Caspaseaktivität	67 -
5.3 Die Caspaseabhängigkeit der TRAIL-vermittelten JNK-Aktivierung ist zelltypspezifisch	69 -
5.4 Sowohl in Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen als auch in Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen wird Caspase-8 nach TRAIL-Stimulation aktiviert	71 -

5.5 TRAIL induziert IL-8 in Colo 357 Zellen.....	- 73 -
5.5.1 Die Aktivierung von JNK ist nicht essentiell für den apoptotischen Zelltod, aber für die TRAIL-vermittelte IL-8-Produktion in Colo 357 Zellen	- 74 -
5.5.2 Die Aktivierung von NFκB ist essentiell für die TRAIL-vermittelte IL-8-Produktion in Colo 357 Zellen	- 75 -
5.6 Ausblick	- 80 -
6 Zusammenfassung.....	- 82 -
7 Summary	- 85 -
8 Abkürzungen	- 88 -
9 Literaturverzeichnis.....	- 92 -
10 Abbildungsverzeichnis.....	- 109 -

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der Apoptose

Der Begriff Apoptose bezeichnet den sog. programmierten Zelltod, der auch unter physiologischen Bedingungen auftritt. Diese Form von Zelltod ist ein unverzichtbarer Prozess für mehrzellige Organismen zur Herstellung eines Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und -elimination. So gehen bei einem gesunden Erwachsenen täglich ca. 10 Millionen Zellen durch Apoptose zugrunde (Curtin & Cotter, 2003). Neben der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase spielt die Apoptose eine wichtige Rolle bei der Regulation des Immunsystems sowie der Immunsurveillance von Tumorzellen und virusinfizierter Zellen. Aus einer Störung apoptotischer Signalwege können demnach Autoimmunerkrankungen, Immundefizienz und Krebs resultieren. Von der Apoptose abzugrenzen ist die Nekrose, welche die pathophysiologische Form von Zelltod darstellt.

Trotz der fundamentalen Bedeutung der Apoptose zeigt der historische Rückblick auf die Entwicklung der Apoptoseforschung einen trägen Beginn. Erste Hypothesen über eine Form von natürlichem Zelltod gehen bereits zurück auf Studien von Carl Vogt im Jahre 1842. Über die Dauer eines ganzen Jahrhunderts verblieb dieses Erkenntnis aber auf der Ebene morphologischer Beschreibungen wie z.B. durch Rudolph Virchow (1858) oder Walther Flemming (1885). Einen Meilenstein für die Erkenntnis der bedeutenden Funktion von Apoptose setzte schließlich Glücksmann 1951, der den Zusammenhang der Apoptose mit der Embryogenese und Entwicklung von Vertebraten erkannte (Lockshin & Zakeri, 2001; Glücksmann, 1951). Hieraus erwuchs neues Interesse für das Forschungsgebiet der Apoptose.

Der Begriff Apoptose (gr. = „Herabfallen“) wurde 1972 zum ersten Mal benutzt zur Beschreibung einer Art von Zelltod, die sich morphologisch von der Nekrose differenzieren lässt. Zu den charakteristischen morphologischen Veränderungen

apoptotischer Zellen gehören Schrumpfung der Zelle, Vakuolenbildung im Zytoplasma, Kondensierung des Chromatins, Fragmentierung des Zellkerns und schließlich die Entstehung sog. Apoptosekörperchen. Später wurde herausgefunden, dass im Rahmen der Apoptose das Lipid Phosphatidylserin auf der äußeren Zellmembran exponiert wird. Dies führt letztlich dazu, dass die apoptotische Zelle von Phagozyten erkannt und eliminiert wird, ohne im umgebenden Gewebe, im Ggs. zur Nekrose, eine Entzündung zu induzieren (Fadok et al., 2000). Die Identifikation spezifischer morphologischer, biochemischer und auch genetischer Vorgänge während der Apoptose führte nach den anfänglich stagnierenden Studien schließlich zu einer explosionsartigen Ausweitung des Forschungsfeldes.

1.2 Mechanismen der Apoptoseinduktion

Die Apoptose kann durch eine Vielzahl von Mechanismen ausgelöst werden. Eine anschauliche Einteilung bietet die Differenzierung zwischen dem extrinsischen (Ashkenazi & Dixit, 1998) und dem intrinsischen (Green & Reed, 1998) Signalweg. So beruht der extrinsische Signalweg auf der Induktion der Apoptose durch Stimulation von Membranrezeptoren. Binden Zytokine der TNF (tumor necrosis factor)-Liganden-Familie, zu denen z.B. TRAIL, FasL oder TNF α gehören, an ihre korrespondierenden Rezeptoren, erfolgt eine intrazelluläre Signalkaskade bis zur Auslösung des apoptotischen Zelltods. In vivo werden diese Liganden von Immunzellen wie T- und B-Lymphozyten oder NK-Zellen exprimiert. So spielt der extrinsische Signalweg eine wichtige Rolle für die Ausführung immunregulatorischer Funktionen. Der intrinsische Signalweg hingegen wird durch diverse Formen von Zellschädigung eingeleitet. Durch Stimuli wie Hypoxie, Radikale, Toxine, Chemotherapeutika oder Bestrahlung wird beim intrinsischen Signalweg über strukturelle Änderungen an den Mitochondrien und Freisetzung mitochondrialer Moleküle ins Zytosol der apoptotische Zelltod induziert. Außerdem wird der intrinsische Signalweg beim Fehlen von Wachstumsfaktoren und bei inadäquater Wachstumsstimulation induziert.

Unabhängig vom apoptoseauslösenden Stimulus kommt es sowohl beim extrinsischen als auch beim intrinsischen Signalweg schließlich zur Aktivierung spezifischer Proteasen, den sog. Caspasen (cysteinyll aspartate-specific proteases). Die zunächst aktivierten Initiatorcaspasen aktivieren sog. Effektorcaspasen, welche für die Spaltung verschiedener zellulärer Proteine und der DNA verantwortlich sind. Daraus resultiert letztlich das biochemisch organisierte Zugrundegehen der Zelle. Auf Einzelheiten des extrinsischen und des intrinsischen Signalweges sowie der Caspase-Kaskade soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.2.1 Todesrezeptoren und der extrinsische Signalweg

Die Induktion des extrinsischen Signalweges erfordert die Formation eines Komplexes aus Todesrezeptor und Todesligand.

Die Todesrezeptoren TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas/Apo-1/CD95, TNF-R1, DR3, DR6, p75-NGFR und EDAR bilden eine Untergruppe der TNF-Rezeptor (TNF-R)-Superfamilie (Zhou et al., 2002). Als gemeinsames Charakteristikum besitzen die Mitglieder der TNF-R-Superfamilie in ihrem extrazellulären Rezeptorteil bis zu 6 Kopien einer Cystein-reichen Domäne (CRD) (Aggarwal, 2003). Die Todesrezeptoren sind wie die anderen TNF-Rezeptoren Typ-I-Membranproteine. Das besondere Kennzeichen der Todesrezeptoren ist eine konservierte zytoplasmatische Protein-Protein-Interaktionsdomäne, die sog. Todesdomäne (death domain, DD). Dieser intrazelluläre Rezeptorteil ist bei der Transduktion des apoptotischen Signals involviert (Sartorius et al., 2001). Die TNF-Rezeptoren werden von Mitgliedern einer komplementären Familie, der TNF-Liganden-Familie, stimuliert (Bodmer et al., 2002). Die Zytokine der TNF-Liganden-Familie sind Homotrimere und werden meist als Typ-II-Membranproteine exprimiert. Allerdings sind sie auch in löslicher Form vorzufinden, beispielsweise nach proteolytischer Prozessierung der membrangebundenen Liganden oder aufgrund von alternativem Spleissen.

Bei der Interaktion zwischen Todesrezeptor und entsprechendem Liganden bindet das Ligandentramer drei Moleküle des Rezeptors und induziert die Reorganisation der

bereits vorgeformten Rezeptorkomplexe. Diese vorgeformten Rezeptorkomplexe bilden sich in Abwesenheit des zugehörigen Liganden durch Aggregation aus monomeren Rezeptoruntereinheiten über eine N-terminale Domäne der Rezeptoren, der sog. PLAD (pre-ligand-binding assembly domain) (Chan et al., 2000). In diesem präaggregierten Zustand sind die Rezeptorkomplexe inaktiv. Durch die Liganden-induzierte Reorganisation der Rezeptorkomplexe werden die Todesrezeptoren aktiviert und die intrazelluläre Signaltransduktion wird initiiert. Manche Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie, wie z.B. TRAIL-R1, können sowohl durch die lösliche als auch durch die membrangebundene Form ihres korrespondierenden Liganden aktiviert werden, während bei anderen Rezeptoren wie z.B. bei TRAIL-R2 und Fas/CD95 eine effiziente Aktivierung vorwiegend durch die membrangebundene Form erfolgt (Wajant et al., 2001).

Für die weitere Signaltransduktion der Todesrezeptoren spielt unter anderem die zytoplasmatische Todesdomäne (DD) eine essentielle Rolle (Sartorius et al., 2001). Sie dient als Andockstelle für die Rekrutierung und Aktivierung von zytoplasmatischen Adapterproteinen, welche ihrerseits eine Todesdomäne besitzen. Über homophile Wechselwirkungen bindet die DD der Adaptermoleküle an der DD des aktivierten Todesrezeptors. Weiterhin verfügen die Adapterproteine über eine sog. Todeseffektordomäne (death effector domain, DED), welche wie die DD Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. So werden DED-enthaltende Initiatorcaspasen an das Adapterprotein rekrutiert und dadurch aktiviert. Der Komplex aus Todesrezeptor, seinem korrespondierendem Liganden, dem Adapterprotein und der Initiatorcaspasen wird als death inducing signaling complex (DISC) bezeichnet. Die im Komplex aktivierten Initiatorcaspasen vermitteln durch Spaltung verschiedener Effektorcaspasen die Weiterleitung des apoptotischen Signals. Es sei darauf hingewiesen, dass die DD der Todesrezeptoren zwar in Zusammenhang mit der Apoptoseinduktion identifiziert wurde, dass sie jedoch auch nicht-apoptotische Signalwege aktiviert (Wajant, 2003a).

Die verschiedenen Todesrezeptoren weisen diverse Unterschiede bezüglich der rekrutierten Adapterproteine auf. Dies beeinflusst auch die final ausgelösten Effekte. So können je nach rekrutiertem Adapterprotein die Apoptoseinduktion dominieren oder aber nicht-apoptotische Funktionen wie z.B. die Aktivierung des NF κ B- oder des JNK-

Signalweges überwiegen. Trotz diverser Differenzen im Signalweg zwischen den einzelnen Todesrezeptoren haben alle eine essentielle Bedeutung bei der Aufrechterhaltung eines funktionsfähigen Immunsystems und bei der Beseitigung pathogener Zellen.

1.2.2 Das Mitochondrium und der intrinsische Signalweg

Der intrinsische Signalweg wird hauptsächlich durch schädliche Umwelteinflüsse wie z.B. Strahlung und Radikale oder durch Mangel an Wachstumsfaktoren induziert. In manchen Zelltypen kann er aber auch durch Todesrezeptoren in Gang gesetzt werden, um die Aktivierung von Effektorcaspasen zu verstärken. Eine zentrale Rolle beim intrinsischen Signalweg spielen die Mitochondrien, die eine strukturelle Veränderung durchlaufen und dadurch eine erhöhte Permeabilität ihrer äußeren Membran aufweisen. Der kritische Schritt ist hierbei die Translokation von Bax und/oder Bak zum Mitochondrium (Almasan & Ashkenazi, 2003). Bax/Bak sind pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie. Die Rekrutierung von Bax/Bak kann durch DNA-schädigende Agenzien über das Tumorsupressorprotein p53 oder durch andere zellschädigende Einflüsse getriggert werden. Andererseits kann die Bax/Bak-Rekrutierung auch durch Todesrezeptoren induziert werden.

Oligomerisiertes Bax/Bak führt zur Porenbildung und damit erhöhter Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran. Dies erlaubt den Austritt verschiedener pro-apoptotischer Proteine aus dem Intermembranraum des Mitochondriums ins Zytosol (Wang X, 2001). Zu den freigesetzten Mediatoren gehören Cytochrom c, second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein (SMAC/DIABLO) und die Serinprotease HtrA2/Omi.

Das freigesetzte Cytochrom c beispielsweise formiert mit APAF-1, ATP und Pro-Caspase-9 einen als Apoptosom bezeichneten Komplex, in dem die Initiatorcaspase-9 aktiviert wird (Salvesen & Renatus, 2002). Caspase-9 aktiviert dann analog zur Initiatorcaspase-8 die Effektorcaspase-3 (Shi, 2002; Wang X, 2001). Die vom Mitochondrium freigesetzten Proteine SMAC/DIABLO und HtrA2/Omi hemmen die

Caspase-inhibitorische Funktion der IAP (inhibitor of apoptosis) Proteine und fördern somit die Caspase-3-Aktivierung (van Loo et al., 2002). Zu beachten ist, dass die aktivierte Caspase-3 selbst die Initiatorcaspasen-8 und -9 zu prozessieren und zu aktivieren vermag (Engels et al., 2000), wodurch ein positiver Rückkopplungsmechanismus für die Caspaseaktivierung etabliert wird.

Um dem hohen pro-apoptotischen Potential der freigesetzten mitochondrialen Faktoren entgegen zu wirken, bedarf es einer strengen Regulation. Eine wichtige Steuerungsfunktion übernehmen hierbei die Mitglieder der Bcl-2-Familie. Diese sind charakterisiert durch den Besitz von wenigstens einer der sog. Bcl-2-Homologie (BH)-Domänen 1-4, welche ursprünglich bei dem Prototyp dieser Familie, dem Bcl-2 Protein, beschrieben wurden (Gross et al., 1999). Abhängig von ihrer BH-Domänen-Architektur haben die Mitglieder der Bcl-2-Familie pro- oder anti-apoptotisches Potential. So besitzen pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie, wie z.B. Bax oder sein Homolog Bak die Domänen BH 1-3. Ihre anti-apoptotischen Gegenspieler, wie z.B. Bcl-2 und Bcl-XL, weisen darüber hinaus eine BH-4-Domäne auf (Cory & Adams, 2002). Eine weitere Untergruppe der Bcl-2-Familie, zu der Bid, Bik, Bim, NOXA und PUMA gehören, besitzen nur die BH-3-Domäne und werden deshalb auch als BH3-„only“-Proteine bezeichnet. BH3-„only“-Proteine interagieren mit pro-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie, um deren Wirkung zu verstärken bzw. inhibieren sie die anti-apoptotischen Mitglieder Bcl-2 und Bcl-XL. Aufgrund von sowohl pro-apoptotisch als auch anti-apoptotisch wirkenden Mitgliedern in der Bcl-2-Familie bestimmt demnach das Verhältnis zwischen den beiden funktionellen Gruppen über die Auslösung des intrinsischen Signals der Apoptose.

1.2.3 Caspasen: Effektormoleküle des apoptotischen Programms

Eine zentrale Rolle sowohl im extrinsischen als auch im intrinsischen Apoptosesignalweg spielen die Caspasen. Der Begriff Caspasen (cysteinyll aspartate-specific proteases) wurde 1993 für eine Gruppe verwandter Proteasen geprägt, die eine essentielle Bedeutung sowohl in der Initiations- als auch in der Exekutionsphase der Apoptose haben (Alnemri et al., 1996). Die Familie der Caspasen von Säugetieren besteht aus 14 Mitgliedern, von denen 11 im Menschen exprimiert werden. Anhand phylogenetischer Analysen konnte die Familie in zwei Subfamilien unterteilt werden, in die sog. ICE-Subfamilie sowie die CED-3-Subfamilie (Nicholson, 1999). Obwohl die Überexpression sämtlicher Caspasen zum Tod der Zelle führt, zeichnet sich die ICE-Subfamilie dadurch aus, hauptsächlich Zytokine zu prozessieren und bei inflammatorischen Prozessen eine Rolle zu spielen. Proteine der CED-3-Subfamilie dagegen sind primär in apoptotische Signalwege involviert. Eine Eigenschaft, die alle Caspasen teilen, ist ihre außergewöhnliche Substratspezifität. So besitzen sie eine starke Präferenz für die Spaltung nach bestimmten Aspartat-Resten. Unter allen bekannten Säugerproteasen hat nur die Serinprotease Granzym B eine ähnliche Substratspezifität.

Bevor die Caspasen proteolytisch aktiv sind, müssen sie selbst zunächst aktiviert werden. Caspasen werden konstitutiv exprimiert, allerdings als inaktive Vorstufen, sog. Zymogene. Diese Pro-Caspasen besitzen verschiedene Domänen: eine N-terminale Pro-Domäne, eine große Untereinheit (17-21 kDa) und eine kleine Untereinheit (10-13 kDa) (Earnshaw, 1999). Durch verschiedenste apoptotische Stimuli wird die Aktivierung der Caspasen eingeleitet, bei der das Pro-Enzym an einem spezifischen Aspartatrest zwischen großer und kleiner Untereinheit proteolytisch prozessiert wird. In vielen Fällen wird außerdem die Pro-Domäne proteolytisch entfernt. Die enzymatisch aktive Caspase setzt sich zusammen aus 2 Heterodimeren bestehend aus jeweils einer großen und einer kleinen Untereinheit (Zhivotovsky, 2003).

Anhand der Größe der Pro-Domäne können die Pro-Caspasen in 2 Gruppen unterteilt werden, die sich auch funktionell voneinander unterscheiden. Caspasen mit kurzen Pro-Domänen (weniger als 30 AS) agieren als sog. Effektorcaspasen. Hierzu gehören die

Caspasen-3, -6 und -7. Die übrigen Caspasen weisen lange Pro-Domänen (mehr als 100 AS) auf und erfüllen die Aufgabe von sog. Initiatorcaspasen (Zhivotovsky, 2003).

Die Aktivierung der Caspasen erfolgt sequentiell im Sinne einer sog. Caspase-Kaskade, welche mit der autokatalytischen Aktivierung der Initiatorcaspasen beginnt. Die langen Pro-Domänen der Initiatorcaspasen besitzen spezielle Strukturmodule, die für die Aktivierung der Enzyme von Bedeutung sind. So ist für die Pro-Caspasen-8 und -10 der Besitz von Todeseffektordomänen (DED) charakteristisch. In den Pro-Caspasen-1, -2, -4, -5 und -9 finden sich sog. CARDs (caspase-recruitment domains) (Budihardjo et al., 1999). Nicht nur in den Prodomänen der Initiatorcaspasen sind DEDs und CARDs zu finden, sondern auch in den zugehörigen Adaptermolekülen, wodurch eine Interaktion über homophile Wechselwirkungen ermöglicht wird. Über die DEDs bzw. die CARDs erfolgt dann die für die autokatalytische Aktivierung der Caspasen notwendige Oligomerisation. So interagieren Pro-Caspase-8 und das korrespondierende Adapterprotein FADD beispielsweise über ihre jeweiligen DEDs. Dadurch wird die Pro-Caspase-8 in ihre aktive Form überführt. Analog wird Pro-Caspase-9 aktiviert, indem über CARDs die Bindung zwischen Pro-Caspase-9 und dem Adapterprotein APAF-1 vermittelt wird. Die aktivierten Initiatorcaspasen leiten das apoptotische Signal schließlich weiter, indem sie die Effektorcaspasen proteolytisch prozessieren und damit aktivieren. Die aktivierten Effektorcaspasen sind für die Spaltung essentieller zellulärer Proteine verantwortlich. Dadurch manifestieren sich letztlich die charakteristischen biochemischen und morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen. So korreliert beispielsweise die Spaltung von Integrinen mit dem Verlust von Zell-Zell-Interaktion und die Prozessierung von Lamin mit dem Phänomen der Chromatinkondensation und nukleären Schrumpfung (Hengartner, 2000). Die Anzahl der Substrate von Caspasen beläuft sich derzeit auf über 200 und die Liste steigt stetig an (Fischer et al., 2003). Unter diesen Substraten befinden sich strukturelle Proteine, Signalproteine, Regulatoren für Transkription, Translation, Zellzyklus und DNA-Reparatur, proinflammatorische Zytokine, Regulatoren von Apoptose und viele andere.

Essentielle Strukturproteine für das Zytoskelett, die durch Spaltung inaktiviert werden, sind beispielsweise Lamin und Aktin. Auch PARP (polyADP-ribose polymerase) als wichtiges Protein für DNA-Reparatur und Zellzyklusregulation wird durch Caspase-

abhängige Spaltung inaktiviert. Neben der proteolytischen Inaktivierung von Proteinen, die für die strukturelle Integrität und das Überleben der Zelle unverzichtbar sind, werden andererseits auch pro-apoptotische Proteine durch Caspase-vermittelte Spaltung aktiviert. Hierzu gehört z.B. das Enzym CAD (caspase-activated DNase). Dieses wird indirekt durch Caspase-abhängige Spaltung seines Inhibitors ICAD (inhibitor of CAD) aktiviert, um im Nukleus die DNA zu fragmentieren (Zhivotovsky, 2003).

In der terminalen Phase des Apoptoseprogramms ist unter den Caspasen insbesondere die Caspase-3 wichtig. Das Vorhandensein von aktivierter Caspase-3 im Nukleus ist essentiell für die Spaltung verschiedener nukleärer Proteine, wie PARP oder ICAD, für DNA-Fragmentation und Chromatin-Kondensation.

Trotz der essentiellen Bedeutung der Caspasen für die Ausführung des apoptotischen Programms, sei daraufhin gewiesen, dass diese Familie von Proteasen durchaus auch nicht-apoptotische Aufgaben erfüllt. So dienen Caspasen beispielsweise der Prozessierung von Zytokinen während einer Entzündung und sind in die Proliferation von T-Lymphozyten sowie die terminale Differenzierung von Keratinozyten involviert (Fadeel et al., 2000).

1.3 TRAIL und seine Rezeptoren

TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), auch bezeichnet als Apo-2 Ligand, ist ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Liganden-Familie (Wiley et al., 1995). TRAIL hat in den letzten Jahren enorme Aufmerksamkeit als potentiell tumorspezifisches Krebstherapeutikum auf sich gezogen. Denn wie kein anderes Zytokin vermag TRAIL in einer Reihe von Tumorzellen Apoptose zu induzieren, während nichttransformierte Zellen unbeschadet bleiben (Lawrence et al., 2001; Pitti et al., 1996; Wiley et al., 1995). TRAIL spielt aber nicht nur im Rahmen einer potentiellen Tumorthherapie für das Abtöten von Tumorzellen eine Rolle. Es gehört auch zu den Zytokinen für die körpereigene Tumorabwehr im Immunsystem (Takeda et al., 2002). Als immunregulatorisches Effektormolekül wird TRAIL in aktivierten

Natürlichen Killerzellen, Monozyten, zytotoxischen T-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert (Lu et al., 2002; Johnsen et al., 1999; Griffith et al., 1999; Kayagaki et al., 1999) und ist dadurch für die Elimination von transformierten sowie virusinfizierten Zellen unverzichtbar.

TRAIL/Apo-2L konnte 1995 basierend auf einer Sequenzhomologie zu FasL/Apo-1L und TNF identifiziert und geklont werden (Pitti et al., 1996; Wiley et al., 1995). Wie andere Mitglieder der TNF-Liganden-Familie wird TRAIL primär als Typ-II-Membranprotein von ca. 33-35 kDa exprimiert. Dieses setzt sich zusammen aus einer extrazellulären TNF-ähnlichen Domäne, einer transmembranären Helix sowie einer kleinen zytoplasmatischen Domäne. Die extrazelluläre TNF-ähnliche Domäne von TRAIL kann von der Zelloberfläche durch proteolytische Abspaltung freigesetzt werden (Wiley et al. 1995). Dadurch existiert zumindest im Menschen auch eine lösliche Form von TRAIL (Mariani et al., 1998). Bei den Zytokinen der TNF-Liganden-Familie kann die Bioaktivität der membrangebundenen und der daraus entstehenden löslichen Form zum Teil stark variieren. Für TRAIL wurde nachgewiesen, dass es in löslicher Form über den TRAIL-R2 nur mit limitierter Effizienz Apoptose auslöst, während es über TRAIL-R1 effektiv apoptotische Signale induziert. Membranständiges TRAIL dagegen vermag beide Todesrezeptoren von TRAIL mit vergleichbarer Effizienz zu stimulieren (Wajant et al., 2001; Muhlenbeck et al., 2000). TRAIL, wie auch die anderen Mitglieder der TNF-Liganden-Familie, besitzt eine typische β -Sandwich Struktur und bildet Homotrimere. Ein glockenförmiges Homotrimer wird durch die extrazelluläre Domäne von TRAIL gebildet (Hymowitz et al., 2000). So können drei Rezeptormoleküle jeweils an den Grenzflächen zwischen zwei Untereinheiten des Homotrimers gebunden werden (Hymowitz et al., 1999). Beim löslichen TRAIL findet sich außerdem ein Insertions-Loop von 12-16 AS in der Nähe des N-Terminus (Cha et al., 1999). Eine Besonderheit von TRAIL ist der Besitz eines Zink-Ions. Bisher ist TRAIL das einzige Mitglied der TNF-Liganden-Familie, das ein Metallion enthält. Das Zink-Ion wird durch einzelne ungepaarte Cystein-Reste (Cys 230) der jeweiligen Monomere an der trimeren Grenzfläche gebunden. Es ist essentiell für die trimere Stabilität und die Bioaktivität von TRAIL, was anhand von Punktmutationen von Cys 230 zu Alanin, Glycin oder Serin nachgewiesen werden konnte. Denn diese Mutationen führen zu monomeren oder dimeren, biologisch inaktiven Formen von TRAIL (Bodmer et al., 2000). Der

einzigartige strukturelle Aufbau von TRAIL steht also auch in Zusammenhang mit der Zytotoxizität dieses Zytokins.

TRAIL bindet an fünf verschiedene Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie. Davon sind zwei pro-apoptotische Todesrezeptoren und drei anti-apoptotische Rezeptoren. Die Rezeptoren TRAIL-R1 (DR4) (Pan et al., 1997a) und TRAIL-R2 (DR5, KILLER, TRICK2) (Pan et al., 1997a; Sheridan et al., 1997; Walczak et al., 1997) sind membranständige Todesrezeptoren. Sie besitzen die für Todesrezeptoren typische zytoplasmatische Todesdomäne (DD) und können nach Stimulation mit TRAIL apoptotische Signale weiterleiten. Wie alle Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie sind auch TRAIL-R1 und TRAIL-R2 Typ-I-Membranproteine, die eine extrazelluläre Cystein-reiche-Domäne (CRD) aufweisen. Die Rezeptoren TRAIL-R3 (DcR1, TRID, LIT) (MacFarlane et al., 1997; Sheridan et al., 1997; Pan et al., 1997b) und TRAIL-R4 (DcR2, TRUNND) (Degli-Esposti et al., 1997; Marsters et al., 1997) weisen in ihrer extrazellulären CRD eine signifikante Homologie zu TRAIL-R1 und TRAIL-R2 auf. Allerdings besitzt TRAIL-R4 nur eine verkürzte, funktionell inaktive Todesdomäne und dem Rezeptor TRAIL-R3 fehlt der zytoplasmatische Rezeptorteil völlig. TRAIL-R3 ist stattdessen über einen Glykophosphatidylinositol-Rest (GPI) in der Zellmembran verankert. Beide Rezeptoren, TRAIL-R3 und TRAIL-R4, sind daher zwar befähigt, TRAIL zu binden, sie können aber keine apoptotischen Signale weiterleiten. Es scheint viel eher, als ob diese Rezeptoren gegenüber TRAIL-R1 und TRAIL-R2 antagonistisch wirken und somit die Funktion von sog. „Decoy-Rezeptoren“ einnehmen. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression sowohl von TRAIL-R3 als auch von TRAIL-R4 eine Resistenz gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose zur Folge hat, wohingegen die Entfernung dieser Rezeptoren von der Zelloberfläche zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber der zytotoxischen Aktivität von TRAIL führt (Wu et al., 2000; Sheridan et al., 1997). Die Mechanismen, die den anti-apoptotischen Effekten von TRAIL-R3 und TRAIL-R4 zugrunde liegen, sind derzeit noch nicht genau geklärt. TRAIL-R3 und TRAIL-R4 könnten die TRAIL-induzierte Apoptose einerseits inhibieren, indem sie mit den Todesrezeptoren um die Bindung von TRAIL konkurrieren. Eine andere Erklärung wäre, dass TRAIL-R3 und TRAIL-R4 in einer dominant-negativen Art und Weise die Bindung eines heteromeren Komplexes mit TRAIL-R1 und TRAIL-R2 eingehen. Es sei daraufhingewiesen, dass die Sensitivität

von Zellen für TRAIL-vermittelte Apoptose nicht generell mit der Expression dieser Decoy-Rezeptoren korreliert (Kim et al., 2000). Obwohl ein Schutz vor TRAIL-induzierter Apoptose durch Überexpression von TRAIL-R3 und TRAIL-R4 nachgewiesen werden konnte, hat sich das Ausmaß der Expression von Decoy-Rezeptoren nicht als Hauptfaktor bei der Determination der TRAIL-Sensitivität erwiesen.

Der fünfte Rezeptor, an den TRAIL bindet, ist der lösliche Rezeptor Osteoprotegerin (OPG) (Emery et al., 1998). OPG wurde ursprünglich im Rahmen der Osteoklastendifferenzierung als Bindungspartner für das Mitglied der TNF-Liganden-Familie RANKL (receptor activator of NF κ B Ligand) (Simonet et al., 1997) entdeckt. Erst später wurde auch eine Interaktion zwischen TRAIL und OPG erkannt (Emery et al., 1998), wobei die Affinität von TRAIL zu diesem Rezeptor in Relation zu den übrigen TRAIL-Rezeptoren gering ist. Über die physiologische Bedeutung dieser relativ schwachen Interaktion zwischen TRAIL und OPG ist bis dato zumindest bekannt, dass über OPG die TRAIL-induzierte Apoptose in Osteoblasten inhibiert wird (Emery et al., 1998).

Im Folgenden wird der Mechanismus der apoptotischen sowie der nicht-apoptotischen Signaltransduktion von TRAIL über seine korrespondierenden Todesrezeptoren TRAIL-R1/DR4 und TRAIL-R2/DR5 näher erläutert.

1.4 Apoptoseinduktion durch TRAIL

Die TRAIL-vermittelte Apoptose erfolgt über die Bindung an die Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 (Pan et al., 1997a, b). Die TRAIL-Todesrezeptoren und der Fas/CD95-Todesrezeptor aktivieren die apoptotische Maschinerie auf gleiche Art und Weise.

Der erste Schritt sowohl zur Aktivierung apoptotischer als auch nicht-apoptotischer Signalwege ist die bereits beschriebene Reorganisation des PLAD-abhängig-präaggregierten Rezeptorkomplexes (Chan et al., 2000). Die Bindung von TRAIL

induziert durch diese Reorganisation eine Oligomerisierung trimerer Rezeptoreinheiten zu größeren Komplexen und bringt damit den Rezeptorkomplex in einen Zustand, der die Formation des sog. DISC (death inducing signaling complex) erleichtert. Der DISC besteht neben dem Liganden-Rezeptor-Komplex aus dem Adapterprotein FADD (Fas-associated death domain) sowie der Pro-Caspase-8 (Kischkel et al., 2000).

FADD besitzt eine C-terminale Todesdomäne (death domain, DD), über welche es an der Todesdomäne von Todesrezeptoren wie TRAIL-R1, TRAIL-R2 oder Fas binden kann. Am N-Terminus verfügt FADD über eine Todeseffektordomäne (death effector domain, DED) (Boldin et al., 1996; Chinnaiyan et al., 1996). Wie die Todesdomäne vermittelt auch die DED Protein-Protein-Interaktionen durch homophile Wechselwirkungen. So wird die Pro-Caspase-8 schließlich in den DISC rekrutiert, indem sie mittels zweier eigener N-terminaler DEDs an die von FADD bindet (Kischkel et al., 2000; Kischkel et al., 1995).

Infolge der Liganden-induzierten DISC-Bildung werden mehrere Pro-Caspase-8-Moleküle in enge Nachbarschaft gebracht. Dieser auch als „induced-proximity-activation“ bezeichnete Schritt führt zur transkatalytischen und autokatalytischen Spaltung und damit Aktivierung der Pro-Caspase-8 infolge Dimerisierung der Moleküle im DISC (Boatright et al., 2003). Im Zuge dieser Aktivierung kommt es zur Überführung der Caspase-8-Vorstufe in ein reifes Caspase-8-Heterotetramer durch autoproteolytische Prozessierung in die p18- und die p10-Untereinheit (Donepudi et al., 2003; Boatright et al., 2003). Der erste Spaltungsvorgang erfolgt zwischen der p18- und der p10-Untereinheit am Pro-Caspase-8-Molekül. Gebunden am FADD-Adapterprotein verbleibt ein p43/41-Intermediat, welches die DEDs sowie die p18-Untereinheit beinhaltet. Die p10-Untereinheit verbleibt in nicht-kovalenter Verbindung mit dem p43/41-Molekül. Der zweite Spaltungsvorgang erfolgt dann zwischen den DEDs und der p18-Untereinheit (Wajant, 2003a). Dadurch wird schließlich das enzymatisch aktive p18/p10-Heterotetramer vom DISC freigesetzt und kann als aktivierte Initiatorcaspase proteolytisch agieren.

Neben der Caspase-8 wird auch Caspase-10 in den TRAIL-DISC rekrutiert (Kischkel et al., 2001), doch wie ausgeprägt die Bedeutung dieser Caspase bei der

Apoptoseinduktion ist, erfordert noch nähere Untersuchungen (Sprick et al., 2002; Kischkel et al., 2001).

Zu nennen sei des Weiteren das in Zusammenhang mit dem IFN- γ -induzierten Zelltod identifizierte Adapterprotein DAP3 (death associated protein 3). Auch dieses ist befähigt, an die Todesdomäne von Todesrezeptoren wie TRAIL-R1 und TRAIL-R2 sowie an die von FADD zu binden und dadurch Caspase-8 zu aktivieren (Miyazaki, 2001).

Nach der Caspase-8-Aktivierung ist der weitere Ablauf der apoptotischen Signaltransduktion zelltypabhängig (Ozoren & El Deiry, 2002) (siehe hierzu Bild 1). In manchen Zelltypen, bezeichnet als Typ-I-Zellen, vermag die aktivierte Caspase-8 in der Folge Effektorcaspasen wie vor allem Caspase-3 direkt zu aktivieren. Diese Aktivierung erfolgt mit einer Effizienz, die für die Auslösung des apoptotischen Zelltods ausreicht (Wajant, 2003a). In anderen Zelltypen dagegen, sog. Typ-II-Zellen, erfordert die Aktivierung von Effektorcaspasen zunächst eine Amplifizierung des DISC-Signals (Wajant, 2003a). Dieser Verstärkungsvorgang bedient sich des intrinsischen Signalweges über das Mitochondrium. So triggert in Typ-II-Zellen die Initiatorcaspase-8 die apoptotische Aktivierung des Mitochondriums durch Spaltung des Bcl-2-Familienmitgliedes Bid (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Das entstandene Spaltprodukt tBid (truncated Bid) vermag dann Bax/Bak in der äußeren Mitochondrienmembran zu oligomerisieren (Korsmeyer et al., 2000), wodurch über Porenbildung in der mitochondrialen Membran der Austritt der pro-apoptotischen Mediatoren Cytochrom c, SMAC/DIABLO und HtrA2/Omi ermöglicht wird (Wang X, 2001). Der Effekt der initialen DISC-vermittelten Caspase-8-Aktivierung wird in den Typ-II-Zellen demnach amplifiziert, indem über Moleküle des Mitochondriums die Caspase-3-Aktivierung in dem Maße verstärkt wird, dass der apoptotische Zelltod resultiert (siehe hierzu Bild 1).

Experimentell kann eine Unterscheidung zwischen Typ-I- und Typ-II-Zellen nachgewiesen werden, indem Bcl-2 oder Bcl-XL in den betreffenden Zellen überexprimiert wird (Scaffidi et al., 1998). In Typ-I-Zellen hat die Überexpression von Bcl-2 oder Bcl-XL keinen protektiven Effekt auf die Apoptoseinduktion. Typ-II-Zellen dagegen werden durch diese Proteine aufgrund der blockierten Freisetzung pro-apoptotischer mitochondrialer Faktoren vor Apoptose geschützt.

Im Rahmen des beschriebenen TRAIL-vermittelten apoptotischen Signalweges werden auf mehreren Ebenen negative Rückkopplungsmechanismen mit anti-apoptotischer Wirkung induziert. So wird der pro-apoptotische Signalweg unter Kontrolle gehalten, was für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase essentiell ist.

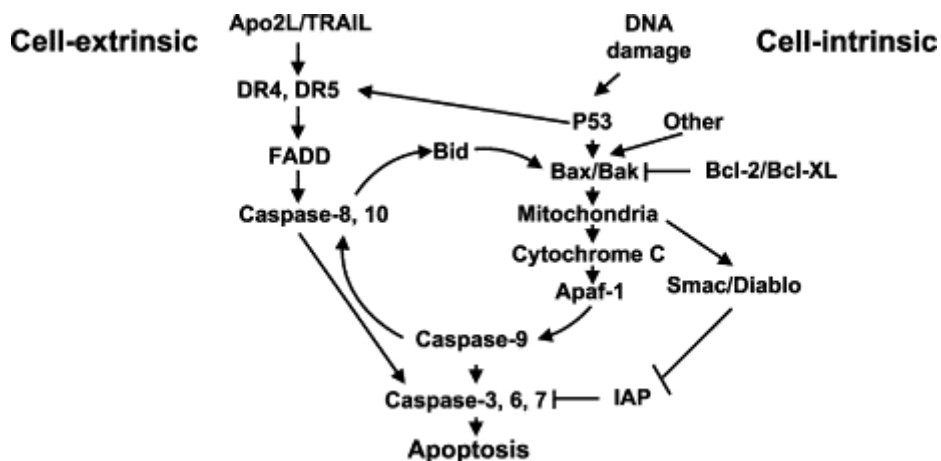


Bild 1: Aktivierung des extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalweges durch TRAIL (Almasan & Ashkenazi, 2003). In sog. Typ-I-Zellen ist die Induktion des extrinsischen Signalweges ausreichend für die Auslösung von Apoptose. In sog. Typ-II-Zellen ist eine Amplifikation des DISC-Signals über den intrinsischen Signalweg notwendig, um Apoptose zu induzieren. Über die Caspase-8-vermittelte Spaltung von Bid sind der extrinsische und der intrinsische Signalweg miteinander verknüpft. Bcl-XL kann die TRAIL-induzierte Apoptose in Typ-II-Zellen durch Inhibition des intrinsischen Signalweges hemmen.

1.5 Nicht-apoptotische Signaltransduktion durch TRAIL

Neben der fundamentalen Bedeutung von TRAIL als Auslöser des apoptotischen Zelltods konnten in mehreren Studien auch nicht-apoptotische Funktionen dieses Zytokins nachgewiesen werden, welche interessanterweise nicht nur über die anti-apoptotischen Rezeptoren TRAIL-R3 und TRAIL-R4, sondern auch über die

Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 vermittelt werden. Diese Todesrezeptor-induzierten nicht-apoptotischen Effekte sind zum einen für immunregulatorische Prozesse sowie für die Regulation und Kontrolle des apoptotischen Prozesses *in vivo* von Relevanz. Andererseits spielen die beteiligten anti-apoptotischen Proteine eine bedeutende Rolle bei der Resistenz verschiedener Tumorzellen gegenüber TRAIL, womit sie zu attraktiven therapeutischen Angriffspunkten für die Modulation der TRAIL-Sensitivität in der Tumorthherapie werden.

Zu den bedeutenden nicht-apoptotischen Signalwegen der TRAIL-Todesrezeptoren gehören insbesondere die Aktivierung von NF κ B und der MAP (mitogen-activating-protein)-Kinasen JNK, ERK und p38.

1.5.1 TRAIL und die Aktivierung von NF κ B

Die Familie der NF κ B (nuclear factor kappa B)/Rel Proteine setzt sich zusammen aus einer Gruppe dimerer Transkriptionsfaktoren. Zu den Zielgenen dieser Faktoren gehören insbesondere anti-apoptotische und proinflammatorische Proteine, womit ihnen eine unverzichtbare Bedeutung bei der Kontrolle von Apoptose, bei der Induktion von Zellproliferation und -differenzierung sowie bei der Regulation inflammatorischer und immunologischer Prozesse zukommt (Wajant, 2004).

Die phylogenetisch konservierte Familie der NF κ B-Transkriptionsfaktoren entfaltet ihre Wirkung als Homo- oder Heterodimere (Gosh et al., 1998), zusammengesetzt aus den Proteinen cRel, RelA (p65), RelB, p50 (NF κ B1) und p52 (NF κ B2). Als gemeinsames strukturelles Kennzeichen besitzen die NF κ B-Transkriptionsfaktoren die sog. „Rel homology region“ (RHR). Funktionell ist die RHR verantwortlich für die Dimerisierung, DNA-Bindung und Translokation der NF κ B/Rel Proteine in den Nukleus. Außerdem vermittelt die RHR die Interaktion mit einer Gruppe inhibitorischer Proteine, den Mitgliedern der I κ B (inhibitor of NF κ B)-Familie (Karin & Lin, 2002). Diese I κ B-Proteine erfüllen ihre inhibitorische Funktion durch Maskierung der nukleären Translokationsdomäne (nuclear localization sequence, NLS) von NF κ B und

bewirken dadurch die Sequestrierung der NFκB-Dimere im Zytoplasma. Voraussetzung für die Aktivierung von NFκB ist somit dessen Freisetzung von seinem Inhibitor IκB.

Zu den Stimuli, welche die Aktivierung von NFκB induzieren, gehören unter anderem Zytokine, bakterielle und virale Bestandteile sowie UV-Strahlung. Nach Eingang eines solchen Signals erfolgt zunächst die Aktivierung eines Multiproteinkomplexes, des sog. IKK (IκB Kinase)-Komplexes. Dieser beinhaltet zwei verwandte Serinkinasen, IKK1 und IKK2 sowie die regulatorische Untereinheit NEMO. Die Aktivierung des IKK-Komplexes wird durch dessen Phosphorylierung erreicht, an der verschiedene IKK-Kinasen, wie z.B. MAPK3/MEKK3, NIK oder TAK1 beteiligt sind. Daneben vermag auch die Serin-Threonin-Kinase RIP den IKK-Komplex zu aktivieren (Lin et al., 2000). Der phosphorylierte, aktivierte IKK-Komplex agiert seinerseits mittels Phosphorylierung. So sind die IKKs verantwortlich für die Phosphorylierung der IκB-Proteine (Karin & DelKarin, 2000; Rothwarf & Karin, 1999), welche infolgedessen ubiquitiniert und durch das 26S Proteasom degradiert werden (Baldi et al., 1996; Scherer et al., 1995). Dadurch wird das NFκB-Dimer von seinem Inhibitor freigesetzt.

Nach der Signal-induzierten Translokation von NFκB in den Nukleus, vermag dieser Transkriptionsfaktor an die Promotoren einer Vielzahl von Genen zu binden, um deren Expression zu induzieren. Das Spektrum der NFκB-Zielgene reicht von proinflammatorischen Zytokinen über Zellzyklusregulatoren bis hin zu sowohl pro- als auch anti-apoptotisch wirkenden Proteinen. Als bedeutende Beispiele seien die Induktion von IL-8, FLIP, Bcl-XL, Mitgliedern der IAP-Familie sowie von TRAIL und einigen TRAIL-Rezeptoren zu nennen (Pahl, 1999).

Eine Verbindung zwischen TRAIL und NFκB besteht auf drei Ebenen. Erstens kann NFκB über die Induktion anti-apoptotischer NFκB-Zielgene die Sensitivität für TRAIL-vermittelte Apoptose determinieren. Zweitens vermag NFκB die Expression von TRAIL sowie den Rezeptoren TRAIL-R1, -R2 und -R3 zu induzieren. Drittens kann aber auch umgekehrt TRAIL über TRAIL-R1, -R2 und -R4 NFκB induzieren (Wajant, 2004).

1.5.1.1 NFκB reguliert die TRAIL-vermittelte Apoptose

NFκB ist befähigt, die zelluläre Sensitivität für TRAIL-vermittelte Apoptose zu regulieren, indem es eine Vielzahl anti-apoptotischer Proteine über NFκB-Zielgene induziert. Hierzu gehört insbesondere die NFκB-induzierte Expression von cFLIP (Kreuz et al., 2001), Bcl-XL (Chen et al., 2000), IAP Proteinen (Wang CY et al., 1998; Stehlik et al., 1998) sowie dem TRAIL-R3 (Bernard et al., 2001).

Interessanterweise besteht eine wechselseitige Inhibition zwischen apoptotischen und NFκB-aktivierenden Signalwegen. Während die NFκB-Aktivierung den Apoptosesignalweg durch Induktion anti-apoptotischer Proteine hemmt, blockieren im Apoptosesignalweg aktivierte Caspasen die NFκB-Aktivierung durch Spaltung von Proteinen, die für die NFκB-Aktivierung wichtig sind, wie dem Adapterprotein RIP (Lin et al., 1999; Martinon et al., 2000) oder der IKK2 (Tang et al., 2001).

Unter den anti-apoptotischen NFκB-Zielgenen ist cFLIP (cellular FLICE-inhibitory protein) von ganz besonderer Bedeutung für die Inhibition von Todesrezeptor-induzierter Apoptose. Ursprünglich wurde cFLIP als zelluläres Homolog zu einer Familie viraler anti-apoptotischer Proteine mit Todeseffektordomäne (DED) identifiziert (Krueger et al., 2001a; Thome & Tschopp, 2001). Heute ist klar, dass cFLIP zu den Hauptregulatoren der Apoptose gehört, indem es die Prozessierung der Caspase-8 im DISC kontrolliert. Mehr als 10 Spleissvarianten von FLIP konnten definiert werden (Djerbi et al., 2001). Von diesen sind FLIP-short (FLIP-S) und FLIP-long (FLIP-L) die am häufigsten exprimierten und am besten charakterisierten (Krueger et al., 2001a; Thome & Tschopp, 2001). Die Gene für cFLIP, Caspase-8 und Caspase-10 bilden eine Multigen-Familie. So findet sich bei cFLIP-L neben zwei DED-Strukturmotiven auch eine Caspase-Homologie-Domäne. Bei cFLIP-S ist die Caspase-Homologie-Domäne fast vollständig deletiert, so dass es im Wesentlichen aus zwei DEDs besteht. Trotz der hohen Sequenzhomologie von cFLIP zu Caspase-8 und -10 konnte für cFLIP keine Caspaseaktivität nachgewiesen werden. Beide cFLIP-Isoformen - cFLIP-L und cFLIP-S - werden in den DISC von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 aufgrund ihrer DED rekrutiert. Hier können sie dann mit der Prozessierung und Aktivierung von Caspase-8 interferieren und damit die Apoptose hemmen (Krueger et al., 2001b).

Neben der NFκB-induzierten Expression von cFLIP, leitet NFκB auch die Expression anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie ein, wie z.B. Bcl-XL und Bfl1/A1 (Chen et al., 2000; Lee et al., 1999; Wang CY et al., 1999; Zong et al., 1999). Bcl-XL und Bfl1/A1 führen ihre anti-apoptotischen Funktionen durch Hemmung des intrinsischen Apoptosesignalweges aus. Beide Proteine inhibieren hierbei die Formation der Bax/Bak-induzierten Poren in der äußeren Mitochondrienmembran (Werner et al., 2002; Gross et al., 1999) und verhindern damit die Freisetzung pro-apoptotischer mitochondrialer Faktoren.

Weiterhin gehören auch Mitglieder der IAP (inhibitors of apoptosis protein)-Familie zu den NFκB-Zielgenen. Die ersten Mitglieder der phylogenetisch konservierten Familie der IAPs wurden im Genom von Baculoviren als Faktoren zum Schutz vor Apoptose infizierter Wirtszellen entdeckt (Salvesen & Duckett, 2002). Erst später wurden Homologe der viralen IAPs auch in Vertebraten gefunden. IAPs sind charakterisiert durch den Besitz einer Zink-bindenden Domäne, der sog. BIR (baculoviral IAP repeat) Domäne (Salvesen & Duckett, 2002), welche für die Inhibition der Apoptose essentiell ist. Neben der N-terminalen BIR Domäne besitzen die meisten IAPs eine weitere für die anti-apoptotische Wirkung bedeutende Domäne, nämlich die C-terminale RING (really interesting new gene) Domäne (Salvesen & Duckett, 2002). Die NFκB-regulierten IAP Proteine cIAP1, cIAP2 und xIAP bewirken ihre anti-apoptotische Funktion durch Inhibition von Caspasen. xIAP bindet und blockiert die prozessierten Caspasen-3, -7 und -9 (Roy et al., 1997). cIAP1 und cIAP2 sind im Gegensatz zu xIAP durch eine zusätzliche CARD (caspase recruitment domain) gekennzeichnet (Rothe et al., 1995), vermögen aber trotzdem nur mit relativ geringer Affinität die Caspasen-3 und -7 zu binden und zu inhibieren. Außer der gut charakterisierten Caspase-hemmenden Funktion der IAPs sind diese Proteine auch befähigt, die proteasomale Degradation zu beeinflussen. So hat die RING-Domäne Ubiquitin-Ligase-(E3)-Aktivität und kann die Ubiquitinierung und Degradation von Caspase-3 und des pro-apoptotischen mitochondrialen Mediators SMAC/DIABLO einleiten (Mac Farlane et al., 2002; Suzuki et al., 2001). Diese IAP-vermittelte Degradation von SMAC/DIABLO und Caspasen erklärt auch die Beobachtung, dass die Verwendung von Proteasominhibitoren Zellen für TRAIL-vermittelte Apoptose sensitiviert. Die Suppression der SMAC/DIABLO- und Caspasen-Degradation durch Proteasominhibitoren könnte auch in der

Tumorthherapie in Kombination mit TRAIL Bedeutung finden, um Krebszellen durch Apoptose zu eliminieren.

Neben der NFκB-induzierten Bildung von cFLIP, anti-apoptischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie und der Familie der IAP Proteine können Zellen auch durch NFκB-induzierte Expression des Decoyrezeptors TRAIL-R3 vor Apoptose geschützt werden.

Schließlich sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass NFκB nicht nur anti-apoptisch wirkende Proteine induziert, sondern auch die Expression von TRAIL sowie den Todesrezeptoren TRAIL-R1 und -R2 einleiten kann. Die NFκB-abhängige Hochregulation pro-apoptischer Proteine scheint aber nicht zum apoptotischen Zelltod zu führen, solange die anti-apoptischen Proteine ebenfalls induziert werden. Dadurch überwiegt letztlich der anti-apoptische Effekt von NFκB. Durch die NFκB-vermittelte Induktion von TRAIL, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 kann außerdem ein positiver Feedbackmechanismus für die Aktivierung von NFκB etabliert werden. Denn über TRAIL-R1 und TRAIL-R2 kann TRAIL den NFκB-Signalweg aktivieren.

1.5.1.2 TRAIL aktiviert NFκB

Die molekularen Mechanismen der TRAIL-R1/R2-vermittelten NFκB-Aktivierung sind derzeit noch relativ ungeklärt. In vergangenen Studien konnte zumindest das für die TRAIL-induzierte Apoptose essentielle Adapterprotein FADD auch in Zusammenhang mit der TRAIL-vermittelten NFκB-Aktivierung gebracht werden. So wurde nachgewiesen, dass die Überexpression von FADD für eine Stimulation von NFκB-Zielgenen ausreichend ist (Wajant et al., 2000; Hu et al., 2000; Hsu et al., 1996). Des Weiteren konnte in FADD defizienten Jurkat-Zellen eine reduzierte NFκB-Aktivierung nach TRAIL-Stimulation beobachtet werden (Wajant et al., 2000). Neben FADD konnte auch dem Adapterprotein TRAF2 (TNF-receptor associated factor 2) (Wajant et al., 2000) sowie der Serin-Threonin-Kinase RIP (receptor interacting protein) (Lin et al., 2000) eine Rolle bei der TRAIL-induzierten NFκB-Aktivierung zugeordnet werden. RIP vermag über eine eigene Todesdomäne (DD) mit der von FADD zu interagieren (Varfolomeev et al., 1996). Zudem wurde RIP im TRAIL-induzierten DISC detektiert (Harper et al. 2001) und auch eine RIP-vermittelte Aktivierung des IKK-Komplexes konnte nachgewiesen werden (Lin et al., 2000). Die Verwendung dominant-negativer RIP-Mutanten konnte die IKK-Aktivierung sogar fast komplett blockieren (Lin et al., 2000). Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen TRAIL-vermittelter Zellproliferation und RIP-vermittelter NFκB-Aktivierung nachgewiesen werden (Ehrhardt et al., 2003). Bei der TRAIL-vermittelten Apoptoseinduktion dagegen spielt RIP keine Rolle. Interessanterweise gehört RIP zu den wenigen Substraten der Caspase-8 (Lin et al., 1999; Martinon et al., 2000). Die Caspase-8-vermittelte Spaltung von RIP erzeugt ein inaktives Fragment, das auf dominant-negative Art und Weise den NFκB-Signalweg inhibiert. Somit existiert auf dieser Ebene ein Mechanismus, bei dem durch TRAIL-vermittelte Apoptoseinduktion und konsekutiver Caspase-8-Aktivierung der nicht-apoptotische TRAIL-induzierte NFκB-Signalweg gehemmt wird.

Die TRAIL-vermittelte NFκB-Aktivierung kann demnach unter anderem über einen RIP-abhängigen Caspase-sensitiven Signalweg verlaufen. In Einklang hiermit zeigen mehrere Studien, dass eine Inhibition der Apoptose, z.B. durch Caspaseinhibitoren, die

TRAIL-induzierte Stimulation des NFκB-Signalweges verstärkt (Kumar-Sinha et al., 2002; Harper et al., 2001; Trauzold et al., 2001; Wajant et al., 2000).

Andererseits ergeben sich zunehmend Anhaltspunkte, dass auch ein alternativer Caspase-abhängiger Signalweg für die TRAIL-vermittelte NFκB-Aktivierung existiert (Secchiero et al., 2003a). So konnte beispielsweise in HL 60 Monozyten gezeigt werden, dass die TRAIL-R1-vermittelte NFκB-Aktivierung und dadurch induzierte Monozytenreifung mittels Caspaseinhibitoren blockiert wird (Secchiero et al., 2003a). Diese TRAIL-R1-induzierte Caspase-abhängige NFκB-Aktivierung könnte durch FADD, Caspase-8 und/oder FLIP vermittelt werden. Denn alle diese Moleküle sind in die Caspaseregulation der TRAIL-Rezeptoren involviert und induzieren NFκB bei Überexpression (Chaudhary et al., 2000; Hu et al., 2000).

1.5.2 TRAIL und die Aktivierung von MAP Kinasen

Die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade beruht auf der sequentiellen Phosphorylierung von Kinasen. In Säugetierzellen sind derzeit drei MAPK-Kaskaden bekannt: der JNK (cJun N-terminale kinase)-Signalweg, der ERK (extracellular signal-regulated kinase)-Signalweg sowie der p38-Kinase-Signalweg (Chen et al., 2001). Die Namen dieser Signalwege beziehen sich auf die MAP-Kinasen, die am Ende der jeweiligen Kaskade die Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durchführen. Die MAP-Kinasen werden durch MAPK-Kinasen (MAPKK) aktiviert, welche ihrerseits von MAPKK-Kinasen (MAPKKK) phosphoryliert und damit aktiviert werden. Die Induktion dieser Kaskade mit der Aktivierung von MAP3Ks über MAP2Ks zu MAPKs kann durch eine Vielzahl von Stimuli erfolgen, wie z.B. durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, verschiedene Arten von Stress oder UV-Bestrahlung (Pearson et al., 2001). Auch TRAIL ist befähigt, über seine Todesrezeptoren die Aktivierung der drei genannten MAPK-Kaskaden einzuleiten. Die durch Aktivierung der MAP-Kinasen ausgelösten Effekte sind äußerst variabel, zum Teil sogar antagonistisch. So umfassen sie sowohl Zellwachstum und -differenzierung als auch den programmierten Zelltod. Wie der Transkriptionsfaktor NFκB spielen die MAP-Kinasen außerdem eine wichtige

Rolle für die Immunregulation und Inflammation durch Induktion diverser proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-8 (Roux & Blenis, 2004). Im Folgenden werden die einzelnen Kaskaden in Zusammenhang mit TRAIL näher erläutert.

Die cJun N-terminale Kinase (JNK) scheint von den genannten MAP-Kinasen am komplexesten zu wirken. So gehört zu den Funktionen des JNK-Signalweges zum einen die Apoptoseinduktion, andererseits aber auch die Prävention von Apoptose sowie Zellproliferation und -differenzierung. JNK existiert in drei Isoformen (JNK1, JNK2, JNK3) mit über zehn verschiedenen Spleissvarianten (Davis, 2000), von denen JNK1 und JNK2 ubiquitär und JNK3 nur in neuronalem und kardialem Gewebe exprimiert werden (Lin, 2003; Davis, 2000). JNKs werden stark aktiviert durch Zytokine, UV-Bestrahlung, Mangel an Wachstumsfaktoren oder DNA-schädigende Agenzien (Kyriakis & Avruch, 2001a; Kyriakis, 2001b). Wie bei den MAP-Kinasen ERK und p38 erfordert auch die JNK-Aktivierung eine doppelte Phosphorylierung an Tyrosin- und Threoninresten innerhalb eines konservierten Threonin-Prolin-Tyrosin (TPY) – Strukturmotivs. Zwei MAPKKs sind in die Phosphorylierung und Aktivierung der JNK-Isoformen involviert: MKK-4 und MKK-7. Zu den beteiligten MAPKKs gehören MEKK 1-4, ASK1, TAK1 und Tpl2 (Kyriakis, 2001b). Interessanterweise können einige dieser MAP3Ks nicht nur den JNK-Signalweg, sondern auch den NFκB-Signalweg aktivieren. Die aktivierte JNK agiert schließlich durch Phosphorylierung und Aktivierung von einigen Mitgliedern der AP-1-Transkriptionsfaktor-Familie, wie z.B. cJun, JunB, JunD und ATF-2. Über die AP-1-Transkriptionsfaktoren erfüllt JNK sowohl pro- als auch anti-apoptotische Funktionen. Die apoptotischen Effekte von JNK sind hauptsächlich zurückzuführen auf die Fähigkeit von JNK, AP-1-vermittelt die Todesliganden TRAIL, FasL und TNF hochzuregulieren, die Transkriptionsfaktoren p53 und c-Myc zu aktivieren (Davis, 2000; Lin, 2003) sowie die Expression pro-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie wie Bim zu erhöhen. Die Phosphorylierung auch anderer Mitglieder der Bcl-2-Familie durch JNK wie Bcl-2, Bcl-XL und BAD (Yu et al., 2004) stellt einen Mechanismus der anti-apoptotischen Wirkung von JNK dar.

Die Induktion des JNK-Signalweges über TRAIL und seine Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 erfordert die Rekrutierung von Adapterproteinen an den Rezeptor-Ligand-Komplex. Als essentielle Adapterproteine für die TRAIL-vermittelte JNK-

Aktivierung haben sich RIP (receptor interacting protein) und TRAF2 (TNF-receptor associated factor 2) erwiesen (Lin et al., 2000). So wurde in Gegenwart dominant-negativer Mutanten von RIP bzw. TRAF2 die TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung vollständig blockiert (Lin et al., 2000). Für die Apoptoseinduktion durch TRAIL scheinen allerdings weder RIP noch TRAF2 essentiell zu sein (Lin et al., 2000). Trotz getrennter Signalwege für die TRAIL-vermittelte Apoptose und JNK-Aktivierung konnte für TRAIL zelltypabhängig sowohl ein Caspase-abhängiger als auch ein Caspase-unabhängiger JNK-Signalweg nachgewiesen werden (Muhlenbeck et al. 1998). So wurde in HeLa-Zellen die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung in Anwesenheit von Caspaseinhibitoren gehemmt, in Kym-1-Zellen hingegen nicht beeinflusst oder sogar verstärkt. Obwohl die JNK-Aktivierung in HeLa-Zellen abhängig von Caspasen ist, erwies sie sich unabhängig von dem für die TRAIL-vermittelte Apoptose notwendigen Adapterprotein FADD und damit unabhängig vom apoptotischen Zelltod (Muhlenbeck et al. 1998). Somit impliziert auch der JNK-Signalweg eine nicht-apoptische Bedeutung von TRAIL.

Die MAP-Kinase ERK (extracellular signal-regulated kinase) wird von den MAPKKs MKK-1 und MKK-2 aktiviert, welche wiederum von den MAPKKKs A-Raf, B-Raf und Raf-1 aktiviert werden. Aktivierte ERK vermag eine Vielzahl von Substraten zu phosphorylieren, darunter Membranproteine, nukleäre Substrate wie c-Fos und c-Myc sowie Proteine des Zytoskeletts. Aktiviert wird die ERK-Kaskade vor allem durch Wachstumsfaktoren (Lewis et al., 1998). Aber auch Zytokine der TNF-Liganden-Familie wie TRAIL, FasL und TNF können diesen Signalweg auslösen und damit anti-apoptotisch wirken. Die Aktivierung des ERK-Signalweges scheint einer der vielen Möglichkeiten von Zellen zu sein, sich vor Todesrezeptor-vermittelter Apoptose zu schützen. So konnte für TRAIL gezeigt werden, dass die Inhibition von ERK HeLa-Zellen für Apoptose sensitiviert (Tran et al., 2001), dass aktivierte T-Zellen vor TRAIL-induzierter Apoptose durch ERK geschützt werden (Soderstrom et al., 2002) und dass TRAIL das Überleben und die Proliferation von Endothelzellen über die Aktivierung von ERK vermittelt (Secchiero et al., 2003b). Die beteiligten intrinsischen Komponenten des TRAIL-vermittelten ERK-Signalweges sind hierbei noch weitestgehend ungeklärt.

Die MAP-Kinase p38 ist besonders bedeutsam für die Immunantwort und entzündliche Prozesse. So wird p38 in Makrophagen, Neutrophilen und T-Zellen durch eine Vielzahl extrazellulärer Mediatoren wie z.B. Zytokine, Chemokine oder bakterielle Bestandteile aktiviert. Über die Regulation von IFN- γ ist p38 involviert in Chemotaxis, T-Zelldifferenzierung und Apoptose (Ono & Han, 2000). Die meisten Stimuli, die JNK aktivieren, z.B. Stressfaktoren oder Zytokine, aktivieren auch p38. Zu den aktivierenden MAPKKs gehören die MEKKs 1-4 und ASK1. Die MAPKKs MKK-3 und MKK-6 phosphorylieren dann die p38 Isoformen. Als Zielstrukturen gelten für p38 unter anderem die Transkriptionsfaktoren NF κ B, p53, ATF-1 und -2. Die Beteiligung von p38 an der Aktivierung von NF κ B deutet auf eine potentielle Rolle dieser MAPK für das Überleben von Zellen und der Resistenz gegenüber Apoptosestimuli. So konnte gezeigt werden, dass TRAIL eine gesteigerte T-Zellproliferation und IFN- γ -Sekretion über den p38-Signalweg einleitet (Chou et al., 2001). Die genauen Zusammenhänge des TRAIL-induzierten p38-Signalweges bedürfen aber noch näherer Untersuchungen.

1.6 TRAIL als potentielltes Tumorthapeutikum

Die Elimination von Tumorzellen durch Chemotherapeutika, Bestrahlung oder Agonisten von Todesrezeptoren wird vornehmlich durch Auslösung des apoptotischen Zelltods in den Zielzellen vermittelt. TRAIL erweckte in den vergangenen Jahren besonderes Interesse für die Tumorthapie (Wajant et al., 2002), da es in einer Vielzahl von Tumorzellen Apoptose induziert, während normale Zellen kaum bzw. gar keine Zytotoxizität zeigen (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999; Griffith et al., 1998). Zwar sind auch andere Mitglieder der TNF-Liganden-Familie wie TNF oder FasL in der Lage, in Tumorzellen Apoptose zu induzieren, doch führt die systemische Anwendung von TNF zu einer letalen Entzündungsreaktion (Tartaglia & Goeddel, 1992; Havell et al., 1988) und die Infusion von agonistischem anti-Fas Antikörper verursacht eine letale Hepatotoxizität in Versuchstieren (Nagata, 1997). Werden bestimmte Präparationen von rekombinantem löslichem TRAIL verwendet, ist dagegen keine systemische Toxizität

nachweisbar, weder in Mäusen (Walczak et al., 1999) noch in Affen (Ashkenazi et al. 1999).

Es ist zu beachten, dass die Herstellungsmethoden von rekombinatem löslichem TRAIL für die selektive Toxizität gegenüber transformierten Zellen relevant sind. Ein nennenswertes Beispiel ist ein Bericht über die Zytotoxizität von TRAIL auf humane nichttransformierte Hepatozyten. Hierbei vermochte eine rekombinante Form von TRAIL mit einem amino-terminalen Polyhistidin-Tag, sog. TRAIL-His, Apoptose in nichttransformierten Hepatozyten zu induzieren (Jo et al., 2000), während TRAIL ohne exogene Sequenz-Tags nicht dazu befähigt war (Lawrence et al., 2001). Der getaggten Liganden-Präparation mangelte es zwar im Gegensatz zur ungetaggten Form an Zink, weshalb das TRAIL-His zum Teil nur aus Dimeren bestand, während das ungetaggte TRAIL ein homogenes Trimer darstellte. Allerdings zeigte sich beim TRAIL-His eine reduzierte Löslichkeit und die Tendenz zur Aggregation. Die Multimerisation von TRAIL-His wäre eine mögliche Erklärung für die erhöhte Toxizität, da ein sog. higher-order-clustering bei den korrespondierenden Todesrezeptoren eine Folge sein könnte (Almasan & Ashkenazi, 2003). Die zur Aggregation neigenden Formen von löslichem rekombinatem TRAIL scheinen wie membrangebundenes TRAIL zu wirken und damit im Gegensatz zu trimerem löslichem TRAIL sowohl TRAIL-R1 als auch TRAIL-R2 effizient zu aktivieren (Wajant et al., 2001). Folglich sind manche nichttransformierte Zellen zwar resistent gegenüber trimerem Liganden, aber sensitiv gegenüber oligomerisierten Formen wie dem genannten TRAIL-His.

Der zugrunde liegende Mechanismus für die unterschiedliche Sensitivität von malignen versus nicht-malignen Zellen für TRAIL konnte bis dato noch nicht exakt aufgeklärt werden. Eine Hypothese begründete den Schutz nichttransformierter Zellen durch Expression von TRAIL-Decoyrezeptoren, welche die Effekte der TRAIL-Todesrezeptoren antagonisieren (Ozoren & El-Deiry, 2003). Allerdings konnte anhand von Screenings verschiedener Tumorzellen und nichttransformierten Zellen keine Assoziation zwischen der TRAIL-Sensitivität und der TRAIL-Rezeptorexpression nachgewiesen werden. Somit scheint das Ansprechen auf TRAIL-induzierte Apoptose eher durch intrazelluläre Vorgänge reguliert zu werden. Vor allem in Tumorzellen zeigt sich häufig die Hochregulation anti-apoptotischer Proteine, was dann in TRAIL-

Resistenz resultiert. So sind mögliche vor Apoptose schützende Mechanismen in Tumorzellen die Überexpression von cFLIP, Bcl-2, Bcl-XL oder der IAP Proteine (Fulda et al., 2002; Kim et al., 2000, Chai et al., 2000). Auch die konstitutive Aktivität von NFκB ist in verschiedenen TRAIL-resistenten Tumorzellen zu finden (Ravi et al., 2001). Um Zellen für die TRAIL-vermittelte Apoptose zu sensitivieren, können Inhibitoren eingesetzt werden, welche die Funktion solcher anti-apoptotischer Proteine hemmen. Als Beispiel sei der Proteinsynthesehemmer Cycloheximid (CHX) genannt, der insbesondere Proteine mit kurzer Halbwertszeit, wie z.B. cFLIP, inhibiert (Wajant et al., 2000). Der Einsatz von Proteasominhibitoren kann auf zwei Ebenen die Empfindlichkeit von Zellen für TRAIL-vermittelte Apoptose verstärken. Einerseits wird die Aktivierung von NFκB vermindert, indem die proteasomale Degradation von IκB gehemmt wird. Andererseits wird der durch IAP Proteine induzierte Abbau von SMAC/DIABLO und von Caspasen im Proteasom supprimiert (Leverkus et al., 2003). Demzufolge könnte TRAIL bei einer potentiellen Tumorthherapie in Kombination mit entsprechenden Inhibitoren eingesetzt werden, um die Effizienz der Apoptoseinduktion zu steigern und eine mögliche Apoptoseresistenz von Tumorzellen zu überwinden.

1.7 Zielsetzung

Verglichen mit den gut untersuchten Mechanismen der apoptotischen Signaltransduktion von Todesrezeptoren stellt die Aktivierung nicht-apoptotischer Signalwege durch diese Rezeptoren ein bisher eher wenig erforschtes Gebiet dar. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die nicht-apoptotische Signaltransduktion von TRAIL und seinen Todesrezeptoren TRAIL-R1 (DR4) und TRAIL-R2 (DR5) näher untersucht werden.

Die nicht-apoptotischen Signalwege von TRAIL sind vor allem für die potentielle Tumorthherapie mit TRAIL von Relevanz. Zum einen vermag TRAIL statt des gewünschten apoptotischen Effektes auch antagonistische Wirkungen wie Zellproliferation oder Inflammation hervorzurufen. Zum anderen ist die Überexpression

anti-apoptotischer Proteine bzw. die konstitutive Aktivierung nicht-apoptotischer Signalwege eine Ursache für die in einigen Tumorzellen auftretende Resistenz gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose.

Insbesondere die TRAIL-vermittelte Induktion der MAPK-Signalwege und des NF κ B-Signalweges kann bei einer Tumorthherapie mit TRAIL Ursache nicht-apoptotischer Effekte sein, welche statt der erwünschten Abtötung von Tumorzellen zur vermehrten Proliferation derselben führen können oder welche für entzündliche Nebenwirkungen verantwortlich sein können. Daher konzentrierten sich die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen in erster Linie auf die TRAIL-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 sowie des Transkriptionsfaktors NF κ B in humanen Pankreaskarzinomzellen.

Verwendet wurde primär die humane Pankreaskarzinomzelllinie Colo 357, welche abschließend mit der Fibroblasten-Zelllinie SV 80 verglichen wurde. Durch Verwendung Bcl-XL- sowie FLIP-Long-überexprimierender Zellen wurden Modellsysteme gewählt, die einen bekannten Apoptoseresistenzmechanismus von Tumorzellen repräsentieren.

2 Materialien

2.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien

ABTS	Boehringer, Mannheim
Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe
APS	Sigma, Deisenhofen
Bio-Rad-Protein-Assay	Bio-Rad, München
Cycloheximid	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Roth, Karlsruhe
ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
FBS	PAA Lab. GmbH, Linz, Österreich
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
JNK-II-Inhibitor	Calbiochem, Darmstadt
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
MG-132 (Proteasom-Inhibitor)	Calbiochem, Darmstadt
Nitrocellulosemembranen	BioTrace NT, Pall Corporation
Phosphatase-Inhibitor	Sigma, Deisenhofen
Protease-Inhibitor-Tabletten	Roche Diagnostics GmbH
RPMI 1640	PAA Lab. GmbH, Linz, Österreich

SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Sigma, Deisenhofen
TRAIL	(löslich, human, rekombinant):
superKiller TRAIL	Apotech Corporation
FLAG-Zink-TRAIL	TRAIL 5459 der AG Wajant, Würzburg
TRAIL-His (Polyhistidin-TRAIL)	R&D Systems
TRIS	Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Lösung	PAA Lab. GmbH, Linz, Österreich
Tween	Roth, Karlsruhe
zVAD-fmk	Bachem, Heidelberg

2.2 Puffer und Lösungen

10 fach Lauf/Blot-Stock-Pufferlösung	144 g Glycin + 30,3 g TRIS auf 1 l Wasser
Blot-Puffer	100 ml 10 fach Stock-Pufferlösung + 700 ml Wasser + 200 ml Methanol + 1,5 ml 20 %iges SDS
Coating-Puffer	8,4 g/l NaHCO ₃ + 3,6 g/l Na ₂ CO ₃ ; pH = 9,5

Kristallviolettlösung	0,5 % Kristallviolett, 20 % Methanol
Ladepuffer (4x)	0,5 ml 20 %iges SDS + 0,5 ml Glycerin + 0,3 ml TRIS (pH 6,8) + Bromphenolblau + DTT (1:10) mit Wasser auf 5ml auffüllen
Laufpuffer (SDS-PAGE)	100 ml 10fach Stock-Pufferlösung + 900 ml Wasser + 5 ml 20 %iges SDS
Lysispuffer	NP40 1 %ig, TRIS 50 mM (pH 7,4) + NaCl 150 mM, EDTA 5mM (pH 7,4) + Protease-Inhibitor (1 Mastermix- Tablette auf 25 ml Stocklösung)
PBS (10x)	26,65 g Na ₂ HPO ₄ + 3,12 g NaH ₂ PO ₄ + 81,9 g NaCl auf 1 l Wasser
PBS-F (Assay Diluent)	1x PBS, 10 % FBS
PBS-Tween	1x PBS, 0,05 % Tween-20
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	0,5 M TRIS + 0,015 M SDS; pH 6,8 (für 500 ml)

TE-PBS	1x Trypsin-EDTA-Lösung (10 %) in 1x PBS
TBS (10x)	24,2 g TRIS + 80 g NaCl auf 1 l Wasser
TBS-Tween	1x TBS, 0,05 % Tween-20
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	1,5 M TRIS + 0,015 M SDS; pH 8,8 (für 500 ml)

2.3 Antikörper

anti-Bid	Kaninchen pAK, Pharmingen
anti-Caspase-8	Maus mAK, Aliquot
anti-FLAG M2	mAK, Sigma, Missouri (USA)
anti-Kaninchen	HRP-gekoppeltes IgG (Sekundär-Antikörper für Phospho-JNK, -ERK, -p38), Cell Signaling
anti-PARP	Maus mAK, BD Biosciences
anti-RIP	Maus mAK, BD Biosciences
anti-Vinculin	Maus mAK, Santa Cruz Biotechnology, Inc.

anti-Phospho-JNK/SAPK- und Kaninchen, Cell Signaling
anti-JNK-Antikörper

anti-Phospho-p38-(MAPK)- und Kaninchen, Cell Signaling
anti-p38-Antikörper

anti-Phospho-ERK- und Kaninchen, Cell Signaling
anti-ERK-Antikörper

Polyklonaler Schaf-anti-Kaninchen-AK HRP-gekoppeltes Ig (Sekundär-Antikörper
für Bid); Dako Cytomation

Polyklonaler Kaninchen-anti-Maus-AK HRP-gekoppeltes Ig (Sekundär-Antikörper
für C8, PARP und RIP); Dako Cytomation

2.4 Zelllinien

Colo 357 VK

Colo 357 Zellen mit transfiziertem leerem
viralem Vektor

Colo 357 Bcl-XL

Colo 357 Zellen mit transfiziertem
Bcl-XL-exprimierendem viralem Vektor

SV 80 wt

parentale SV 80 Zellen (Wildtyp)

SV 80 FLIP-long

FLIP-Long-GFP-exprimierende SV 80 Zellen

3 Experimentalmethoden

3.1 Kultivierung und Konservierung humaner Zelllinien

Zur Kultivierung der in der Arbeit verwendeten Zelllinien wurde als Nährmedium RPMI 1640 versetzt mit 10 % hitzeinaktiviertem FBS benutzt. Die Zellen wurden bedeckt von Nährmedium in Zellkulturflaschen inkubiert. Die Inkubation erfolgte in Brutschränken bei einer Temperatur von 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 96 % sowie konstanter CO₂-Begasung von 5 %.

Die Zellen pflegten bei Kultivierung am Boden der Zellkulturflaschen zu adhären. Die Verwendung der kultivierten Zelllinien für experimentelle Zwecke erforderte somit zunächst die Ablösung der adhären Zellen. Hierfür wurden die Zellen nach Absaugen des Nährmediums mit einem geeigneten Volumen TE-PBS (PBS mit 10 % Trypsin-EDTA) versetzt und bis zur Ablösung der Zellen vom Gefäßboden im Brutschrank inkubiert. Infolge wurde erneut Nährmedium zu den Zellen gegeben und die Zellsuspension bei RT mit 1200 U/min zentrifugiert. Schließlich wurden die abzentrifugierten Zellen mit neuem Nährmedium resuspendiert, um letztlich in der benötigten Verdünnung ausgesät zu werden.

Die Langzeitlagerung der Zelllinien erfolgte mittels Kryokonservierung. Hierfür wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet, daraufhin in hitzeinaktiviertem FBS mit 10 % DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Aufgrund der Zytotoxizität des DMSO mussten die Röhrchen unverzüglich in den - 80 °C Gefrierschrank gebracht werden, in dem sie dann zur Langzeitlagerung aufbewahrt wurden.

3.2 Zytotoxizitätsnachweis

Zur Messung der Zytotoxizität von TRAIL diente die Quantifizierung der mit Kristallviolett angefärbten Zellen. Hierbei korrelierte die Stärke der Anfärbung mit der Anzahl lebender Zellen, wobei die lebenden adhärent wachsenden Zellen im Gegensatz zu den toten abgelösten Zellen angefärbt wurden.

Zur Versuchsdurchführung wurden zunächst 10.000-20.000 Colo 357 bzw. SV 80 Zellen pro well in 96-well-Mikrotiterplatten (Flachboden) ausgesät. Nach 24 h Inkubation erfolgte die Stimulation der Zellen mit der gewünschten Konzentration von TRAIL und weiteren verschiedenen Reagenzien. Nach einer weiteren Inkubation von 15-20 h im Brutschrank wurde das Medium entfernt und die Zellen mit Kristallviolettlösung (50 µl/well) versehen. Die überschüssige Färbelösung wurde dann nach 15 min. durch mehrmaliges Waschen mit Wasser entfernt. Die Mikrotiterplatten wurden im Anschluss über Nacht zum Trocknen gelegt.

Um daraufhin das Ausmaß des zytotoxischen Effekts zu quantifizieren, wurde am folgenden Tag die Absorption mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 509 nm gemessen. Dadurch konnte die Vitalität der Zellen anhand der optischen Dichte (OD) angegeben werden. Die Messung erfolgte einmal mit den getrockneten Mikrotiterplatten und einmal nach Lösung des gebundenen Kristallvioletts mittels Zugabe von 100 µl Methanol pro well.

3.3 IL-8-ELISA

3.3.1 Zellaussaat und Stimulation

In Analogie zum Zytotoxizitätsnachweis wurden auch zur Untersuchung der IL-8-Produktion mittels ELISA die verwendeten Zellen in 96-well-Mikrotiterplatten (20.000 Zellen/well) ausgesät und für 24 h inkubiert. Vor der Stimulation der Zellen mit TRAIL und weiteren Reagenzien am folgenden Tag wurde stets das Nährmedium ausgetauscht, um konstitutiv gebildetes IL-8 als Störfaktor bei der Detektion zu beseitigen.

Nach 6-stündiger Inkubation der Zellen mit den entsprechenden Reagenzien wurde das Medium vollständig in eine neue 96-well-Mikrotiterplatte (U-Form-Boden) überführt. Der so gewonnene Zellüberstand wurde daraufhin im – 80 °C Gefrierschrank bis zur Durchführung der Detektion gelagert.

3.3.2 Detektion

Zum Nachweis von IL-8 in Zellüberständen wurden speziell beschichtete ELISA-96-well-Mikrotiterplatten verwendet. Diese mussten zunächst mit IL-8-Antikörperhaltigem Coating Puffer (50 µl pro well) beschichtet und bei 4 °C über Nacht gelagert werden. Der dem Coating Puffer zugesetzte Capture-Antikörper (Konzentrationsverhältnis 1:250) konnte dadurch am Boden der ELISA-Platte chemisch binden und damit immobilisiert werden.

Am folgenden Tag wurde der Coating Puffer durch Ausschütten und dreimaliges Waschen mit PBS-Tween von den vorbereiteten ELISA-Platten entfernt. Anschließend wurde 200 µl Assay Diluent (PBS mit 10 % FBS) pro well auf die Platten pipettiert und für 1h bei RT inkubiert. Hierdurch wurden unspezifische Bindungsstellen für den

zweiten Antikörper am Boden der ELISA-Platten blockiert. Nach Ausschütten und erneutem dreimaligem Waschen der Platten mit PBS-Tween wurden die unter 3.3.1 beschriebenen Zellüberstände (100 µl pro well) aufgetragen. Als Positivkontrolle und für den quantitativen Vergleich diente die zusätzliche Auftragung von rekombinantem IL-8 in drei definierten Konzentrationen (0,5 ng/ml; 1 ng/ml; 2 ng/ml).

Nach zweistündiger Inkubation bei RT wurden die Proben entfernt und die Platten fünf malig mit PBS-Tween gewaschen.

Um die antikörpergebundenen IL-8-Moleküle sichtbar zu machen, wurde ein enzymgebundener Anti-Human-IL-8-Antikörper verwendet. Hierfür wurden die Platten mit 50 µl/well einer Lösung aus biotinyliertem IL-8-Antikörper und Streptavidin-HRP (IL-8-AK und Strp-HRP jeweils in 1:250 Assay Diluent) versehen und für 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten sieben mal mit PBS-Tween gewaschen.

Durch Zugabe eines Substrates des am Antikörper gebundenen Enzyms entstand ein farblisches Produkt, wodurch das Vorhandensein von IL-8 letztlich sichtbar und quantifizierbar wurde. Hierfür wurden die Platten nach dem letzten Waschschrift mit 100 µl/well einer ABTS-Lösung (1 mg/ml ABTS mit 16,7 mg/ml ABTS-Puffer) versetzt und die Absorption im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

Sämtliche Antikörper sowie Streptavidin-HRP und rekombinantes IL-8 wurden dem OptEIA-tm IL8-ELISA-Kit der Firma Pharmingen (San Diego, USA) entnommen.

3.4 Westernblotanalysen

3.4.1 Herstellung von Zelllysaten

In Abhängigkeit vom nachzuweisenden Protein wurden die Zelllysate auf zwei verschiedene Art und Weisen bezüglich der Zellyse hergestellt: Entweder mittels Lysispuffer beim Nachweis von Caspase-8, PARP, Bid und RIP oder mittels Sonifizierung beim Nachweis von JNK, ERK (p44/42) und p38.

In jedem Fall wurden zunächst 1,5 Millionen Colo 357 bzw. SV 80 Zellen in 6 cm-Petrischalen ausgesät und 24 h inkubiert. Daraufhin erfolgte die Stimulation der Zellen mit TRAIL und anderen Reagenzien in den gewünschten Konzentrationen, bis sie dann nach einem definierten Zeitwert geerntet wurden. Das Ernten der Zellen erfolgte auf Eis mittels Zellschaber. Infolge wurden die abgeschabten Zellen in Falcon-Röhrchen überführt und bei 4 °C mit 1200 U/min. abzentrifugiert. Der Zellüberstand wurde abgesaugt.

Für die Zellyse mittels Lysispuffer wurde das abzentrifugierte Zellpellet mit Protease-Inhibitor-versetztem Lysispuffer (ca. 100-150 µl) resuspendiert, in Eppendorf-Röhrchen überführt und für 20 min. auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Suspension für 10 min. bei 13000 U/min. zentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorf-Röhrchen überführt. Vor Verwendung dieser Art hergestellter Lysate musste noch eine Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt werden. Hierfür wurde je 1 µl der hergestellten Proben mit 1 ml 1:5 verdünnter Bio-Rad-Protein-Assay-Lösung in Plastikkuvetten inkubiert und im Folgenden die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer gemessen.

Bei der Zellyse mittels Sonifizierung wurde das Zellpellet anstelle von Lysispuffer mit Phosphatase-Inhibitor-versetztem 4x-Ladepuffer (ca. 120 µl) resuspendiert. Im Anschluss erfolgte dann die eigentliche Zellyse durch Ultraschall-Behandlung am

Sonificator. Zuletzt wurden die Proben für 3 min. bei 96 °C auf dem Heizblock erhitzt. Gelagert wurden beide Arten von Zellysaten bei - 20 °C.

3.4.2 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamidgelen bestehend aus einer Trenngel- und einer SammelgelpKaninchen.

Zur Herstellung von einem 10 %igen Trenngel wurden 3,7 ml Acrylamid, 2,7 ml Trenngelpuffer, 4,6 ml H₂O, 187 µl APS-Lösung sowie 15,4 µl TEMED zum Start der Polymerisierungsreaktion vermischt. Die Trenngellösung wurde nun in den Zwischenraum zweier zusammengeklemmter Glasplatten gegossen und unmittelbar danach zur Erzeugung einer möglichst glatten Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach der vollständigen Auspolymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol wieder abgegossen und die Reste mit Filterpapier abgesaugt.

Anschließend konnte eine vorbereitete Sammelgellösung auf das Trenngel aufgetragen werden. Ein 6 %iges Sammelgel setzte sich hierbei aus 1,4 ml Acrylamid, 1,7 ml Sammelgelpuffer, 3,8 ml H₂O, 84 µl APS-Lösung und 7 µl TEMED zusammen. Vor der Auspolymerisierung wurde in das Sammelgel ein Kamm zur Herstellung von Geltaschen eingeschoben.

Die hergestellten Gele konnten daraufhin zur gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine in den hergestellten Lysaten verwendet werden. Vor Auftragen der Proben auf das Gel mussten diese zunächst 10 min. bei 13000 U/min. zentrifugiert werden. Die Lysispuffer-Lysate mussten zudem noch mit 4x-Ladepuffer vermischt werden. Schließlich wurden je 10-15 µl der Lysate in jede Tasche des Sammelgels pipettiert.

Die Elektrophorese wurde in vertikalen Elektrophoresekammern bei zunächst 90 V und nach Ansammlung der Proben im Sammelgel bei 140 V durchgeführt.

3.4.3 Westernblot

Der Transfer der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulosemembranen erfolgte durch das sogenannte Elektroblobverfahren. Hierfür wurden zunächst vier Lagen Whatman-Filterpapier sowie ein Stück Nitrocellulosemembran auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und in Blot-Puffer getränkt. Nach dem Abbau der Elektrophoreseapparatur wurde das Sammelgel mit Hilfe eines Skalpell vom Trenngel abgetrennt und verworfen. Das verbleibende Trenngel wurde dann mit Blot-Puffer benetzt. Für den Aufbau der Elektroblobvorrichtung wurden nun in Richtung vom Plus- zum Minuspol zwei Lagen Whatman-Filterpapier, die Nitrocellulosemembran, das Trenngel und schließlich zwei weitere Lagen Whatman-Filterpapier frei von Luftblasen übereinander geschichtet.

Nach dem Anschluss der Blotapparatur an die Spannungsquelle wanderten die negativ geladenen Proteine bei einer Stromstärke von 70 mA pro Membrangesamtfläche in der Blotkammer vom Minus- zum Pluspol. Die Blotdauer betrug 105 min.

3.4.4 Immundetektion immobilisierter Proteine

Die auf die Nitrocellulosemembran transferierten Proteine konnten schließlich mittels Antikörperbindungsreaktionen sichtbar gemacht werden. Je nach verwendetem Antikörper wurden diese in PBS- oder TBS-Tween gelöst. Bei Verwendung von Antikörpern gegen JNK, ERK und p38 diente TBS-Tween als Lösungsmittel, für die übrigen Antikörper wurde PBS-Tween eingesetzt.

Direkt im Anschluss an das Blotten wurde die Nitrocellulosemembran für 1 h in PBS/TBS-Tween mit 5 % Magermilchpulver eingelegt, um unspezifische Bindungsstellen für die im Folgenden verwendeten Antikörper zu blockieren. Als Primär-Antikörper wurde ein spezifisch an das zu detektierende Protein bindender Antikörper (in PBS- bzw. TBS-Tween verdünnt) verwendet. Hiermit wurde die Membran über Nacht bei 4 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag

wurde die Antikörperlösung entfernt und die Membran drei mal 5 min. mit PBS- bzw. TBS-Tween gewaschen. Daraufhin wurde als Sekundär-Antikörper ein Peroxidase-markierter Antikörper (HRP-gekoppelter Antikörper), der spezifisch das Immunglobulin des erstverwendeten Antikörpers bindet, eingesetzt. Mit dem zweiten Antikörper (in PBS-Tween oder in TBS-Tween mit 5 % Magermilch verdünnt) wurde die Membran für 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert und danach wiederum drei mal 5 min. mit PBS- bzw. TBS-Tween gewaschen.

Zuletzt wurde die Membran nun für 1 min. mit der Peroxidase-Substratlösung (ECL) benetzt und unmittelbar danach in eine Belichtungskassette gelegt. In der Dunkelkammer konnten dann nach Auflegen eines Films auf die Membran (Belichtungszeit abhängig vom Signal) die Westernblots im Fotoentwickler entwickelt werden.

4 Ergebnisse

4.1 Überexpression von Bcl-XL schützt Colo 357 Zellen vor TRAIL-vermittelter Apoptose

Für die vorliegende Studie zur nicht-apoptischen Signaltransduktion von TRAIL wurden primär humane Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie Colo 357 verwendet. Die Zellen sollten durch einen für Tumorzellen typischen Apoptoseresistenzmechanismus vor Apoptose geschützt werden, um für die Untersuchungen pathophysiologische nicht-apoptische Bedingungen zu gewährleisten. Da die Überexpression des anti-apoptisch wirksamen Proteins Bcl-XL häufig für die Apoptoseresistenz von Tumorzellen verantwortlich ist, wurden Colo 357 Zellen mit einem transfizierten Bcl-XL-exprimierenden Vektor (Colo 357 Bcl-XL) verwendet. Als Kontrolle dienten Colo 357 Zellen mit leerem transfiziertem Vektor (Colo 357 VK). In einem ersten Arbeitsschritt wurden die beiden Zelltransfektanden mittels Zytotoxizitätsassay auf ihre Sensitivität gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose überprüft. Wie erwartet, erwiesen sich die Bcl-XL-überexprimierenden Colo 357 Zellen als resistent gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose (Bild 2b, d, f). Hingegen waren für die Colo 357 VK Zellen alle drei verwendeten TRAIL-Reagenzien toxisch (Bild 2a, c, e), insbesondere in Anwesenheit des Proteinsyntheseinhibitors CHX. Humanes superKiller TRAIL und humanes TRAIL-His waren bei einer Konzentration von 100 ng/ml in gleichem Ausmaß toxisch. Erst bei geringen Konzentrationen von 1 ng/ml zeigte humanes superKiller TRAIL eine etwas verstärkte Toxizität gegenüber TRAIL-His (Bild 2c, e). Bei Verwendung von FLAG-Zink-TRAIL war eine vorherige Quervernetzung mit dem monoklonalen anti-FLAG Antikörper M2 sowie eine höhere Konzentration bei der Zellstimulation erforderlich, um die gleiche Apoptoserate zu erreichen (Bild 2a). Da sich die drei verwendeten TRAIL-Reagenzien in ihrer Wirkung auf Colo 357 VK Zellen nur bezüglich der benötigten Konzentration für vergleichbar starke Apoptoseraten

unterschieden und keines der drei TRAIL-Varianten in Colo 357 Bcl-XL Zellen Apoptose induzierte, wurden sie im Verlauf der Arbeit analog eingesetzt.

Durch Überprüfen der Apoptosesensitivität der Bcl-XL-überexprimierenden Colo 357 Zellen wurde gleichzeitig getestet, ob bei der verwendeten Zelllinie die Mitochondrien in die Transduktion des apoptotischen Signals involviert sind. Anhand der in Bild 2 dargestellten Apoptoseresistenz der Bcl-XL-überexprimierenden Zellen konnten die verwendeten Colo 357 Zellen als sog. Typ-II-Zellen definiert werden. In diesen Zellen wird die Apoptose durch Überexpression von Bcl-XL blockiert, da zur Auslösung des apoptotischen Zelltods eine Amplifikation des DISC-Signals über die Mitochondrien im Sinne des intrinsischen Apoptosesignalweges notwendig ist (siehe Kap. 1.4).

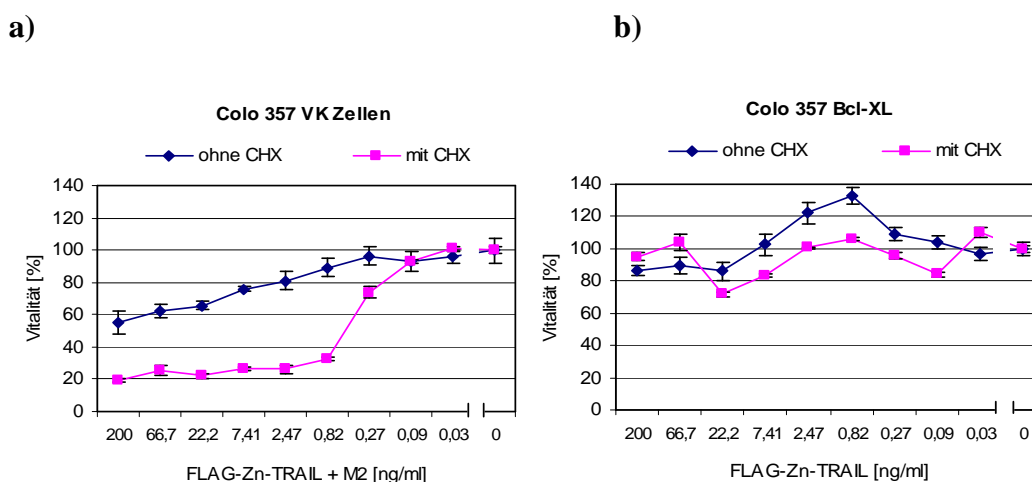


Bild 2a-b: Überexpression von Bcl-XL schützt Colo 357 Zellen vor TRAIL-vermittelter Apoptose. Colo 357 VK Zellen und Colo 357 Bcl-XL Zellen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten (10.000 Zellen/well) kultiviert und nach Erhalt subkonfluenter Zelldichten teilweise mit CHX (2,5 µg/ml) 1 h vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen an FLAG-Zink-TRAIL (FLAG-Zn-TRAIL) + anti-FLAG mAK M2 (1 µg/ml) versehen und 16 h inkubiert. Die Vitalitätsbestimmung erfolgte durch Kristallviolett-färbung und Messung der optischen Dichte.

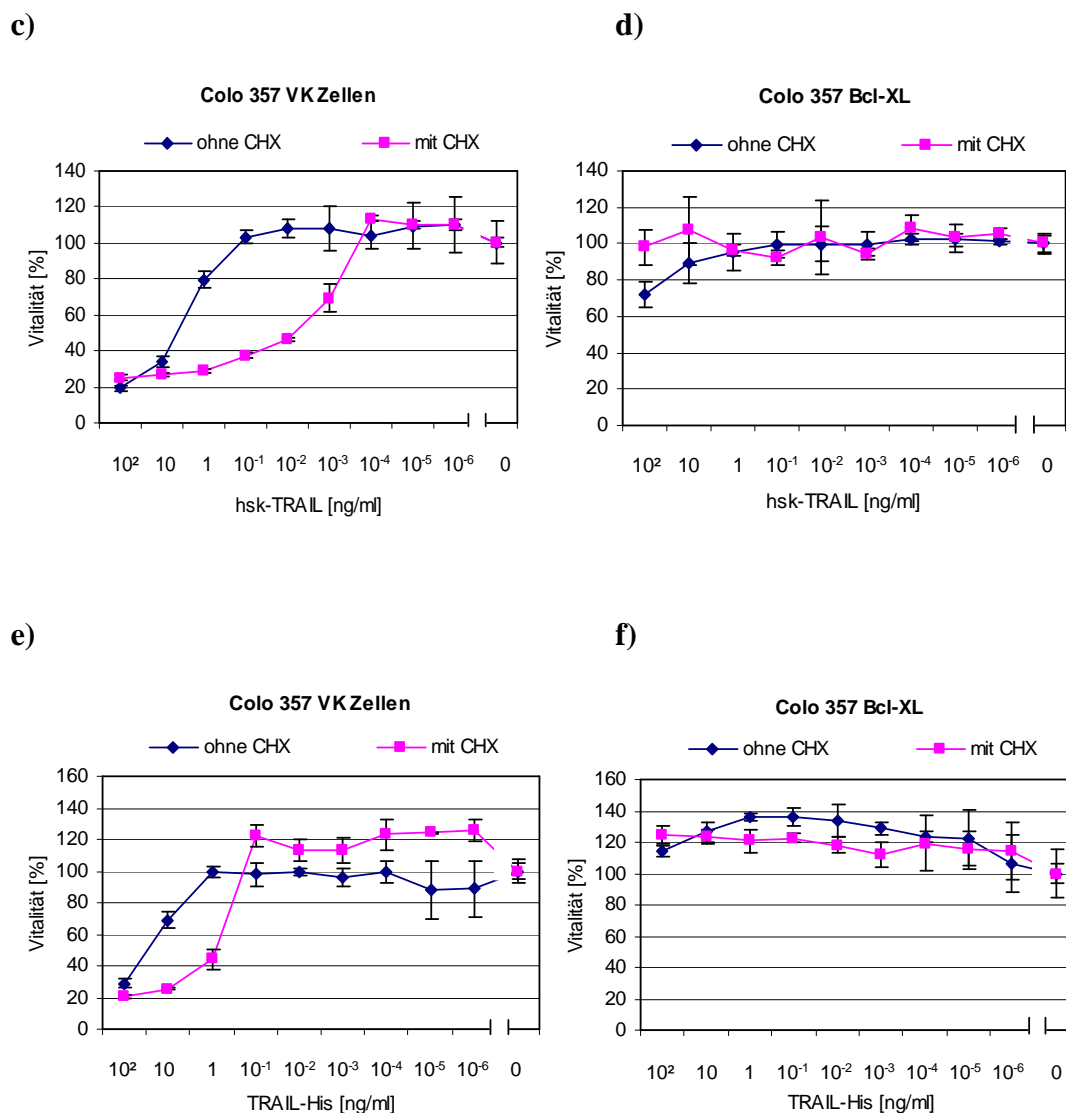


Bild 2c-f: Überexpression von Bcl-XL schützt Colo 357 Zellen vor TRAIL-vermittelter Apoptose. Colo 357 VK Zellen und Colo 357 Bcl-XL Zellen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten (10.000 Zellen/well) kultiviert und nach Erhalt subkonfluenten Zelldichten teilweise mit CHX (2,5 µg/ml) 1 h vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen an humanem superKiller TRAIL (hsk-TRAIL) oder TRAIL-His versehen und 16 h inkubiert. Die Vitalitätsbestimmung erfolgte durch Kristallviolett-färbung und Messung der optischen Dichte.

4.2 TRAIL aktiviert in Colo 357 Zellen die MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 unabhängig vom apoptotischen Zelltod, aber abhängig von der Caspaseaktivität

Nach Darstellung der Apoptoseresistenz von Colo 357 Bcl-XL Zellen gegenüber der Apoptosesensitivität von Colo 357 VK Zellen wurde mittels Westernblotanalyse in diesen Zellen die TRAIL-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 untersucht. Da die Aktivierung der MAP-Kinase Kaskaden insbesondere bei der Auslösung nicht-apoptotischer Effekte wie Zellproliferation und -differenzierung sowie bei der Induktion proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-8 eine zentrale Rolle spielt, ist die Untersuchung dieser Signalwege von besonderem Interesse für die nicht-apoptotische Signaltransduktion von TRAIL. Durch den Vergleich der Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen mit den Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen sollte der Zusammenhang zwischen der TRAIL-vermittelten MAPK-Aktivierung und der Auslösung des apoptotischen Zelltods untersucht werden. Die Zellen wurden hierfür teilweise mit dem Proteinsyntheseinhibitor CHX und dem Caspaseinhibitor zVAD-fmk vorbehandelt und anschließend mit TRAIL stimuliert. Interessanterweise aktivierte TRAIL die drei MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 sowohl in den Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen als auch in den Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen (Bild 3). Die Aktivität wurde hierbei durch Detektion der enzymatisch aktiven phosphorylierten Form der jeweiligen Kinase nachgewiesen (in Bild 3 bezeichnet als p-JNK, p-ERK und p-p38). In Anwesenheit von CHX wurde die TRAIL-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinasen deutlich verstärkt, wohingegen dieses Signal durch Inhibition von Caspasen mittels zVAD-fmk signifikant abgeschwächt wurde (Bild 3). Somit konnten bei der TRAIL-induzierten Aktivierung von JNK, ERK und p38 zwei bedeutende Zusammenhänge beobachtet werden. Einerseits war die Aktivierung der drei MAP-Kinasen unabhängig vom apoptotischen Zelltod, da die aktivierten Kinasen sowohl in den apoptotischen Colo 357 VK Zellen als auch in den nicht-apoptotischen Colo 357 Bcl-XL Zellen nach TRAIL-Stimulation nachweisbar waren. Andererseits erwies sich die TRAIL-induzierte MAPK-Aktivierung als Caspase-abhängig, da nach Inhibition der Caspasen mittels zVAD-fmk die TRAIL-induzierte Aktivierung der drei MAP-Kinasen fast vollständig blockiert wurde.

4.2 TRAIL aktiviert in Colo 357 Zellen die MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 unabhängig vom apoptotischen Zelltod, aber abhängig von der Caspaseaktivität

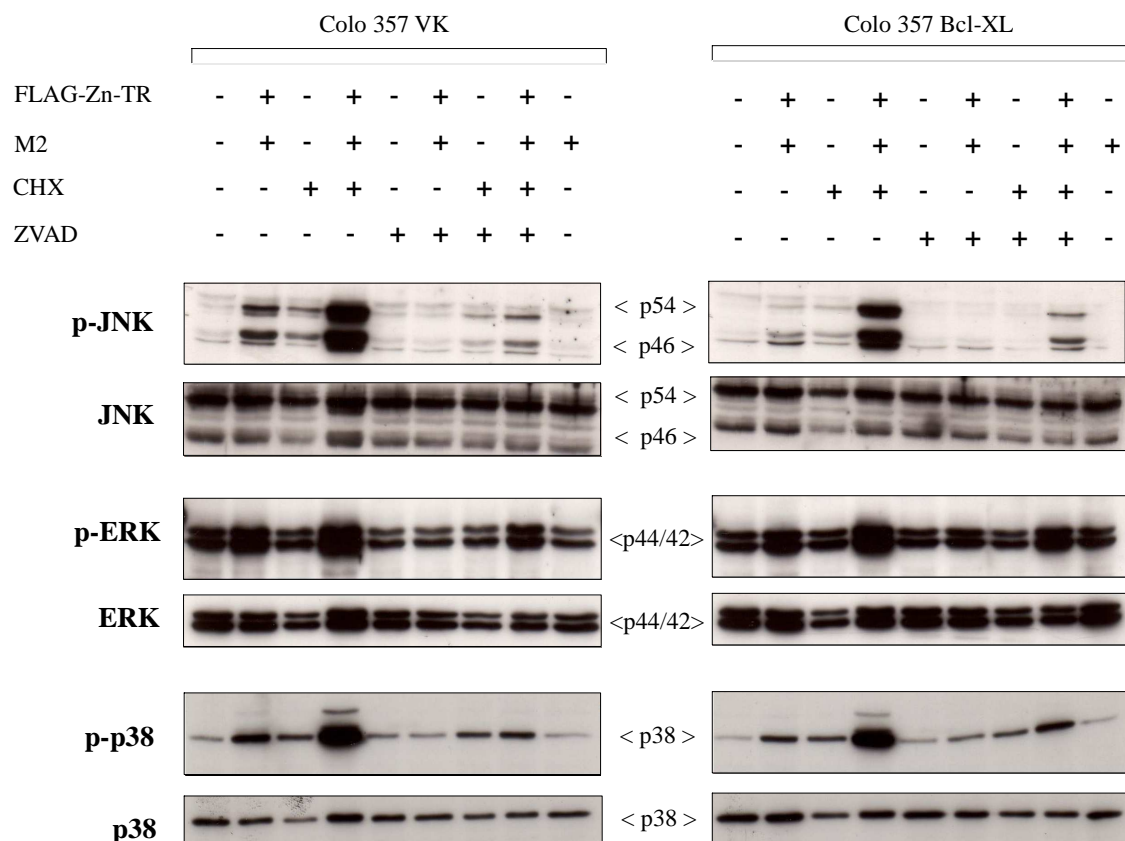


Bild 3: TRAIL aktiviert die MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 in Colo 357 Zellen unabhängig vom apoptotischen Zelltod, aber abhängig von der Caspaseaktivität. Colo 357 VK Zellen und Colo 357 Bcl-XL Zellen wurden in 6 cm-Petrischalen kultiviert und nach Erhalt subkonfluenten Zelldichten teilweise mit CHX (2,5 µg/ml) und/oder zVAD-fmk (20 µM) 1 h vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 6 h in An- oder Abwesenheit von FLAG-Zink-TRAIL [FLAG-Zn-TR (200 ng/ml)] + anti-FLAG mAK M2 (1 µg/ml) inkubiert. Nach Ablauf der Stimulation wurden die Zellen wie in Kap. 3.4.1 beschrieben mittels Sonifizierung lysiert. Je 15 µl der Zelllysate wurden auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die aufgetrennten Proteine wurden nach Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran mit einem anti-Phospho-JNK-AK (p-JNK), einem anti-Phospho-ERK/p44/42-AK (p-ERK) bzw. einem anti-Phospho-p38-AK (p-p38) detektiert. Zum Vergleich der eingesetzten Proteinmengen wurden zusätzlich die exprimierten nicht-phosphorylierten Proteine mit einem anti-JNK-AK (JNK), einem anti-ERK-AK (ERK) bzw. einem anti-p38-AK (p38) detektiert. Als Sekundär-AK wurde jeweils ein HRP-gekoppelter Kaninchen-AK verwendet.

4.3 In SV 80 Zellen erfolgt die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung Caspase-unabhängig

Aufgrund früherer Studien über zelltypabhängige Eigenschaften der TRAIL-vermittelten JNK-Aktivierung, wurde neben den Colo 357 Zellen die Fibroblasten-Zelllinie SV 80 verwendet und bezüglich der TRAIL-induzierten JNK-Aktivierung untersucht.

Wie bei dem bisher vorgestellten Modellsystem mit Colo 357 Zellen wurde auch bei den SV 80 Zellen der Vergleich von Apoptose-sensitiven mit Apoptose-resistenten Zellgruppen angestrebt. Neben der Disregulation von Bcl-XL stellt auch eine gesteigerte Expression von cFLIP einen typischen Apoptoseresistenzmechanismus von Tumorzellen dar. Aus diesem Grund wurden für die folgenden Experimente FLIP-Long-GFP-exprimierende SV 80 Zellen (SV 80 FLIP-L) verwendet. Als Apoptose-sensitive Kontrollgruppe dienten parentale SV 80 Wildtyp Zellen (SV 80 wt). Um die unterschiedlichen Apoptoseempfindlichkeiten der zu vergleichenden SV 80 Zelltransfektanden vorab sicherzustellen, wurde ein Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Hierbei wurden SV 80 wt sowie SV 80 FLIP-L Zellen in An- und Abwesenheit von CHX mit unterschiedlichen Konzentrationen von TRAIL-His stimuliert. Ohne die Vorbehandlung mit CHX führte TRAIL-His weder in SV 80 wt Zellen noch in SV 80 FLIP-L Zellen zur Induktion von Apoptose (Bild 4a). Dagegen zeigte sich in Gegenwart von CHX ein deutlicher Unterschied der Apoptosesensitivität zwischen SV 80 wt und SV 80 FLIP-L Zellen. Auf die parentalen SV 80 Zellen wirkte TRAIL-His in Anwesenheit von CHX stark toxisch, nicht aber auf die FLIP-L-GFP-exprimierenden Zellen (Bild 4b). Nach dem Nachweis der Apoptosesensitivität der SV 80 wt Zellen und der Apoptoseresistenz der SV 80 FLIP-L Zellen, wurde im Folgenden mittels Westernblotanalyse die TRAIL-vermittelte Induktion phosphorylierter JNK in diesen Zellen überprüft. Hierbei wurden SV 80 wt Zellen einerseits mit den ebenfalls Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen, andererseits mit den Apoptose-resistenten SV 80 FLIP-L Zellen verglichen. Im Gegensatz zu Colo 357 VK Zellen zeigte sich für SV 80 wt Zellen, dass in Anwesenheit von zVAD-fmk die TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung nicht supprimiert, sondern eher verstärkt wurde (Bild 4c). Damit erwies

sich die Aktivierung von JNK in diesen Zellen als Caspase-unabhängig. Da die beiden verglichenen Zelllinien die gleichen Eigenschaften bezüglich der Sensitivität gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose aufwiesen, konnten die dargestellten Differenzen auf die Verwendung verschiedener Zellarten zurückgeführt werden. Ob durch TRAIL folglich ein Caspase-abhängiger oder ein Caspase-unabhängiger Signalweg zur Aktivierung von JNK induziert wird, hängt von der stimulierten Zellart ab. Diese Beobachtung wurde schließlich dadurch bekräftigt, dass in den Apoptose-resistenten SV 80 FLIP-L Zellen die gleichen Bedingungen für die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung wie für SV 80 wt Zellen nachgewiesen werden konnten (Bild 4d). Unabhängig von der unterschiedlichen Apoptosesensitivität gegenüber TRAIL zeigte sich in beiden SV 80 Zelltransfektanden eine TRAIL-induzierte Phosphorylierung von JNK, die nicht durch zVAD-fmk supprimiert wurde. Anhand dieser Daten konnte für SV 80 Zellen eine zelltypspezifische Caspase-unabhängige JNK-Aktivierung nachgewiesen werden.

Zelltypenspezifisch gilt dagegen für Colo 357 wie auch für SV 80 Zellen, dass TRAIL unabhängig von der Induktion des apoptotischen Zelltods die Aktivierung der MAP-Kinase JNK induziert. Denn aktivierte JNK konnte sowohl in Apoptose-sensitiven SV 80 wt bzw. Colo 357 VK Zellen als auch in Apoptose-resistenten SV 80 FLIP-L bzw. Colo 357 Bcl-XL Zellen detektiert werden.

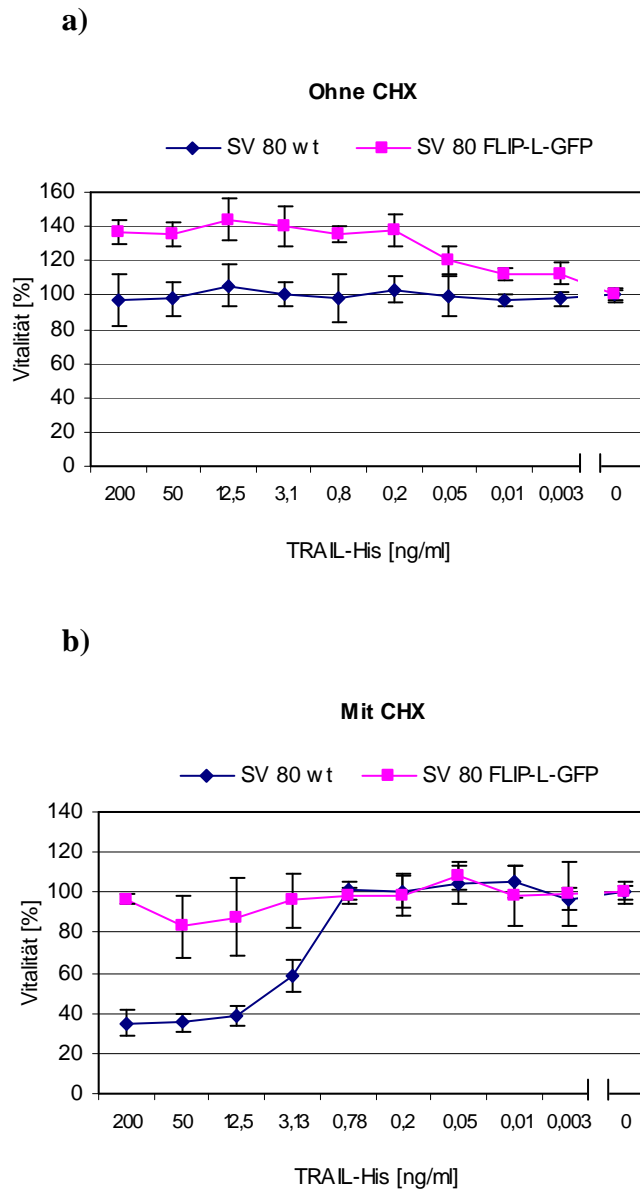


Bild 4a-b: Die Überexpression von FLIP-Long schützt SV 80 Zellen vor TRAIL-vermittelter Apoptose. SV 80 wt Zellen und SV 80 FLIP-L Zellen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten (15.000 Zellen/well) kultiviert und in Ab- bzw. Anwesenheit von CHX (2,5 µg/ml) 1 h vorinkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen an TRAIL-His versehen und 16 h inkubiert. Die Vitalitätsbestimmung erfolgte durch Kristallviolett-färbung und Messung der optischen Dichte.

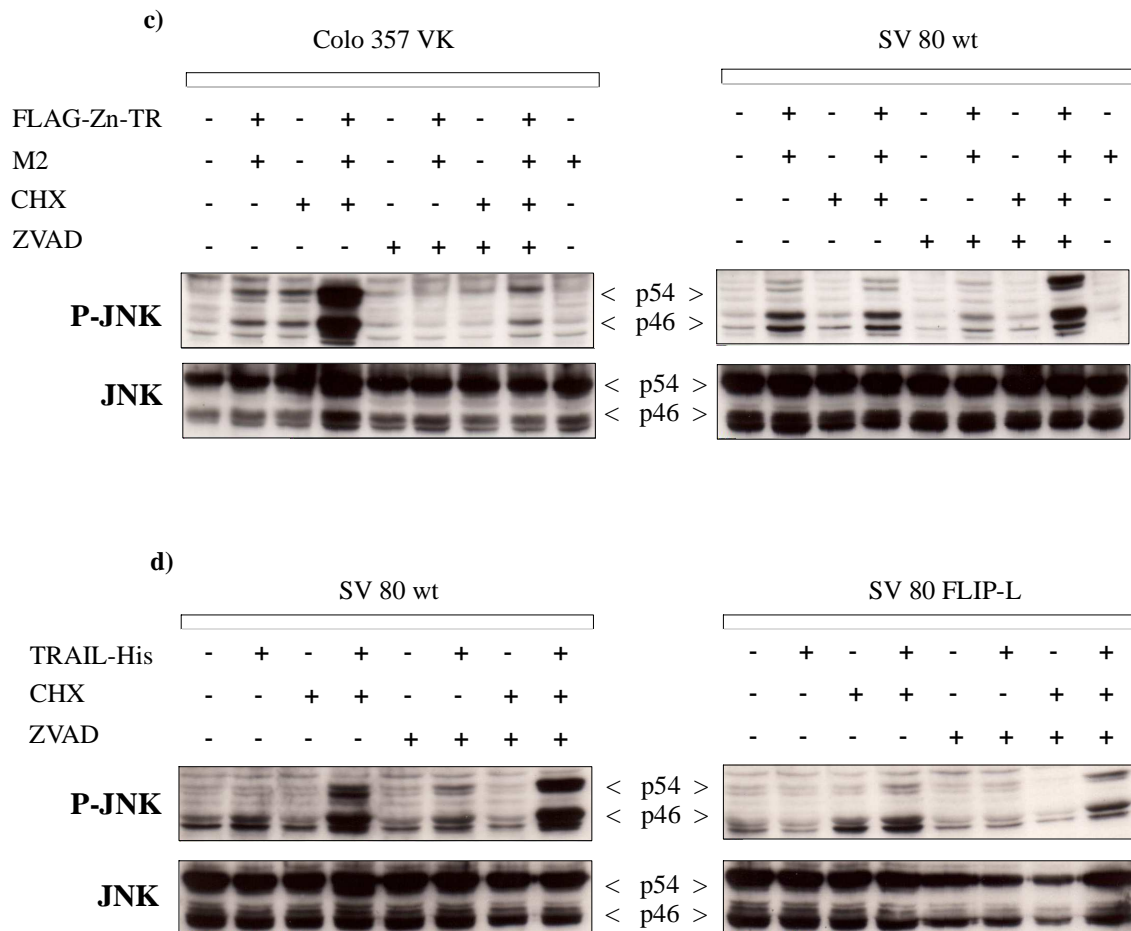


Bild 4c-d: In SV 80 Zellen erfolgt die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung caspase-unabhängig. Colo 357 VK Zellen, SV 80 wt Zellen und SV 80 FLIP-L Zellen wurden in 6 cm-Petrischalen kultiviert und nach Erhalt subkonfluenten Zelldichten teilweise mit CHX (2,5 µg/ml) und/oder zVAD-fmk (20 µM) 1 h vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 6 h in An- oder Abwesenheit von FLAG-Zink-TRAIL [FLAG-Zn-TR (200 ng/ml)] + anti-FLAG mAk M2 (1 µg/ml) bzw. TRAIL-His (50 ng/ml) inkubiert. Nach Ablauf der Stimulation wurden die Zellen wie in Kap. 3.4.1 beschrieben mittels Sonifizierung lysiert. Je 15 µl der Zelllysate wurden auf 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die aufgetrennten Proteine wurden nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit einem anti-Phospho-JNK-AK (p-JNK) detektiert. Zum Vergleich der eingesetzten Proteinmengen wurde zusätzlich die exprimierte nicht-phosphorylierte JNK mit einem anti-JNK-AK (JNK) nachgewiesen. Als Sekundär-AK wurde ein HRP-gekoppelter Kaninchen-AK verwendet.

4.4 Sowohl in Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen als auch in Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen wird Caspase-8 nach TRAIL-Stimulation aktiviert

Nachdem sowohl in Colo 357 VK als auch in Colo 357 Bcl-XL Zellen eine Caspase-abhängige Aktivierung der MAP-Kinasen nachgewiesen werden konnte (siehe Bild 3), sollte die Aktivierung der Caspasen in den verglichenen Zelltransfektanden näher analysiert werden. Hierfür wurden im Westernblot die Prozessierung der Caspase-8 sowie die Spaltung verschiedener Caspasesubstrate nach Stimulation mit löslichem TRAIL überprüft. In Analogie zum Nachweis der MAPK-Aktivierung (siehe Kap. 4.2) wurden auch in diesem Versuch die Auswirkungen von TRAIL variabel mit und ohne Vorbehandlung der Zellen mit CHX bzw. zVAD-fmk untersucht. In Colo 357 VK Zellen konnte eine deutliche Spaltung der Pro-Caspase-8 (p55/53) nach Stimulation mit CHX und TRAIL beobachtet werden (Bild 5). Dagegen zeigte die Behandlung mit CHX alleine keine Veränderung der inaktiven Caspase-Vorstufe (Bild 5). Die TRAIL-induzierte Prozessierung und konsekutive Aktivierung von Caspase-8 korreliert gut mit der TRAIL-induzierten Apoptoseauslösung in Colo 357 VK Zellen (siehe Bild 2a, c, e). Interessanterweise konnte aber auch in den Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen eine vergleichsweise ausgeprägte TRAIL-vermittelte Prozessierung der Caspase-8 nach Vorbehandlung mit CHX nachgewiesen werden (Bild 5). Die zusätzliche Verwendung des Caspaseinhibitors zVAD-fmk zeigte erwartungsgemäß eine fast vollständige Blockierung der Caspase-Spaltung. Da bei der dargestellten TRAIL-induzierten Caspase-8-Spaltung nur die Prozessierung der Caspase-Vorstufe (p55/53) in die p43/41-Untereinheit darstellbar war, die aktive p18-Untereinheit von Caspase-8 aber nicht deutlich detektiert werden konnte, sollte sichergestellt werden, dass die nachgewiesene TRAIL-vermittelte Caspase-8-Prozessierung wirklich der Aktivierung des Enzyms entsprach. Hierfür wurde im Folgenden das Caspase-8-Substrat Bid im Westernblot detektiert. Wie aus Bild 5 ersichtlich wird, induziert TRAIL in Anwesenheit von CHX in beiden verwendeten Colo 357 Zelltransfektanden die Spaltung von Bid, womit die Aktivität der prozessierten Caspase-8 nachgewiesen werden konnte. In Einklang mit der zVAD-fmk-vermittelten Inhibition der Caspase-8-

Aktivierung wurde auch die Spaltung des Caspase-8-Substrates Bid in Anwesenheit von zVAD-fmk blockiert (Bild 5). Zusammenfassend ist den Daten zu entnehmen, dass die TRAIL-induzierte Caspase-8-Prozessierung in ihr enzymatisch aktives Heterotetramer nicht zwangsläufig zum apoptotischen Zelltod in Colo 357 Zellen führt, da sie sowohl in Apoptose-sensitiven Colo 357 VK als auch in Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen nachweisbar war. Dieses Ergebnis passt gut zu den Beobachtungen in Bild 3, in denen sich die Aktivierung von Caspasen als Notwendigkeit für die Aktivierung der nicht-apoptotisch wirksamen MAP-Kinasen erwiesen hatte.

Neben der Spaltung von Bid wurde des Weiteren die Prozessierung der Serin-Threonin-Kinase RIP untersucht, welche ebenfalls ein Substrat von Caspase-8 darstellt. Die Spaltung von RIP konnte in beiden Colo 357 Zelltransfektanden nachgewiesen werden, nachdem die Zellen mit TRAIL und CHX behandelt worden waren (Bild 5). Dies war ein weiterer Nachweis für das Vorhandensein einer aktiven Caspase-8. Im Vergleich zu der Prozessierung von Bid fällt allerdings auf, dass die Spaltung von RIP nicht völlig durch die Vorbehandlung mit zVAD-fmk zu inhibieren war. Dies könnte auf eine zusätzliche Caspase-unabhängige Spaltung von RIP in den Colo 357 Bcl-XL Zellen zurückgeführt werden.

4.4.1 Caspase-3 wird nur in Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen nach TRAIL-Stimulation aktiviert

Nachdem das Vorhandensein der aktiven Initiatorcaspase-8 nach TRAIL-Stimulation in Apoptose-sensitiven und Apoptose-resistenten Zellen nachweisbar war, sollte in einem nächsten Arbeitsschritt die Aktivität der Effektorcaspase-3 in Colo 357 VK und Colo 357 Bcl-XL Zellen verglichen werden. Als Indikator für aktive Caspase-3 diene der Nachweis der Spaltung des Caspase-3-Substrates PARP im Westernblot. Caspase-3 spaltet und inaktiviert das für DNA-Reparatur und Zellzyklusregulation wichtige Protein PARP. Die Detektion von gespaltenem PARP in Colo 357 VK Zellen nach Behandlung mit TRAIL und CHX (Bild 5) demonstrierte somit das Vorhandensein einer aktiven Caspase-3. In Colo 357 Bcl-XL Zellen war dagegen keine Spaltung von

PARP nachweisbar (Bild 5). Demnach führte in diesen vor Apoptose geschützten Zellen die Stimulation mit TRAIL und CHX nicht zu einer Aktivierung der Effektorcaspase-3.

Nach TRAIL-Stimulation wurde somit zwar sowohl in Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen als auch in Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen Caspase-8 aktiviert, die Aktivierung von Caspase-3 hingegen erfolgte nur in den Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen.

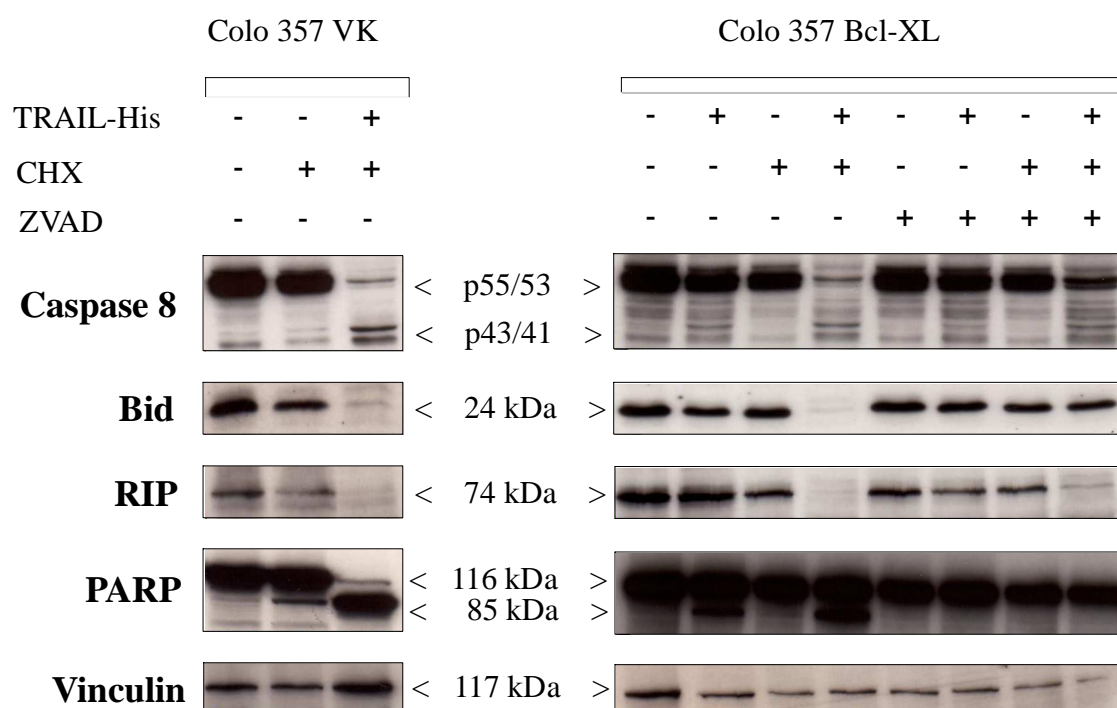


Bild 5: Sowohl in Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen als auch in Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen wird Caspase-8 nach TRAIL-Stimulation aktiviert. Colo 357 VK Zellen und Colo 357 Bcl-XL Zellen wurden in 6 cm-Petrischalen kultiviert und nach Erhalt subkonfluenter Zelldichten teilweise mit CHX (2,5 µg/ml) und/oder zVAD-fmk (20 µM) 1 h vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 6 h in An- oder Abwesenheit von TRAIL-His (50 ng/ml) inkubiert. Nach Ablauf der Stimulation wurden die Zellen wie in Kap. 3.4.1 beschrieben mittels Lysispuffer lysiert. Je nach errechneter Proteinkonzentration der Zelllysate wurden jeweils 10-15 µl auf 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die aufgetrennten Proteine wurden nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit einem anti-Caspase-8-AK, einem anti-Bid-AK, einem anti-RIP-AK bzw. einem anti-PARP-AK detektiert. Zum Vergleich

der eingesetzten Proteinmengen wurde zusätzlich das konstitutiv exprimierte Protein Vinculin mittels anti-Vinculin-AK detektiert. Als Sekundär-AK wurde für die Detektion von Caspase-8, PARP und RIP ein HRP-gekoppelter polyklonaler Kaninchen Anti-Maus-AK verwendet, für die Bid-Detektion ein HRP-gekoppeltes polyklonales Schaf Anti-Kaninchen-Serum.

4.5 TRAIL induziert IL-8 in Colo 357 Zellen

In Zusammenhang mit der nicht-apoptotischen Signaltransduktion der TRAIL-Todesrezeptoren ist neben der Aktivierung der MAP-Kinase Kaskaden auch die TRAIL-vermittelte Induktion des NFκB-Signalweges von besonderem Interesse. Denn die NFκB-Aktivierung kann einerseits durch die Induktion anti-apoptotischer Zielgene zu einer Inhibition des apoptotischen Signalweges führen. Andererseits spielt der Transkriptionsfaktor NFκB eine zentrale Rolle bei der Steuerung von Entzündungsreaktionen durch Aktivierung verschiedener proinflammatorischer Zielgene (Wajant, 2004). So induziert NFκB analog zu den MAP-Kinasen die Expression des Chemokins IL-8 (Hoffmann et al., 2002).

Die Detektion der IL-8-Expression in Colo 357 Zellen diente in der vorliegenden Arbeit als Methode, um die TRAIL-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinase-Signalwege sowie des NFκB-Signalweges in Colo 357 Zellen zu analysieren. Colo 357 VK Zellen und Colo 357 Bcl-XL Zellen wurden hierbei zunächst mit zVAD-fmk vorbehandelt und mit löslichem TRAIL stimuliert. Daraufhin wurde mittels ELISA das Chemokin IL-8 als potentiell NFκB- und MAPK-Zielgen detektiert. In beiden Colo 357 Zelltransfektanden war nach Stimulation mit quervernetztem FLAG-Zink-TRAIL eine deutliche Induktion von IL-8 nachweisbar (Bild 6a). Die maximale Signalstärke der IL-8-Produktion war hierbei nach sechs Stunden messbar. Bemerkenswerterweise waren auch beim Nachweis der aktivierten MAP-Kinasen die größten Signale nach sechsständiger TRAIL-Stimulation detektierbar (Bild 3). Bei den verwendeten Colo 357 Bcl-XL Zellen wurde zusätzlich die IL-8-Produktion nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von FLAG-Zink-TRAIL, humanem superKiller TRAIL

und TRAIL-His verglichen (Bild 6b). Bei der Menge an IL-8 im ELISA zeigten sich für die verschiedenen TRAIL-Arten die gleichen Relationen wie beim Ausmaß der Apoptoserate im Zytotoxizitätsnachweis (vgl. Bild 2a, c, e). So wurde bei hohen Konzentrationen (100 ng/ml) von humanem superKiller TRAIL und TRAIL-His quantitativ die gleiche Menge an IL-8 von den Zellen produziert. Erst bei Konzentrationen von 1 ng/ml erwies sich das humane superKiller TRAIL in Relation zu TRAIL-His als stärkerer Induktor von IL-8. Bei der Verwendung von FLAG-Zink-TRAIL waren wie auch beim Zytotoxizitätsnachweis (Bild 2) die Quervernetzung mit M2 sowie höhere Konzentrationen notwendig. Die verwendeten Arten von löslichem rekombinantem TRAIL unterschieden sich demnach auch bezüglich der IL-8-Produktion nur in der Stärke des ausgelösten Signals.

a)

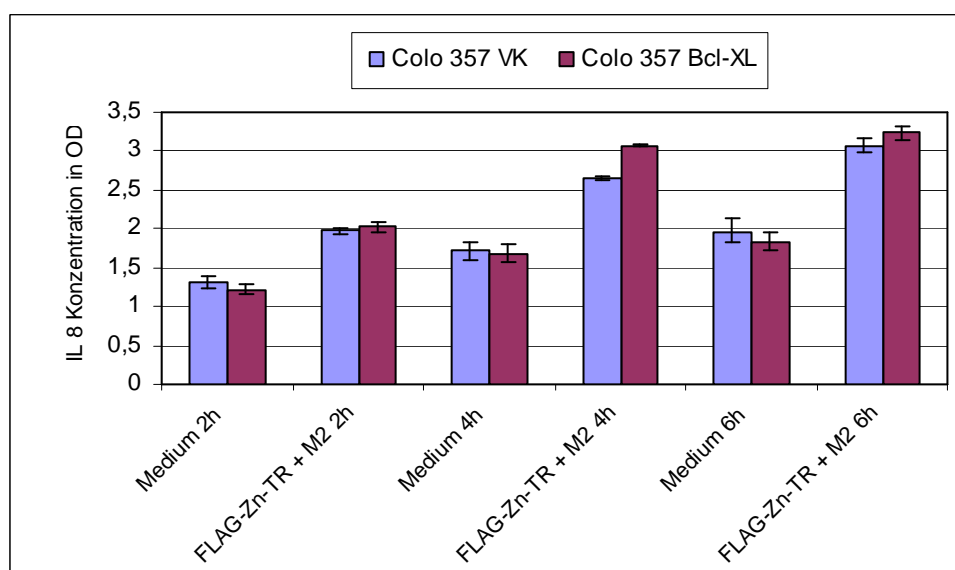


Bild 6a: TRAIL induziert IL-8 in Colo 357 Zellen. Colo 357 VK Zellen und Colo 357 Bcl-XL Zellen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten (20.000 Zellen/well) kultiviert und mit α VAD-fmk (20 μ M) 1 h vorinkubiert. Die Zellen wurden anschließend in An- und Abwesenheit von FLAG-Zink-TRAIL [FLAG-Zn-TR (200 ng/ml)] + anti-FLAG mAk M2 (1 μ g/ml) inkubiert. Die Kulturüberstände wurden 2 h, 4 h und 6 h nach Zugabe von TRAIL abgenommen. Im Anschluss wurden die gewonnenen Kulturüberstände jeweils mit Hilfe eines IL-8-spezifischen ELISA-Kits untersucht und die gebildete Menge an IL-8 in OD (optischer Dichte) gemessen.

b)

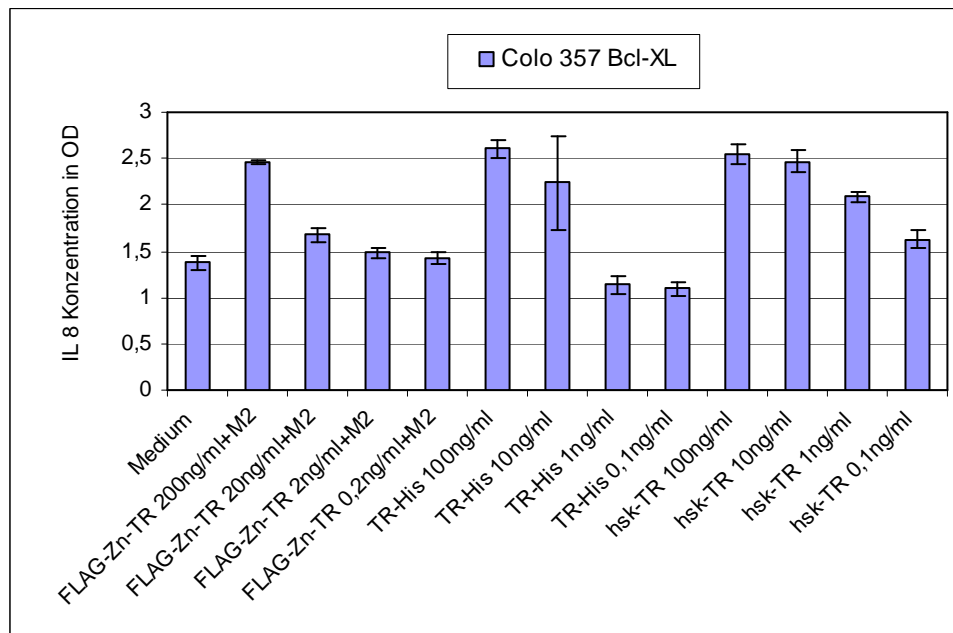


Bild 6b: TRAIL induziert IL-8 in Colo 357 Zellen. Colo 357 Bcl-XL Zellen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten (20.000 Zellen/well) kultiviert und mit *zVAD-fmk* (20 μ M) 1 h vorinkubiert. Die Zellen wurden anschließend in den angegebenen Konzentrationen mit FLAG-Zink-TRAIL (FLAG-Zn-TR) + anti-FLAG mAk M2 (1 μ g/ml), TRAIL-His (TR-His) bzw. humanem superKiller TRAIL (hsk-TR) inkubiert. Die Kulturüberstände wurden 6 h nach Zugabe von TRAIL abgenommen. Im Anschluss wurden die gewonnenen Kulturüberstände jeweils mit Hilfe eines IL-8-spezifischen ELISA-Kits untersucht und die gebildete Menge an IL-8 in OD (optischer Dichte) gemessen.

Die in Bild 6a-b dargestellte TRAIL-induzierte IL-8-Produktion diente einem indirekten Nachweis der TRAIL-vermittelten Einleitung der MAP-Kinase-Signalwege sowie des NF κ B-Signalweges. Welcher der beiden Signalwege in den verwendeten Zellen nach TRAIL-Stimulation für die IL-8-Produktion verantwortlich war, sollte im Folgenden näher untersucht werden. Der Zusammenhang zwischen der TRAIL-induzierten IL-8-Produktion und der JNK-Aktivierung sollte durch den Einsatz eines spezifischen JNK-Inhibitors geklärt werden (siehe Kap.4.5.1). Die Bedeutung des NF κ B-Signalweges für die TRAIL-vermittelte IL-8-Produktion sollte durch Verwendung des Proteasominhibitors MG-132 ermittelt werden (siehe Kap. 4.5.2).

4.5.1 Die Inhibition von JNK hemmt die TRAIL-vermittelte IL-8-Produktion in Colo 357 Zellen

Um die funktionelle Bedeutung der TRAIL-induzierten Aktivierung von JNK für die TRAIL-induzierte IL-8-Produktion in Colo 357 Zellen zu untersuchen, wurde ein spezifischer Inhibitor der JNK eingesetzt. Zunächst wurden die Eigenschaften des verwendeten sog. JNK-II-Inhibitors näher bestimmt, indem im Westernblot die Fähigkeit des Inhibitors zur Hemmung der JNK-Phosphorylierung und damit zur Hemmung der JNK-Aktivierung überprüft wurde. Hierbei wurden Colo 357 VK Zellen und Colo 357 Bcl-XL Zellen mit löslichem TRAIL alleine sowie zusätzlich in Anwesenheit des JNK-II-Inhibitors stimuliert. Da der verwendete Inhibitor in DMSO gelöst war, wurde außerdem als Kontrolle eine Stimulation mit TRAIL in Anwesenheit von DMSO vorgenommen. Wie bereits zuvor nachgewiesen (Bild 3) induzierte TRAIL sowohl in den Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen als auch in den Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen die Phosphorylierung von JNK (Bild 7a). Diese TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung wurde deutlich durch die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit dem JNK-II-Inhibitor supprimiert (Bild 7a). Die Verwendung von DMSO zeigte dagegen keinerlei Einfluss auf die JNK-Aktivierung, womit ein unspezifischer Effekt durch das Lösungsmittel des verwendeten Inhibitors ausgeschlossen werden konnte.

Nachdem damit die Funktionsfähigkeit des JNK-II-Inhibitors als potentieller Hemmstoff von JNK gesichert war, sollte des Weiteren die Toxizität des Inhibitors bzw. der Zusammenhang des Inhibitors mit dem apoptotischen Zelltod geprüft werden. Im Zytotoxizitätsassay wurden die Zellen analog zum zuvor durchgeführten Westernblot-Experiment stimuliert. Hierbei erwiesen sich die Colo 357 Bcl-XL Zellen in jeglichen Kombinationen von TRAIL-His, DMSO und JNK-II-Inhibitor als resistent gegenüber Apoptose (Bild 7b). Bei den Colo 357 VK Zellen war dagegen eine deutliche Toxizität von TRAIL-His zu beobachten, welche auch nicht durch Hemmung der JNK-Aktivierung mittels JNK-II-Inhibitor verhindert werden konnte. Damit erwies sich die Aktivierung von JNK als nicht essentiell für die TRAIL-vermittelte Induktion von Apoptose in Colo 357 Zellen. Diese Beobachtung korreliert mit der in Bild 3 dargestellten Unabhängigkeit von TRAIL-induzierter Apoptose und JNK-Aktivierung.

Um schließlich den Zusammenhang zwischen der JNK-Aktivierung und der TRAIL-vermittelten IL-8-Produktion in Colo 357 Zellen zu analysieren, wurde der Einfluss des JNK-II-Inhibitors auf die TRAIL-induzierte IL-8-Produktion mittels ELISA getestet. Die alleinige Stimulation der Colo 357 Bcl-XL Zellen mit TRAIL führte erwartungsgemäß zu einer signifikanten Produktion von IL-8, welche auch durch zusätzliche Behandlung der Zellen mit DMSO oder zVAD-fmk unbeeinflusst blieb (Bild 7c). Dagegen bewirkte die Verwendung des JNK-II-Inhibitors eine drastische Suppression der TRAIL-vermittelten IL-8-Produktion (Bild 7c). Damit erwies sich die Aktivierung von JNK als essentiell für die TRAIL-vermittelte Induktion von IL-8 in Colo 357 Bcl-XL Zellen.

a)

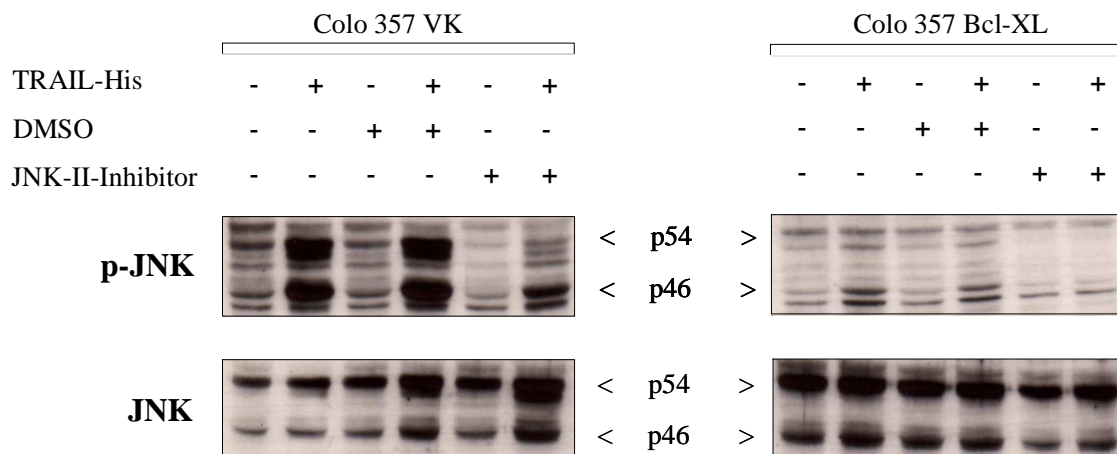


Bild 7a: Inhibition der JNK-Aktivierung in Colo 357 Zellen. Colo 357 VK Zellen und Colo 357 Bcl-XL Zellen wurden in 6 cm-Petrischalen kultiviert und nach Erhalt subkonfluenter Zelldichten teilweise mit JNK-II-Inhibitor (40 μ M/1:500) und/oder DMSO (1:500) 1 h vorstimuliert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 6 h in An- oder Abwesenheit von TRAIL-His (50 ng/ml) inkubiert. Nach Ablauf der Stimulation wurden die Zellen wie in Kap. 3.4.1 beschrieben mittels Sonifizierung lysiert. Je 15 μ l der Zelllysate wurden auf 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die aufgetrennten Proteine wurden nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit einem anti-Phospho-JNK-AK (p-JNK) detektiert. Zum Vergleich der eingesetzten Proteinmengen wurde zusätzlich nicht-phosphorylierte JNK mit einem anti-JNK-AK (JNK) nachgewiesen. Als Sekundär-AK wurde jeweils ein HRP-gekoppelter Kaninchen-AK verwendet.

b)

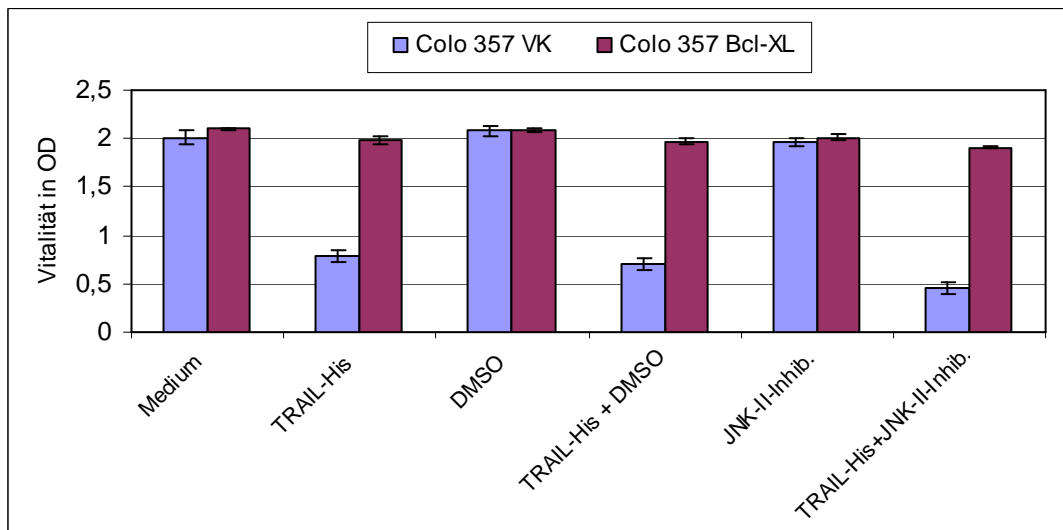


Bild 7b: Die Inhibition von JNK schützt Colo 357 Zellen nicht vor TRAIL-vermittelter Apoptose. Colo 357 VK und Colo 357 Bcl-XL Zellen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten (20.000 Zellen/well) kultiviert und nach Erhalt subkonfluenter Zelldichten teilweise mit JNK-II-Inhibitor (40 μ M/1:500) oder DMSO (1:500) 1 h vorstimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit TRAIL-His (50 ng/ml) versehen und 16 h inkubiert.

c)

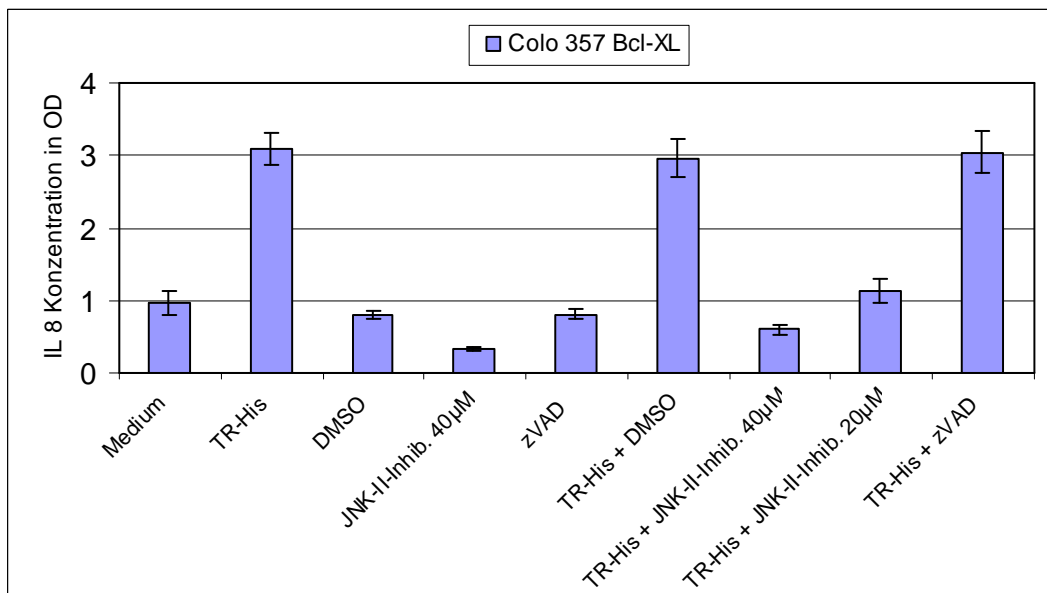


Bild 7c: Die Inhibition von JNK hemmt die TRAIL-vermittelte IL-8 Produktion in Colo 357 Zellen. Colo 357 Bcl-XL Zellen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten (20.000 Zellen/well) kultiviert und mit JNK-II-Inhibitor (40 μ M/1:500 bzw. 20 μ M/1:1000),

DMSO (1:500) oder zVAD-fmk (40 μ M/1:500) 1 h vorstimuliert. Anschließend wurden die Zellen in An- und Abwesenheit von TRAIL-His (50 ng/ml) inkubiert. Die Kulturüberstände wurden 6 h nach Zugabe von TRAIL abgenommen und mit Hilfe eines IL-8-spezifischen ELISA-Kits untersucht. Die produzierte Menge an IL-8 wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bestimmt.

4.5.2 Die Inhibition des Proteasoms hemmt die TRAIL-vermittelte IL-8-Produktion in Colo 357 Zellen und sensitiviert die Zellen für Apoptose

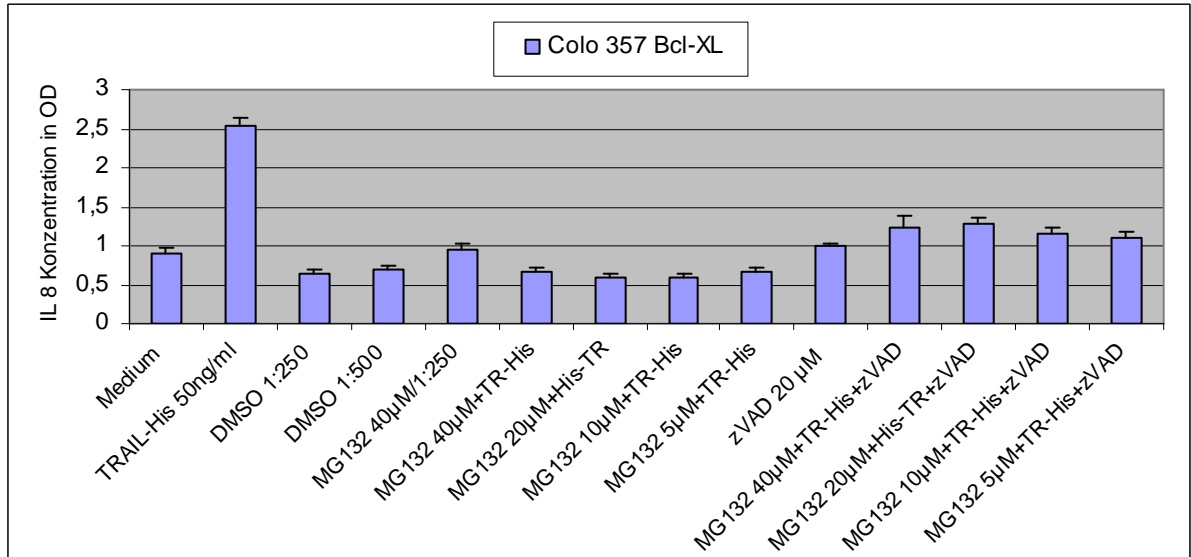
Nach Verwendung eines JNK-Inhibitors zur Darstellung der Zusammenhänge zwischen der Aktivierung von JNK und der TRAIL-vermittelten Induktion von IL-8 sollte auch der Einfluss von NF κ B auf die TRAIL-induzierte IL-8-Produktion in Colo 357 Zellen untersucht werden. Für den NF κ B-Signalweg spielt das Vorhandensein eines intakten Proteasoms eine wichtige Rolle, da die Degradation des NF κ B-Inhibitors I κ B α durch das 26S Proteasom essentiell für die Aktivierung von NF κ B ist (siehe Kap. 1.5.1). Deshalb wurde der Zusammenhang zwischen TRAIL-induzierter NF κ B-Aktivierung und der Expression von IL-8 durch Verwendung des spezifischen Proteasominhibitors MG-132 analysiert. Der Inhibitor wurde hierbei in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt und seine Wirkung auf die TRAIL-induzierte IL-8-Produktion in Colo 357 Bcl-XL Zellen mittels ELISA getestet. Außerdem wurde der Effekt von MG-132 in Anwesenheit von zVAD-fmk betrachtet. Wie in Bild 8a zu erkennen, bewirkte der Proteasominhibitor MG-132 eine starke Suppression der TRAIL-vermittelten IL-8-Produktion. Bemerkenswerterweise wurde die durch MG-132 verursachte Hemmung der TRAIL-induzierten IL-8-Produktion bei zusätzlicher Verwendung von zVAD-fmk wieder geringfügig verstärkt.

Parallel zur Durchführung des ELISA-Experiments wurde im Zytotoxizitätsassay die Apoptoserate der Zellen nach gleichartiger Stimulation getestet. Hierbei zeigte sich, dass die Verwendung des Proteasominhibitors MG-132 zu einer Sensitivierung der zuvor geschützten Colo 357 Bcl-XL Zellen für TRAIL-vermittelte Apoptose führte (Bild 8b). Die alleinige Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor oder seinem Lösungsmittel DMSO war dagegen nicht toxisch. Damit konnte eine unspezifische

Induktion des apoptotischen Zelltods durch MG-132 bzw. durch das Lösungsmittel des Inhibitors ausgeschlossen werden. Interessanterweise konnte der Caspaseinhibitor zVAD-fmk die Apoptoseresistenz der Colo 357 Bcl-XL Zellen wiederherstellen. Denn die Vitalität der Zellen war deutlich erhöht, wenn sie neben der Stimulation mit TRAIL-His und MG-132 zusätzlich mit zVAD-fmk behandelt wurden (Bild 8b). Werden die Ergebnisse aus Bild 8a und 8b nebeneinander betrachtet, sind insbesondere die Effekte in Anwesenheit von zVAD-fmk zu beachten. Denn einerseits konnte zVAD-fmk die durch MG-132 sensitivierten Colo 357 Bcl-XL Zellen vor Apoptose schützen. Andererseits war zVAD-fmk nicht in der Lage, die durch MG-132 verursachte Hemmung der TRAIL-vermittelten IL-8-Produktion wieder vollständig aufzuheben, wobei es bemerkenswerterweise eine geringfügige Erhöhung der IL-8-Bildung bewirkte.

Zusammenfassend impliziert die Inhibition der IL-8-Produktion durch Hemmung des Proteasoms, dass neben der JNK-Aktivierung (siehe Kap. 4.5.1) auch die Aktivierung von NF κ B für die TRAIL-vermittelte IL-8-Produktion in Colo 357 Zellen notwendig ist.

a)



b)

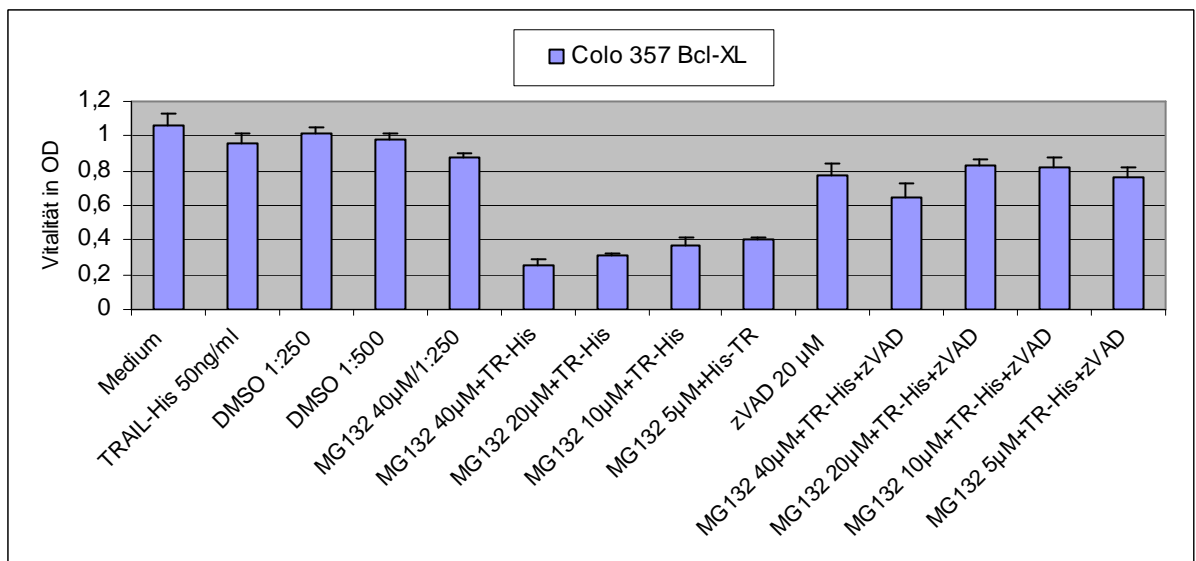


Bild 8: Die Inhibition des Proteasoms hemmt die TRAIL-vermittelte IL-8-Produktion in Colo 357 Zellen und sensitiviert die Zellen für Apoptose.

Bild 8a: Colo 357 Bcl-XL Zellen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten (10.000 Zellen/well) kultiviert und mit DMSO (1:250 bzw. 1:500), MG 132 (40 µM/1:250, 20 µM/1:500, 10µM/1:1000 bzw. 5 µM/1:2000) und/oder zVAD-fmk (20 µM) 1 h vorinkubiert. Die Zellen wurden anschließend in An- und Abwesenheit von TRAIL-His (50 ng/ml) inkubiert. Die Kulturüberstände wurden 6 h nach Zugabe von TRAIL abgenommen und mit Hilfe eines IL-8-spezifischen ELISA-Kits untersucht. Die

Quantifizierung der gebildeten IL-8 Menge erfolgte hierbei durch Messung der optischen Dichte (OD).

Bild 8b: Colo 357 Bcl-XL Zellen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten (10.000 Zellen/well) kultiviert und wie in Bild 8a beschrieben stimuliert. Die Vitalitätsbestimmung erfolgte 6h nach Zugabe von TRAIL durch Kristallviolett-färbung und anschließende Messung der optischen Dichte (OD).

5 Diskussion

5.1 Überexpression von Bcl-XL schützt Colo 357 Zellen vor TRAIL-vermittelter Apoptose

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mechanismen der nicht-apoptotischen Signaltransduktion von TRAIL untersucht. Im Mittelpunkt stand dabei die Analyse der TRAIL-vermittelten Aktivierung der MAPK-Kaskaden und des Transkriptionsfaktors NFκB. Die Untersuchungen wurden primär mit der humanen Pankreaskarzinomzelllinie Colo 357 durchgeführt. Um die nicht-apoptotische Signaltransduktion ohne störenden Einfluss von Apoptose untersuchen zu können, wurden die Colo 357 Zellen durch Überexpression von Bcl-XL vor Apoptose geschützt. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Bcl-XL in verschiedenen Tumorzelllinien, so auch in Pankreaskarzinomzellen, zur Blockierung der TRAIL-vermittelten Apoptose führt (Fulda et al., 2002; Munshi et al., 2001; Hinz et al., 2000). Die Blockierung des apoptotischen Programms stellt neben zahlreichen anderen Vorgängen ein Schlüsselereignis bei der onkogenen Transformation und der Etablierung von Tumoren dar (Hanahan & Weinberg, 2000). Häufig trägt dabei die Disregulation von Bcl-XL oder anderen anti-apoptotisch wirkenden Vertretern der Bcl-2-Familie zur Ausbildung der Apoptoseresistenz bei. Die Verwendung Bcl-XL-exprimierender Pankreaskarzinomzellen (Colo 357 Bcl-XL Zellen) in der vorliegenden Arbeit stellte daher ein sehr gutes Modell für die Untersuchung der nicht-apoptotischen Signaltransduktion von TRAIL unter pathophysiologischen Bedingungen dar. Die Bcl-XL-überexprimierenden Colo 357 Zellen waren vor TRAIL-induzierter Apoptose geschützt (Bild 2b, d, f), wohingegen Colo 357 Zellen, die mit leerem Vektor transfiziert worden waren (Colo 357 VK Zellen), auf alle drei verwendeten Arten von löslichem rekombinantem TRAIL toxisch reagierten (Bild 2a, c, e).

Alle drei eingesetzten TRAIL-Reagenzien waren sog. getaggte Formen von löslichem TRAIL: erstens TRAIL-His mit N-terminalem Polyhistidin-Tag, zweitens mit Zink versetztes TRAIL mit N-terminalem FLAG-Tag, welches mittels dem anti-FLAG monoklonalen Antikörper M2 quervernetzt wurde sowie drittens humanes superKiller TRAIL ebenfalls mit His-Tag am N-Terminus. Der Grund für die Verwendung verschiedener Arten von getagtem löslichem TRAIL bei der Untersuchung der TRAIL-Sensitivität von Colo 357 Zellen beruhte auf Beobachtungen in früheren Studien, in denen verschiedene Präparationen von TRAIL eine sehr unterschiedliche Toxizität aufwiesen (Lawrence et al., 2001; Hao et al., 2001; Jo et al., 2000; Nitsch et al., 2000), welche auf eine differentielle Stimulation der beiden TRAIL-Todesrezeptoren zurückgeführt werden konnte (Wajant et al., 2001) (siehe auch Kap.1.6). So sind die getagten TRAIL-Formen durch eine verminderte Löslichkeit und erhöhte Tendenz zur Aggregation gekennzeichnet (Almasan & Ashkenazi, 2003). Dadurch erlangen diese Varianten von löslichem TRAIL die Fähigkeit, analog zu membrangebundenem TRAIL auf die TRAIL-Todesrezeptoren zu wirken (Wajant et al., 2001). Folglich wird nicht nur der TRAIL-R1 stimuliert, sondern auch der TRAIL-R2, welcher vorwiegend durch die membrangebundene Ligandenform aktiviert wird (Wajant et al., 2001). In den hier verwendeten Bcl-XL-überexprimierenden Colo 357 Zellen induzierte keines der eingesetzten getagten TRAIL-Reagenzien Apoptose. Bei den Colo 357 VK Zellen unterschieden sich die drei TRAIL-Formen nur bezüglich der benötigten Konzentration zur Auslösung vergleichbarer Apoptosestärken. Demnach konnten die drei TRAIL-Präparationen im Verlauf der Arbeit analog eingesetzt werden.

Neben TRAIL wurden die verwendeten Zellen teilweise mit dem Proteinsyntheseinhibitor CHX behandelt. Durch die Verwendung von CHX kann eine verstärkte Apoptoseinduktion über Todesrezeptoren erreicht werden. Der Haupteffekt von CHX ist die Hemmung der Proteinsynthese (Smith et al., 1997). Dieser Effekt wirkt sich vorwiegend auf Proteine mit kurzer Lebensdauer, wie z.B. FLIP, aus (Wajant et al., 2000). Für FLIP wiederum ist bereits mehrfach ein inhibitorischer Effekt auf die TRAIL-vermittelte Apoptose durch Inhibition der Caspase-8-Aktivierung (Krueger et al., 2001b; Scaffidi et al., 1999) beschrieben worden. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte in Colo 357 VK Zellen die TRAIL-induzierte Apoptose durch CHX verstärkt werden, wohingegen sich die Bcl-XL-überexprimierenden Colo 357 Zellen auch in

Gegenwart von CHX als Apoptose-resistent erwiesen (Bild 2). Die hier nachgewiesene Apoptoseresistenz der Bcl-XL-überexprimierenden Colo 357 Zellen erlaubte die Charakterisierung der verwendeten Zellen als sog. Typ-II-Zellen. Dieser Typ von Zellen ist dadurch gekennzeichnet, dass zur Induktion der Apoptose eine Amplifikation des DISC-Signals über den mitochondrialen Apoptosesignalweg notwendig ist, durch welchen eine ausreichende Caspase-3-Aktivierung gewährleistet wird (Wajant, 2003a). Die Überexpression von Bcl-XL führt in Typ-II-Zellen zur Blockierung der Apoptose, indem die Oligomerisation von Bax/Bak inhibiert wird, welche essentiell für den mitochondrialen Apoptosesignalweg ist (Wang X, 2001). Eine Wiederherstellung der Apoptosesensitivität mittels CHX ist hierbei nicht ausreichend effektiv (Bild 2b, d, f), da zwar eine FLIP-vermittelte Caspase-8-Inhibition durch CHX gehemmt werden kann. Die Überexpression von Bcl-XL blockiert aber weiterhin den für den apoptotischen Zelltod nötigen mitochondrialen Signalweg und damit eine ausreichende Caspase-3-Aktivierung.

5.2 TRAIL aktiviert in Colo 357 Zellen die MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 unabhängig vom apoptotischen Zelltod, aber abhängig von der Caspaseaktivität

Die MAPK-Kaskaden stellen für eine Zelle essentielle Signalwege dar, über welche Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose reguliert werden können. Die nicht-apoptotischen Effekte dieser Signalwege können als Gegengewicht zur Aktivierung des apoptotischen Signalweges wirken. Für die MAP-Kinase JNK sind sowohl pro- als auch anti-apoptotische Funktionen bekannt. Der Effekt der JNK-Aktivierung ist hierbei unter anderem abhängig vom Zelltyp, vom aktivierten Rezeptor sowie von anderen gleichzeitig aktivierten Signalwegen (Liu & Lin, 2005). Die MAP-Kinase ERK ist dagegen vornehmlich für Zellwachstum zuständig (Gredinger et al., 1998) und der MAP-Kinase p38 werden vor allem Funktionen für die Immunregulation und Inflammation zugeschrieben (Ono & Han, 2000). Die Aktivierung der MAPK-Kaskaden kann über sehr variable Stimuli wie Stressfaktoren, UV-Bestrahlung,

Wachstumsfaktoren oder Zytokine erfolgen. Obwohl die Zytokine TRAIL und FasL hauptsächlich durch ihre Fähigkeit, Apoptose zu induzieren, gekennzeichnet sind, konnte in vergangenen Studien für diese Liganden die Induktion der nicht-apoptotisch wirkenden MAPK-Kaskaden nachgewiesen werden (Lin et al., 2000)

In der vorliegenden Arbeit konnte die Induktion des JNK-, ERK- und p38-Signalweges durch TRAIL ebenfalls gezeigt werden. Der Nachweis wurde hierbei parallel bei den Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen und bei den Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen durchgeführt, um die Aktivierung der MAP-Kinasen in Zusammenhang mit der Auslösung von Apoptose zu überprüfen. Interessanterweise konnten sowohl in Colo 357 VK Zellen als auch in Colo 357 Bcl-XL Zellen nach TRAIL-Stimulation die aktivierten phosphorylierten MAP-Kinasen detektiert werden (Bild 3). Demzufolge verläuft in diesen Zellen die Induktion des JNK-, ERK- und p38-Signalweges unabhängig von der Auslösung des apoptotischen Zelltods. So kann TRAIL mehrere unabhängig voneinander ablaufende Signalwege induzieren: einerseits den Apoptose-auslösenden Signalweg, andererseits MAPK-aktivierende Signalwege. Aus dieser Erkenntnis ergab sich die Frage, ob die TRAIL-vermittelte Aktivierung der verschiedenen MAP-Kinasen auch unabhängig von den für die Apoptose essentiellen Caspasen verläuft. So wurde die TRAIL-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 in Anwesenheit des Caspaseinhibitors zVAD-fmk untersucht, welcher die Induktion von Apoptose inhibiert. Hierbei war sowohl für Colo 357 VK Zellen als auch für Colo 357 Bcl-XL Zellen eine deutliche Suppression der TRAIL-vermittelten MAPK-Aktivierung nachweisbar (Bild 3). Diese Daten zeigen somit, dass in Colo 357 Zellen die TRAIL-vermittelte Induktion des JNK-, ERK- und p38-Signalweges zwar Apoptose-unabhängig, aber dennoch Caspase-abhängig abläuft.

Die in dieser Arbeit demonstrierten Ergebnisse zur TRAIL-vermittelten Aktivierung der MAP-Kinase JNK stehen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer früheren Studie, bei der sowohl in Apoptose-sensitiven als auch in Apoptose-resistenten HeLa-Zellen eine TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung nachgewiesen wurde (Muhlenbeck et al., 1998). Die Apoptoseresistenz wurde in dieser Studie allerdings nicht durch Bcl-XL-Überexpression, sondern durch Expression einer dominant-negativen Mutante von FADD erreicht, wodurch in den HeLa-Zellen die Caspasen-8 und -3 inaktiv waren. Bei

den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen dagegen war Caspase-8 aktiv und nur Caspase-3 inaktiv (Bild 5). Dennoch konnte auch in den HeLa-Zellen durch Verwendung von zVAD-fmk die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung noch supprimiert werden und damit in Analogie zu den hier vorgestellten Ergebnissen ein Apoptose-unabhängiger, aber Caspase-abhängiger JNK-Signalweg beschrieben werden (Muhlenbeck et al., 1998).

Die Notwendigkeit aktivierter Caspasen für die Aktivierung der MAP-Kinase JNK konnte in anderen Arbeiten nicht nur für das Zytokin TRAIL, sondern auch für FasL gezeigt werden. Zudem wurde für FasL bereits eine Caspase-abhängige Aktivierung der MAP-Kinase p38 demonstriert (Lenczowski et al., 1997; Juo et al., 1997; Cahill et al., 1996). Für TRAIL lagen dagegen bisher noch keine Berichte für eine Caspase-abhängige Aktivierung der MAP-Kinase p38 vor, ebenso wenig wie für die MAP-Kinase ERK. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse zur Apoptose-unabhängigen, aber Caspase-abhängigen TRAIL-vermittelten MAPK-Aktivierung stellen somit eine Erweiterung zu diesen vorherigen Studien dar.

5.3 Die Caspaseabhängigkeit der TRAIL-vermittelten JNK-Aktivierung ist zelltypspezifisch

In der bereits erwähnten Studie von Muhlenbeck über die Caspase-abhängige TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung in Apoptose-sensitiven und Apoptose-resistenten HeLa-Zellen wurde für Kym-1-Zellen ein Caspase-unabhängiger TRAIL-induzierter JNK-Signalweg beschrieben (Muhlenbeck et al., 1998). So wurde in dieser Studie zwar in den verwendeten HeLa-Zellen in Anwesenheit von zVAD-fmk die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung supprimiert. In Kym-1-Zellen dagegen hatte der gleiche Inhibitor keinen oder sogar einen stimulierenden Effekt auf die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung (Muhlenbeck et al., 1998). In Anlehnung an diese Studie wurde in der vorliegenden Arbeit als Vergleich zu den Colo 357 Zellen die Fibroblastenzelllinie SV 80 bezüglich der Aktivierung der MAP-Kinase JNK untersucht. In Analogie zu dem

Modellsystem mit Apoptose-sensitiven und Apoptose-resistenten Colo 357 Zellen wurden neben parentalen Apoptose-sensitiven SV 80 Zellen (SV 80 wt) auch FLIP-L-GFP-exprimierende Apoptose-resistente SV 80 Zellen (SV 80 FLIP-L) verwendet. In SV 80 wt Zellen hatte zVAD-fmk im Gegensatz zu Colo 357 VK Zellen keinen hemmenden, sondern sogar einen verstärkenden Effekt auf die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung (Bild 4c), womit die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung in diesem Zelltyp nachweislich Caspase-unabhängig verlief. Da sowohl die verwendeten Colo 357 VK Zellen als auch die SV 80 wt Zellen Apoptose-sensitiv waren (Bild 2a, c, e, Bild 4a-b), konnte ausgeschlossen werden, dass der konträre Effekt von zVAD-fmk durch unterschiedliche TRAIL-Apoptosesensitivitäten verursacht wurde. Stattdessen verläuft die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung je nach Zelltyp Caspase-abhängig oder Caspase-unabhängig. Erwartungsgemäß führte TRAIL nicht nur in Apoptose-sensitiven SV 80 wt Zellen, sondern auch in Apoptose-resistenten SV 80 FLIP-L Zellen zur JNK-Aktivierung, welche durch zVAD-fmk nicht hemmbar war (Bild 4d). Damit konnte für die Zelllinie SV 80 sowohl ein Apoptose- als auch ein Caspase-unabhängiger TRAIL-vermittelter JNK-Signalweg nachgewiesen werden. Die JNK-Aktivierung durch TRAIL ist demnach unabhängig vom Zelltyp nicht an die Auslösung von Apoptose gebunden, aber abhängig vom Zelltyp erfolgt sie entweder Caspase-abhängig oder Caspase-unabhängig.

Mit diesen Daten können die Ergebnisse der beschriebenen Studie über HeLa- und Kym-1-Zellen (Muhlenbeck et al., 1998) bestätigt werden. Auch für das Zytokin FasL wurden bereits analoge zelltypspezifische Eigenschaften der JNK-Aktivierung beschrieben (Lenczowski et al., 1997; Yang et al., 1997; Cahill et al., 1996). Die Ähnlichkeiten von FasL und TRAIL können eine wichtige Überlegung klären. So könnte die Caspase-abhängige und Caspase-unabhängige TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung in Colo 357 und SV 80 Zellen auf die Bindung unterschiedlicher TRAIL-Rezeptoren zurückgeführt werden. Dies ist aber eher unwahrscheinlich, da Fas, der einzige bekannte Rezeptor für FasL, ebenfalls zelltypspezifisch Caspase-abhängig und Caspase-unabhängig JNK zu aktivieren vermag. Insgesamt kann TRAIL also mehrere unabhängige Signalwege induzieren: erstens einen Apoptose-auslösenden Signalweg; zweitens Caspase-abhängige MAPK-Signalwege; und drittens einen zumindest für die MAP-Kinase JNK nachgewiesenen Caspase-unabhängigen MAPK-Signalweg.

5.4 Sowohl in Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen als auch in Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen wird Caspase-8 nach TRAIL-Stimulation aktiviert

Nachdem für die Zelllinie Colo 357 die TRAIL-vermittelte JNK-, ERK- und p38-Aktivierung als Caspase-abhängig nachgewiesen werden konnte, war es von Interesse, die Aktivierung von Caspasen in diesen Zellen näher zu untersuchen. In den Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen konnte erwartungsgemäß die Prozessierung der Pro-Caspase-8 nach Stimulation mit TRAIL und CHX nachgewiesen werden (Bild 5). Da die Prozessierung einer Caspase aber nicht zwangsläufig mit ihrer Aktivierung gleichgesetzt werden kann, wurde für den sicheren Nachweis von aktiver Caspase-8 die Spaltung der Caspase-8-Substrate Bid und RIP im Westernblot untersucht. Hierbei zeigte sich in Colo 357 VK Zellen sowohl eine TRAIL-induzierte Spaltung von Bid als auch von RIP, womit das Vorhandensein von aktiver Caspase-8 nach TRAIL-Stimulation in diesen Zellen sichergestellt war (Bild 5). Da die Aktivierung von Caspase-8 essentiell für die Auslösung der TRAIL-vermittelten Apoptose ist, passte dieses Ergebnis gut zu der nachgewiesenen Sensitivität dieser Zellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose (Bild 2). Interessanterweise war aber auch in den Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen eine TRAIL-induzierte Prozessierung der Caspase-8-Vorstufe sowie die Spaltung der Caspase-8-Substrate Bid und RIP zu beobachten (Bild 5). In den Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen konnte außerdem indirekt anhand der Spaltung des Caspase-3-Substrates PARP die Aktivierung von Caspase-3 nach Stimulation mit TRAIL und CHX nachgewiesen werden (Bild 5). In den Bcl-XL-überexprimierenden Colo 357 Zellen konnte TRAIL hingegen nicht die Spaltung von PARP induzieren, womit eine Aktivierung der Effektorcaspase-3 in diesen Zellen ausgeschlossen werden konnte. Die Aktivierung der Caspase-3 ist gut vereinbar mit dem apoptotischen Zugrundegehen der Colo 357 VK Zellen. Die Blockierung der Caspase-3-Aktivierung in Colo 357 Bcl-XL Zellen dagegen scheint verantwortlich für deren Schutz vor TRAIL-vermittelter Apoptose zu sein. Die anti-apoptotische

Wirkungsweise von Bcl-XL wurde in diesen Zellen demnach durch eine Unterbindung der Caspase-3-Aktivierung bei einer unveränderten Caspase-8-Prozessierung vermittelt. Die Aktivierung von Caspase-8 durch TRAIL muss also nicht zwangsläufig mit der Auslösung des apoptotischen Zelltods assoziiert sein. Stattdessen scheint das entscheidende Kriterium für das apoptotische Zugrundegehen der Zelle die Aktivierung der Effektorcaspase-3 zu sein. Denn die Aufgabe dieser Caspase ist die Spaltung und Inaktivierung essentieller zellulärer Proteine wie z.B. PARP sowie die Aktivierung DNA-spaltender Proteine, was nicht mehr mit dem Überleben der Zelle vereinbar ist.

Bemerkenswert ist, dass die TRAIL-induzierte Caspase-8-Prozessierung ebenso wie die Spaltung von Bid und RIP in beiden Zelltransfektanden in Gegenwart von CHX verstärkt nachweisbar war (Bild 5). Werden diese Daten nun mit den Ergebnissen zur Caspase-abhängigen TRAIL-vermittelten MAPK-Aktivierung (Bild 3) verglichen, fällt auch hier auf, dass die MAP-Kinasen durch TRAIL insbesondere in Anwesenheit von CHX aktiviert wurden. Damit könnte eine mögliche Bedeutung von Caspase-8 für die Caspase-abhängige TRAIL-vermittelte MAPK-Aktivierung in Erwägung gezogen werden. CHX könnte hierbei den MAPK-Signalweg durch Hemmung der FLIP-vermittelten Caspase-8-Inhibition verstärken. In der bereits erwähnten Studie von Muhlenbeck war zwar die TRAIL-vermittelte Caspase-abhängige JNK-Aktivierung in HeLa-Zellen auch in Abwesenheit von aktivierter Caspase-8 nachweisbar (Muhlenbeck et al., 1998), es muss jedoch zwischen zytoplasmatischer und DISC-gebundener Caspase-8 unterschieden werden. So war in den verwendeten HeLa-Zellen mit dominant-negativer FADD-Mutante möglicherweise nur die DISC-gebundene Caspase-8 inaktiv, die zytoplasmatische Caspase-8 jedoch weiterhin aktiv. Anhand der hier vorgestellten Daten kann jedoch keine endgültige Aussage darüber getroffen werden, welche Caspasen in Colo 357 Zellen für die Caspase-abhängigen TRAIL-induzierten MAPK-Signalwege notwendig sind.

Des Weiteren bleibt auch die Frage offen, welche Adaptermoleküle in Colo 357 Zellen nach TRAIL-Stimulation an die TRAIL-Todesrezeptoren rekrutiert werden, um die MAPK-Kaskaden zu induzieren. In einer vergangenen Studie konnte bereits neben dem Adapterprotein TRAF2 die Serin-Threonin-Kinase RIP als essentieller Bestandteil für die TRAIL-vermittelte Aktivierung der JNK nachgewiesen werden (Lin et al., 2000). So

wurde durch die Verwendung dominant-negativer Mutanten von RIP oder TRAF2 in HeLa-Zellen die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung blockiert (Lin et al., 2000). In den hier durchgeführten Untersuchungen mit Colo 357 Zellen wurde das Adapterprotein RIP nach sechstündiger Stimulation mit TRAIL und CHX vollständig gespalten und damit inaktiviert. Trotzdem konnte in diesen Zellen nach sechsstündiger Stimulation mit TRAIL und CHX auch die aktivierte JNK nachgewiesen werden. Anhand der vorgestellten Daten kann postuliert werden, dass auch ohne eine aktive Serin-Threonin-Kinase RIP die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung möglich ist und demnach auch ein RIP-unabhängiger TRAIL-vermittelter JNK-Signalweg existiert. Da RIP durch Caspasen gespalten und inaktiviert wird, liegt die Vermutung nahe, dass der RIP-unabhängige Signalweg in den Zellen genutzt wird, in denen die TRAIL-vermittelte MAPK-Aktivierung Caspase-abhängig verläuft, wie es beispielsweise in den hier verwendeten Colo 357 Zellen der Fall ist. Andererseits könnte die Inaktivierung von RIP durch Caspase-8 auch einen negativen Rückkopplungsmechanismus im Rahmen eines RIP-abhängigen JNK-Signalweges darstellen.

5.5 TRAIL induziert IL-8 in Colo 357 Zellen

Die Fähigkeit von TRAIL, den Transkriptionsfaktor NF κ B über seine korrespondierenden Todesrezeptoren zu induzieren, wurde bereits in mehreren Veröffentlichungen beschrieben (Wajant et al, 2004; Hu et al., 1999). Die Aktivierung des NF κ B-Signalweges führt zur Induktion einer Vielzahl spezifischer Zielgene, wie z.B. IL-8. An der Regulation der IL-8-Expression sind neben des NF κ B-Signalweges auch der JNK- und der p38-Signalweg beteiligt (Hoffmann et al., 2002). Demnach stellte die Untersuchung der TRAIL-vermittelten IL-8-Produktion mittels ELISA eine gute Methode dar, um die TRAIL-induzierte Aktivierung der MAPK-Signalwege und des NF κ B-Signalweges in Colo 357 Zellen näher zu analysieren.

In den ELISA-Experimenten konnte sowohl bei den Colo 357 VK Zellen als auch bei den Colo 357 Bcl-XL Zellen nach Stimulation mit TRAIL die Bildung von IL-8

detektiert werden (Bild 6a). Die Zellen waren hierbei mit dem Caspaseinhibitor zVAD-fmk vorbehandelt worden, um in den Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen die Apoptose zu unterdrücken. Denn die Apoptose wirkt hemmend auf den NFκB-Signalweg, indem Caspasen einige für diesen Signalweg wichtige Proteine spalten (Wajant et al., 2003b). In Einklang mit diesem Phänomen konnte in den Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen auch ohne Vorbehandlung mit zVAD-fmk die Expression von IL-8 durch TRAIL-Stimulation induziert werden (Bild 6b). Die maximale Signalstärke von produziertem IL-8 wurde in beiden Colo 357 Zelltransfektanden nach sechsständiger TRAIL-Stimulation erreicht (Bild 6a). Interessanterweise war auch das Signal der aktivierten MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 nach sechs Stunden TRAIL-Behandlung am größten (Bild 3).

Der Zusammenhang zwischen der TRAIL-induzierten IL-8-Produktion und der Aktivierung des JNK-Signalweges sowie des NFκB-Signalweges wurde durch Verwendung von Inhibitoren der jeweiligen Signalwege näher untersucht.

5.5.1 Die Aktivierung von JNK ist nicht essentiell für den apoptotischen Zelltod, aber für die TRAIL-vermittelte IL-8-Produktion in Colo 357 Zellen

Um die Bedeutung der MAP-Kinase JNK für die TRAIL-induzierte IL-8-Expression in Colo 357 Zellen zu überprüfen, wurde ein spezifischer Inhibitor der JNK eingesetzt. Mittels Westernblot konnte vorab sichergestellt werden, dass der verwendete sog. JNK-II-Inhibitor seinen Zweck bei der Hemmung der TRAIL-vermittelten JNK-Aktivierung ausreichend erfüllt (Bild 7a). Anhand eines Zytotoxizitätsassays wurde zudem eine mögliche Toxizität des Inhibitors bzw. seines Lösungsmittels DMSO ausgeschlossen (Bild 7b). Die Untersuchungen mittels Zytotoxizitätsnachweis konnten außerdem die bereits nachgewiesene Unabhängigkeit des apoptotischen Zelltods vom JNK-Signalweg (Bild 3) bestätigen. Denn die Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen konnten auch durch Inhibition von JNK mittels JNK-II-Inhibitor nicht vor TRAIL-vermittelter Apoptose geschützt werden, womit sich die JNK-Aktivierung als nicht essentiell für die Auslösung von Apoptose erwies (Bild 7b).

Nach Überprüfen der Eigenschaften des JNK-II-Inhibitors wurde dessen Auswirkung auf die TRAIL-vermittelte IL-8-Produktion in Colo 357 Bcl-XL Zellen mittels ELISA untersucht. Hierbei zeigte sich in Anwesenheit des JNK-II-Inhibitors eine deutliche Suppression der TRAIL-induzierten IL-8-Bildung (Bild 7c). Damit konnte nachgewiesen werden, dass in Colo 357 Zellen die Aktivierung der JNK zur TRAIL-induzierten IL-8-Produktion beiträgt. Interessanterweise hatte der Caspaseinhibitor zVAD-fmk keinerlei Einfluss auf die TRAIL-vermittelte IL-8-Produktion in Colo 357 Bcl-XL Zellen (Bild 7c). Nachdem zuvor in diesen Zellen eine Verminderung der TRAIL-vermittelten JNK-Aktivierung in Anwesenheit von zVAD-fmk demonstriert worden war (Bild 3), hätte auch eine Verminderung der TRAIL-induzierten IL-8-Produktion in Anwesenheit von zVAD-fmk erwartet werden können. Denn wie anhand des JNK-II-Inhibitors nachgewiesen wurde, führte eine verminderte JNK-Aktivierung auch zu einer verminderten IL-8-Produktion. Eine plausible Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch ist, dass zVAD-fmk gleichzeitig eine sowohl positive als auch negative Wirkung auf die TRAIL-induzierte IL-8-Produktion in Colo 357 Zellen hat. So hemmt zVAD-fmk zwar einerseits die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung und supprimiert damit die IL-8-Produktion. Andererseits verstärkt zVAD-fmk aber über die Inhibition von Caspasen den NFκB-Signalweg, welcher sich im Folgenden neben der JNK-Aktivierung ebenfalls als wichtig für die TRAIL-vermittelte IL-8-Produktion in Colo 357 Zellen erwies.

5.5.2 Die Aktivierung von NFκB ist essentiell für die TRAIL-vermittelte IL-8-Produktion in Colo 357 Zellen

Um eine Beteiligung von NFκB an der TRAIL-induzierten IL-8-Expression in Colo 357 Zellen zu prüfen, wurde der Proteasominhibitor MG-132 eingesetzt. Ein funktionierendes Proteasom ist für die Aktivierung von NFκB unentbehrlich, da dieser Transkriptionsfaktor erst nach Degradation seines Inhibitors IκBα durch das 26S Proteasom aktiv werden kann (Baldi et al., 1996; Scherer et al., 1995). Der Einsatz des Proteasominhibitors MG-132 und die damit erzielte Hemmung des NFκB-Signalweges führte in Colo 357 Bcl-XL Zellen wie erwartet zu einer drastischen Suppression der

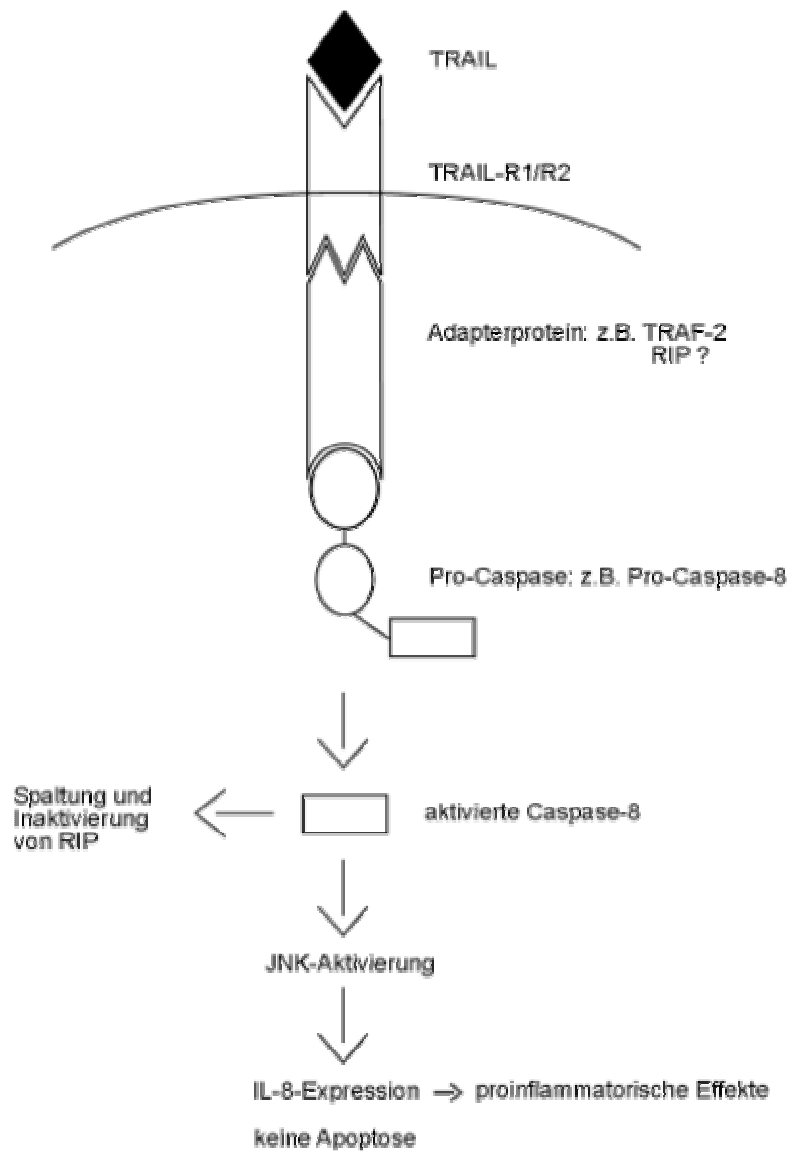
TRAIL-vermittelten IL-8-Produktion (Bild 8a). Es sei darauf hingewiesen, dass der eingesetzte Inhibitor MG-132 kein spezifischer Inhibitor des NF κ B-Signalweges ist. Es wird nur das Proteasom gehemmt, in welchem unter anderem der NF κ B-Inhibitor I κ B α degradiert wird. Die vorgestellten Ergebnisse sind demnach kein Beweis, aber ein deutlicher Hinweis dafür, dass neben der Aktivierung von JNK (Kap. 5.5.1) auch die NF κ B-Aktivierung für die TRAIL-induzierte IL-8-Produktion in Colo 357 Bcl-XL Zellen notwendig ist. Parallel zu diesem ELISA-Experiment wurde die Vitalität der Zellen nach gleichartiger Stimulation im Zytotoxizitätsassay untersucht. Interessanterweise wurden die zuvor Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen durch den Einsatz des Proteasominhibitors MG-132 für TRAIL-vermittelte Apoptose sensitiviert (Bild 8b). Die Möglichkeit einer derartigen Sensitivierung wurde bereits in früheren Studien beschrieben und darauf zurückgeführt, dass Proteasominhibitoren die IAP-vermittelte Degradation von SMAC/DIABLO und einigen Caspasen supprimieren (Leverkus et al., 2003).

Interessant ist der Vergleich der Effekte des Proteasominhibitors MG-132 auf die TRAIL-vermittelte IL-8-Produktion und auf die Apoptoseauslösung in Anwesenheit von zVAD-fmk. Hier zeigte sich einerseits, dass zVAD-fmk die durch MG-132 sensitivierten Colo 357 Bcl-XL Zellen vor Apoptose schützte. Andererseits konnte zVAD-fmk die durch MG-132 verursachte Hemmung der IL-8-Produktion nicht völlig verhindern. Die verminderte IL-8-Produktion war allerdings in Gegenwart von zVAD-fmk wieder geringfügig erhöht. Diesen Daten zufolge scheint der NF κ B-Signalweg durch MG-132 auf zwei Ebenen gehemmt worden zu sein: einerseits durch Inhibition der I κ B α -Degradation, andererseits durch Verstärkung des apoptotischen Signalweges, welcher durch die Aktivierung von Caspasen den NF κ B-Signalweg unterdrückt. Letzteres erklärt auch die Verstärkung der zuvor durch MG-132 supprimierten IL-8-Produktion in Anwesenheit von zVAD-fmk. Durch Inhibition von Caspasen hemmt zVAD-fmk die Apoptose und fördert damit die Aktivierung des NF κ B-Signalweges, wodurch die NF κ B-abhängige TRAIL-induzierte IL-8-Produktion in Colo 357 Zellen verstärkt wird. Den vorgestellten Ergebnissen ist demnach zu entnehmen, dass die TRAIL-induzierte NF κ B-Aktivierung in Colo 357 Zellen Caspase-sensitiv ist. In Einklang hiermit zeigen mehrere Studien, dass eine Inhibition der Apoptose durch

Caspaseinhibitoren die TRAIL-induzierte Stimulation des NF κ B-Signalweges verstärkt (Kumar-Sinha et al., 2002; Harper et al., 2001; Trauzold et al., 2001; Wajant et al., 2000).

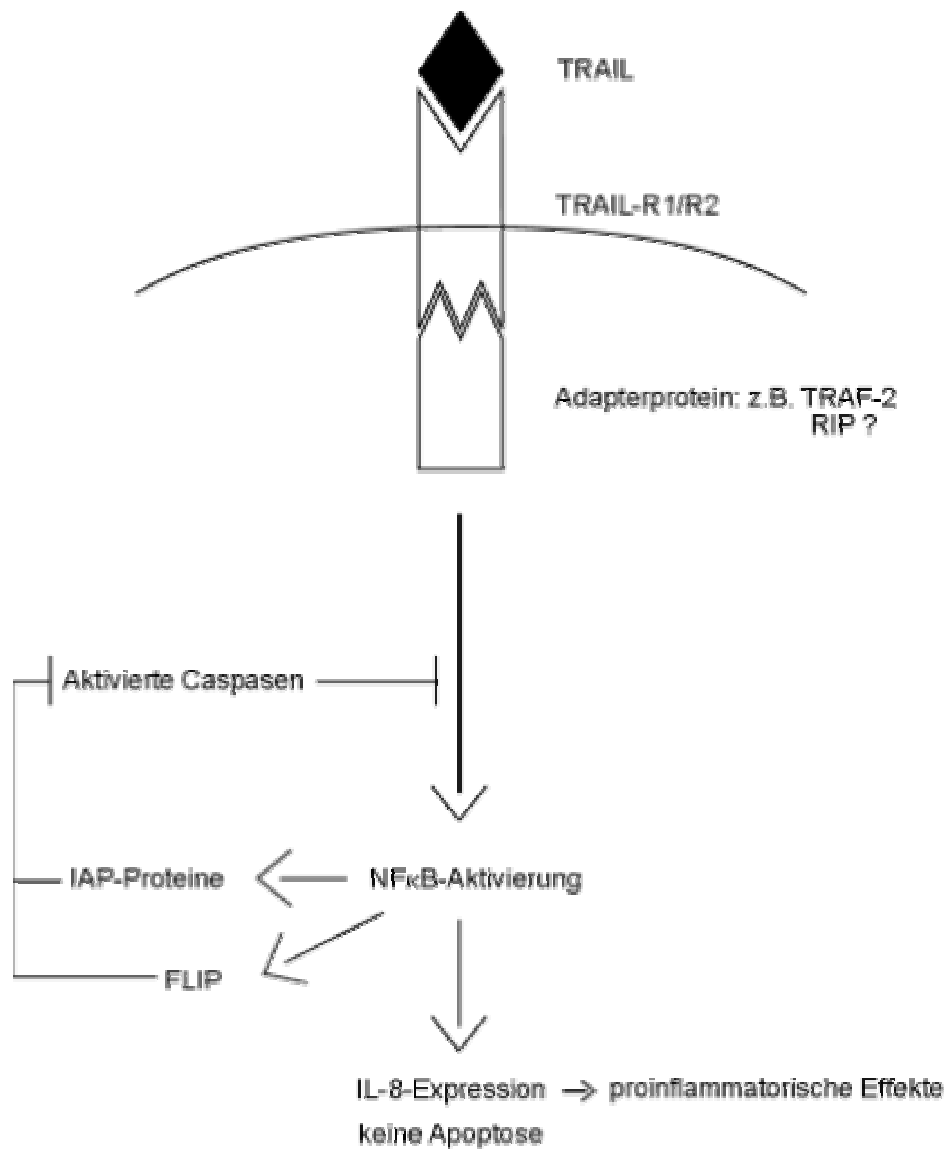
In vorherigen Studien wurde bereits postuliert, dass die TRAIL-vermittelte NF κ B-Aktivierung über einen RIP-abhängigen Caspase-sensitiven Signalweg verläuft. Neben FADD und TRAF2 (TNF-receptor associated factor 2) (Wajant et al., 2000) konnte auch RIP (receptor interacting protein) (Lin et al., 2000) eine Rolle bei der TRAIL-induzierten NF κ B-Aktivierung zugeordnet werden. RIP wurde im TRAIL-induzierten DISC detektiert (Harper et al. 2001) und auch eine RIP-vermittelte Aktivierung des IKK-Komplexes konnte nachgewiesen werden (Lin et al., 2000). Die Verwendung dominant-negativer RIP-Mutanten konnte die IKK-Aktivierung sogar fast komplett blockieren (Lin et al., 2000). Bei der TRAIL-vermittelten Apoptoseinduktion dagegen spielt RIP keine Rolle. Zudem konnte gezeigt werden, dass RIP von Caspase-8 in ein inaktives Fragment gespalten wird, das auf dominant-negative Art und Weise den NF κ B-Signalweg inhibiert (Lin et al., 1999; Martinon et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde in Colo 357 Bcl-XL Zellen die TRAIL-induzierte Aktivierung von Caspase-8 sowie die Spaltung und Inaktivierung von RIP demonstriert (Bild 5). Gleichzeitig wurde in diesen Zellen aber auch die TRAIL-vermittelte Aktivierung des NF κ B-Signalweges gezeigt (Bild 8a). Diese Ergebnisse sprechen für die Existenz eines RIP-unabhängigen TRAIL-induzierten NF κ B-Signalweges in Colo 357 Bcl-XL Zellen. Andererseits könnte die dargestellte RIP-Spaltung einen negativen Rückkopplungsmechanismus darstellen, durch welchen die TRAIL-vermittelte RIP-abhängige NF κ B-Aktivierung kontrolliert wird.

Die Bilder 9 und 10 sollen die nicht-apoptotische Signaltransduktion durch TRAIL mit Aktivierung von JNK und NF κ B und konsekutiver IL-8-Expression modellhaft veranschaulichen.



Colo 357 Bcl-XL Zellen

Bild 9: Modell der Caspase-abhängigen TRAIL-induzierten JNK-Aktivierung und IL-8-Expression in Colo 357 Bcl-XL Zellen. Die Aktivierung von Casapsen ist notwendig für die TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung. Caspase-8 spielt hierbei womöglich eine wichtige Rolle. Die JNK-Aktivierung wiederum ist essentiell für die IL-8-Produktion in Colo 357 Bcl-XL Zellen.



Colo 357 Bcl-XL Zellen

Bild 10: Modell der Caspase-sensitiven TRAIL-induzierten NFκB-Aktivierung und IL-8-Expression in Colo 357 Bcl-XL Zellen. Die Aktivierung von NFκB ist essentiell für die IL-8-Produktion in Colo 357 Bcl-XL-Zellen. Caspasen hemmen die NFκB-Aktivierung. Der Einsatz von Caspaseinhibitoren verstärkt deshalb die IL-8-Produktion.

5.6 Ausblick

Die vorgestellten Ergebnisse liefern neue Einblicke in die Regulation der nicht-apoptotischen Signaltransduktion von TRAIL und führen gleichzeitig zu interessanten Fragestellungen für zukünftige Projekte. So stellt sich beispielsweise die wichtige Frage, welche Caspasen im Einzelnen für die Caspase-abhängige TRAIL-vermittelte MAPK-Aktivierung notwendig sind und vor allem ob auch die für die TRAIL-vermittelte Apoptose essentielle Caspase-8 hierbei beteiligt ist. Für den nahe verwandten Todesrezeptor Fas wurde beispielsweise die mögliche Existenz eines aus FADD und Caspase-8 bestehenden Kern-Signalkomplexes beschrieben, welcher sowohl für die apoptotische als auch für die nicht-apoptotische Signaltransduktion essentiell ist (Kreuz et al., 2004). Des Weiteren ist auch die genauere Abklärung der Bedeutung von RIP für den TRAIL-vermittelten JNK- und NF κ B-Signalweg von Interesse. So wurden in vergangenen Studien sowohl RIP als auch TRAF2 als bedeutende Adapterproteine für die TRAIL-vermittelte JNK- und NF κ B-Aktivierung nachgewiesen (Lin et al., 2000; Wajant et al., 2000). Die hier vorgestellten Versuchsergebnisse deuten dagegen daraufhin, dass auch ein RIP-unabhängiger Signalweg für die TRAIL-vermittelte Induktion von JNK- und NF κ B existiert.

Ein besseres Verständnis dieser molekularen Ereignisse hat insbesondere Bedeutung für die zukünftige Entwicklung spezifischer Tumorthapeutika. Denn die untersuchten nicht-apoptotischen TRAIL-induzierten Signalwege regulieren nicht nur die TRAIL-vermittelte Apoptose und können bei Disregulation zur Apoptoseresistenz von Tumorzellen führen. Sie können bei einer Tumorthherapie mit TRAIL auch verantwortlich dafür sein, dass statt der gewünschten Apoptose von Tumorzellen antagonistische Effekte wie Tumorzellproliferation eintreten oder entzündliche Nebenwirkungen ausgelöst werden. So hat die hier nachgewiesene JNK- und NF κ B-abhängige TRAIL-induzierte IL-8-Produktion in Colo 357 Zellen Bedeutung für proinflammatorische Wirkungen sowie für das Tumorstadium z. B. durch Förderung der Angiogenese (Koch et al., 1992). Besteht eine genaue Kenntnis über die molekularen Grundlagen nicht-apoptotischer Signalwege, welche das Tumorstadium

begünstigen, können verbesserte Therapieoptionen durch gezielten Eingriff in anti-apoptotische Mechanismen erreicht werden. Erste Ansätze zur Behandlung Apoptose-resistenter Pankreaskarzinomzellen sind beispielsweise die kombinierte Anwendung von TRAIL und Actinomycin D (Matsuzaki et al., 2001). Die Sensitivierung von Pankreaskarzinomzellen gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose wird hierbei erreicht, indem Actinomycin D anti-apoptotische Moleküle wie Bcl-XL reduziert (Hinz et al., 2000; Mori et al., 1999). Des Weiteren wird die kombinierte Anwendung von TRAIL und Proteasominhibitoren zur Behandlung Apoptose-resistenter Tumorzellen in Erwägung gezogen (Leverkus et al., 2003). Auch die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass Apoptose-resistente Pankreaskarzinomzellen in Anwesenheit von Proteasominhibitoren für die TRAIL-vermittelte Apoptose sensitiviert werden und zudem sogar die TRAIL-vermittelte Produktion des tumorfördernden und proinflammatorischen Chemokins IL-8 durch Proteasominhibitoren supprimiert wird. Eine Kombinationstherapie im Rahmen einer Tumorthherapie mit TRAIL wäre demnach sowohl zur Reduktion der Apoptoseresistenz von Tumorzellen als auch zur Minimierung entzündlicher Nebenwirkungen sinnvoll. Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Modellsysteme stellen eine gute Plattform zur Überprüfung und Weiterführung bisheriger Erkenntnisse dar.

6 Zusammenfassung

TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)/Apo-2 Ligand ist ein Mitglied der TNF (tumor necrosis factor)-Superfamilie, das in den vergangenen Jahren als potentielles Tumorthapeutikum breite Aufmerksamkeit auf sich gezogen hat. Denn über seine korrespondierenden Todesrezeptoren induziert TRAIL vornehmlich in Tumorzellen den apoptotischen Zelltod, während normale Zellen unbeschadet bleiben (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999; Griffith et al., 1998). Neuere Studien belegen allerdings, dass die TRAIL-Todesrezeptoren neben ihrer herausragenden Funktion als Auslöser der Apoptose zusätzlich die Fähigkeit zur Aktivierung nicht-apoptotischer Signalwege besitzen. Im Gegensatz zu den gut untersuchten Mechanismen der apoptotischen Signaltransduktion ist die Regulation der nicht-apoptotischen Signalwege jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt noch weitestgehend ungeklärt. Um das Verständnis auf diesem Gebiet zu verbessern, wurde in der vorliegenden Arbeit die TRAIL-induzierte Aktivierung der MAPK-Signalwege sowie des NF κ B-Signalweges analysiert. Hierfür wurde die humane Pankreasadenokarzinomzelllinie Colo 357 verwendet. Um in den verwendeten Pankreaskarzinomzellen einen typischen Apoptoseresistenzmechanismus von Tumorzellen zu simulieren, wurden diese mit einem Bcl-XL-exprimierenden Vektor (Colo 357 Bcl-XL) transfiziert. Als Kontrolle dienten Colo 357 Zellen mit transfiziertem leeren Vektor (Colo 357 VK). Zunächst wurden die genannten Zelltransfektanden nach Stimulation mit verschiedenen Arten von löslichem rekombinantem TRAIL mittels Zytotoxizitätsnachweis auf ihre Sensitivität gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose überprüft. Hierbei erwiesen sich erwartungsgemäß die Colo 357 Bcl-XL Zellen im Gegensatz zu den Colo 357 VK Zellen als resistent gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose.

Daraufhin wurde im Westernblot die TRAIL-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 untersucht. Hierbei war kein Unterschied zwischen den Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen und den Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen

festzustellen. In beiden Fällen zeigte sich eine deutliche Aktivierung der MAP-Kinasen durch TRAIL. Diese wurde in Anwesenheit des Proteinsynthesehemmers CHX noch verstärkt, in Gegenwart des Caspaseinhibitors zVAD-fmk dagegen supprimiert. Anhand dieser Daten konnte für Colo 357 Zellen die TRAIL-vermittelte Aktivierung der MAP Kinasen JNK, ERK und p38 als Apoptose-unabhängig, aber Caspase-abhängig nachgewiesen werden.

Um die Aktivierung von Caspasen in Colo 357 Zellen näher zu analysieren, wurde im Folgenden die Prozessierung von Caspase-8 und verschiedenen Caspasesubstraten mittels Westernblotanalyse detektiert. Interessanterweise waren sowohl in Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen als auch in Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen die Prozessierung der Caspase-8 sowie die Spaltung der Caspase-8-Substrate Bid und RIP nachweisbar. Dagegen konnte aktivierte Caspase-3, welche indirekt anhand des gespaltenen Caspase-3-Substrates PARP dargestellt wurde, nur in den Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen nachgewiesen werden. Hierdurch konnte die Apoptoseresistenz der Bcl-XL-exprimierenden Zellen auf die Blockierung der Caspase-3-Aktivierung zurückgeführt werden. Die erhaltene TRAIL-induzierte Caspase-8-Aktivität in den Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen in Verbindung mit der zuvor nachgewiesenen Caspase-abhängigen TRAIL-vermittelten MAPK-Aktivierung, welche in Anwesenheit von CHX verstärkt worden war, gab Anlass zur Diskussion über eine mögliche Bedeutung von Caspase-8 für die TRAIL-induzierten MAPK-Signalwege in Colo 357 Zellen. Aufgrund der nachgewiesenen TRAIL-vermittelten Spaltung und Inaktivierung von RIP konnte außerdem die Existenz eines RIP-unabhängigen JNK- und NFκB-Signalweges in Colo 357 Zellen postuliert werden.

Im Anschluss wurde in beiden Colo 357 Zelltransfektanden das MAPK- und NFκB-Zielgen IL-8 nach TRAIL-Stimulation im ELISA detektiert. Bei den Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen wurde daraufhin ein spezifischer Inhibitor der MAP-Kinase JNK sowie der Proteasominhibitor MG-132 eingesetzt und deren Auswirkungen auf die TRAIL-induzierte IL-8-Produktion überprüft. Hierbei bewirkten beide Inhibitoren eine deutliche Reduktion der TRAIL-induzierten IL-8-Produktion. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass in Colo 357 Bcl-XL Zellen sowohl JNK als auch NFκB eine wichtige Rolle bei der TRAIL-induzierten IL-8-Expression spielen.

Abschließend wurde die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung in einer weiteren Zelllinie untersucht. Hierfür wurde die Fibroblasten-Zelllinie SV 80 verwendet. In Einklang mit früheren Studien über zelltypabhängige Eigenschaften der TRAIL-vermittelten JNK-Aktivierung wurde in SV 80 Zellen im Gegensatz zu Colo 357 Zellen die TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung nicht durch den Caspaseinhibitor zVAD-fmk gehemmt, sondern eher verstärkt. Hiermit konnte die Existenz eines Caspase-abhängigen und eines Caspase-unabhängigen TRAIL-vermittelten JNK-Signalweges in verschiedenen Zelllinien erneut bewiesen werden.

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeit geben neue Einblicke in die Regulation der nicht-apoptotischen Signaltransduktion der TRAIL-Todesrezeptoren und bekräftigen des Weiteren bisherige Untersuchungen in diesem noch sehr unerforschten Themengebiet.

7 Summary

TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), also known as Apo-2 ligand, is one of several members of the TNF (tumor necrosis factor) superfamily that induce apoptosis through engagement of death receptors (Wiley et al., 1995). TRAIL is unusual as compared to any other cytokine as it interacts with a complex system of receptors: two pro-apoptotic death receptors (TRAIL-R1 and TRAIL-R2) and three anti-apoptotic decoys (TRAIL-R3, TRAIL-R4 and OPG). This protein has generated tremendous excitement as a potential tumor-specific cancer therapeutic because it selectively induces apoptosis in many transformed cells but not in normal cells (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999; Griffith et al., 1998). Since its discovery in 1995, TRAIL has been predominantly described as a potent inducer of apoptosis with functions in tumor surveillance and immune privilege through binding of its corresponding death receptors. More recent studies however point to additional, apoptosis-independent functions of the TRAIL-death-receptors including survival and proliferation in T-cells and endothelial cells, chemokine production or erythroid maturation (Secchiero et al., 2003a; Secchiero et al., 2003b; Soderstrom et al., 2002). In contrast to the extensively studied pro-apoptotic signaling cascade, the mechanisms underlying non-apoptotic TRAIL signaling still remain poorly understood. Therefore the aim of this study was the investigation of non-apoptotic signaling of TRAIL and its corresponding death receptors in order to provide a better understanding of its regulation and effects. The experiments described focused mainly on TRAIL-mediated activation of the MAPK (mitogen-activated protein kinase) cascades and the transcriptional factor NF κ B in connection with the induction of apoptotic cell death as well as the induction of the chemokine IL-8.

For the described project the human pancreatic cancer cell line Colo 357 was predominantly used. In order to analyze the effects of TRAIL under apoptotic and under non-apoptotic conditions Colo 357 cells transfected with a Bcl-XL-overexpressing vector (Colo 357 Bcl-XL) were compared to those with an empty vector

(Colo 357 VK). The first step of this study was to proof the different sensitivities of these two cell transfectants towards TRAIL-induced apoptosis. As expected, Colo 357 VK cells were shown to be sensitive to TRAIL especially in the presence of CHX, an inhibitor of protein synthesis. In contrast, overexpression of Bcl-XL was able to protect Colo 357 cells from TRAIL-mediated apoptosis.

Although Colo 357 VK cells and Colo 357 Bcl-XL cells showed different sensitivities towards TRAIL-induced apoptosis the activated MAP kinases JNK, ERK and p38 could be detected in both cell transfectans after stimulation with TRAIL indicating that TRAIL-mediated activation of these MAP kinases occurs independently from apoptotic cell death. Interestingly, the signal could be significantly suppressed by using the caspase-inhibitor zVAD-fmk suggesting an apoptotic-independent but caspase-dependent TRAIL-mediated MAPK signaling in Colo 357 cells. In order to further investigate the activation of caspases in these cells in response to TRAIL the cleavage of caspase-8, the caspase-8-substrates Bid and RIP as well as the caspase-3-substrate PARP was analyzed. In both, Colo 357 VK and Bcl-XL-overexpressing Colo 357 cells, TRAIL induced the processing and activation of caspase-8 which lead to the cleavage of Bid and RIP whereas cleavage of PARP could only be found in TRAIL-sensitive Colo 357 VK cells. Taken together these data suggest that the TRAIL-resistance of Bcl-XL-overexpressing cells is mediated by blocking the activation of caspase-3. The TRAIL-induced caspase-8 activation in Colo 357 Bcl-XL cells in connection with the caspase-dependent TRAIL-induced MAPK activation, which had been enhanced in the presence of CHX, lead to the discussion about a possible role of caspase-8 in TRAIL-induced MAPK signaling. Furthermore the TRAIL-induced cleavage and inactivation of RIP in Colo 357 cells pointed to the existence of RIP-independent TRAIL-induced JNK- and NF κ B-signaling in Colo 357 cells.

In addition, the induction of typical target genes of MAPK- and NF κ B-signaling was investigated in Colo 357 cells by detection of the chemokine IL-8. After pretreatment with the caspase-inhibitor zVAD-fmk in both Colo 357 cell transfectants TRAIL-induced IL-8-production could be observed. Apart from that, in Colo 357 Bcl-XL cells TRAIL-induced IL-8-production was analyzed in the presence of an inhibitor of JNK and an inhibitor of the proteasome in order to investigate the importance of JNK- and

NF κ B-activation for TRAIL-induced IL-8-production. Both inhibitors significantly suppressed TRAIL-mediated IL-8-production. Thus activation of JNK as well as NF κ B were shown to be essential to express the chemokine IL-8 in Colo 357 cells after stimulation with TRAIL.

In the last part of the study TRAIL-mediated JNK activation was analyzed in SV 80 fibroblasts. In accordance with earlier publications about celltypespecific TRAIL-mediated JNK activation, in SV 80 cells the usage of the caspase-inhibitor zVAD-fmk had no or even a stimulatory effect on TRAIL-mediated JNK activation whereas in Colo 357 cells TRAIL-mediated JNK activation had been suppressed by zVAD-fmk. Therefore the existence of a caspase-dependent and a caspase-independent TRAIL-mediated JNK signaling pathway in different celltypes could be confirmed. Taken together the results of this study provide more insights into the regulation of non-apoptotic TRAIL signaling and on the other hand confirm earlier studies about this still poorly discovered area of research.

8 Abkürzungen

ABTS	2,2'-Azino-di-3-Ethylenbenzthiaolinsulfonsäure
AK	Antikörper
APAF-1	apoptotic-protease-activating factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASK1	apoptosis signal-regulating kinase 1
ATF-1,-2	activating transcribing factor-1, -2
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma (protein) 2
Bcl-XL=Bcl-2L1	Bcl-2-like 1
Bfl1/A1=BcL-2A1	Bcl-2-related protein A1
BH	Bcl-2 Homologie (Domäne)
°C	Grad Celsius
CAD	caspase-activated DNase
CARD	caspase recruitment domain
Caspase	Cysteinyl-Aspartat-spezifische Protease
CD	cluster of differentiation
cFLIP	cellular FLIP
CHX	Cycloheximid
cIAP-1,-2	cellular IAP
CRD	cysteine-rich domain
DcR	decoy receptor
DD	death domain
DED	death effector domain
DIABLO	direct IAP-binding protein (=SMAC)

DISC	death-inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxy-ribonucleotide acid
DR	death receptor
DTT	Dithiothreitol
EDAR	Ectodysplasin-A Rezeptor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FasL	Fas-Ligand
FADD	Fas-associated death domain (containing) protein
FBS	fetal bovine serum (fetales Rinderserum)
FLICE	FADD-like ICE
FLIP	FLICE-inhibitory protein
FLIP-L	FLIP-long
FLIP-S	FLIP-short
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunde
HtrA2	High temperature requirement protein A2 (=Omi)
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
ICAD	inhibitor of CAD
ICE	Interleukin-1beta-Converting Enzyme
IKK	I κ B-Kinase-Komplex
I κ B	inhibitor of NF κ B
IL-8	Interleukin-8
JNK	c-Jun N-terminal kinase (=SAPK, stress-activated protein kinase)
kDa	Kilodalton (alte Atommasseneinheit: 1/12 der durchschnittlichen Masse von Kohlenstoff)
M	Molar (mol/Liter)

mA	Milli-Ampere
mAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEKK=MAP3K1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
MEK/MKK	MAPK-Kinase
min	Minute
mV	Milli-Volt
nm	Nanometer
NFκB	nuclear factor kappa B
NIK	NFκB-inducing kinase
p75-NGFR	p75-nerve growth factor receptor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
OPG	Osteoprotegerin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
PARP	polyADP-ribose polymerase
PBS	phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PLAD	pre-ligand association domain
RHR	Rel homology region
RIP	receptor interacting protein
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMAC	second mitochondria-derived activator of caspase (=DIABLO)
TBS	TRIS-buffered saline (TRIS-gepufferte Kochsalzlösung)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	tumor necrosis factor

TNF-R	TNF-Rezeptor
TRAF	TNF-receptor associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U/min	Umdrehungen/Minute
vFLIP	viral FLIP
wt	Wildtyp
xIAP	X-chromosome-linked IAP
zVAD-fmk	N-Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-Fluoromethylketon

9 Literaturverzeichnis

- Aggarwal BB (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 745-756.
- Almasan A, Ashkenazi A (2003). Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 14, 337-348.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87, 171.
- Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokh Z, Schwall RH (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *Clin. Invest.*, 104, 155-162.
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305-1308.
- Baldi L, Brown K, Franzoso G, Siebenlist U (1996). Critical role for lysines 21 and 22 in signal-induced, ubiquitin-mediated proteolysis of I kappa B-alpha. *J. Biol. Chem.*, 271, 376-379.
- Bernard D, Quatannens B, Vandebunder B, Abbadie C (2001). Rel/NF-kappaB transcription factors protect against tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by up-regulating the TRAIL decoy receptor DcR1. *J. Biol. Chem.*, 276, 27322-273228.
- Boatright KM, Salvesen GS (2003). Mechanisms of caspase activation. *Cur.r Opin. Cell Biol.*, 15, 725-731.

- Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem. Sci.*, 27, 19-26.
- Bodmer JL, Meier P, Tschopp J, Schneider P (2000). Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.*, 275, 20632-20637.
- Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, 85, 803-815.
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 15, 269-290.
- Cahill MA, Peter ME, Kischkel FC, Chinnaiyan AM, Dixit VM, Krammer PH, Nordheim A (1996). CD95 (APO-1/Fas) induces activation of SAP kinases downstream of ICE-like proteases. *Oncogene*, 13, 2087-2096.
- Cha SS, Kim MS, Choi YH, Sung BJ, Shin NK, Shin HC, Sung YC, Oh BH (1999). A resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity. *Immunity*, 11, 253-261.
- Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, 406, 855-862.
- Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, 288, 2351-2354.
- Chaudhary PM, Eby MT, Jasmin A, Kumar A, Liu L, Hood L (2000). Activation of the NF-kappaB pathway by Caspase-8 and its homologs. *Oncogene*, 19, 4451-4460.
- Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderblit C, Cobb H (2001). MAP kinases. *Chem. Rev.*, 102, 2449-2476

- Chen C, Edelstein LC, Gelinas C (2000). The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol. Cell Biol.*, 20, 2687-2695.
- Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM (1996). FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 271, 4961-4965.
- Chou AH, Tsai HF, Lin LL, Hsieh SL, Hsu PI, Hsu PN (2001). Enhanced proliferation and increased IFN-gamma production in T cells by signal transduced through TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Immunol.*, 167, 1347-1352.
- Cory S, Adams JM (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer*, 2, 647-656.
- Curtin JF, Cotter TG (2003). Apoptosis: Historical perspectives. *Essays Biochem.*, 39, 1-10.
- Davis RJ (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 103, 239-252.
- Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG (1997). The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity*, 7, 813-820.
- Djerbi M, Darreh-Shori T, Zhivotovsky B, Grandien A (2001). Characterization of the human FLICE-inhibitory protein locus and comparison of the anti-apoptotic activity of four different FLIP isoforms. *Scand. J. Immunol.*, 54, 180-189.
- Donepudi M, Mac Sweeney A, Briand C, Grutter MG (2003). Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol. Cell*, 11, 543-549.

- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 383-424.
- Ehrhardt H, Fulda S, Schmid I, Hiscott J, Debatin KM, Jeremias I (2003). TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB. *Oncogene*, 22, 3842-3852.
- Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR (1998). Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.*, 273, 14363-14367.
- Engels IH, Stepczynska A, Stroh C, Lauber K, Berg C, Schwenzer R, Wajant H, Janicke RU, Porter AG, Belka C, Gregor M, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S (2000). Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene*, 19, 4563-4573.
- Fadeel, B., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B (2000). The most unkindest cut of all: on the multiple roles of mammalian caspases. *Leukemia*, 14, 1514-1525.
- Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*, 405, 85-90
- Fischer, U., Jännicke, R.U. & Schulze-Osthoff, K (2003). Many cuts to ruin: comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.*, 10, 76-100.
- Fulda S, Meyer E, Debatin KM (2002). Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene*, 21, 2283-2294.
- Glücksmann A (1951). Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.*, 29, 59-86.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 16, 225-260.

- Gredinger E, Gerber AN, Tamir Y, Tapscott SJ, Bengal E (1998). Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the differentiation of muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 273, 10436-10444.
- Green DR, Reed JC (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312.
- Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR, Fanger NA (1999). Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J. Exp. Med.*, 189, 1343-1354.
- Griffith TS, Lynch DH (1998). TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.*, 10, 559-563.
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ (1999). Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, 13, 1899-1911.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Hao C, Beguinot F, Condorelli G, Trencia A, Van Meir EG, Yong VW, Parney IF, Roa WH, Petruk KC (2001). Induction and intracellular regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) mediated apoptosis in human malignant glioma cells. *Cancer Res.*, 61, 1162-1170.
- Harper N, Farrow SN, Kaptein A, Cohen GM, MacFarlane M (2001). Modulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand-induced NF-kappa B activation by inhibition of apical caspases. *J. Biol. Chem.*, 276, 34743-34752.
- Havell EA, Fiers W, North RJ (1988). The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF), I. Therapeutic action of TNF against an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent, and limited by severe toxicity. *J. Exp. Med.*, 167, 1067-1085.
- Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-776.

- Hinz S, Trauzold A, Boenicke L, Sandberg C, Beckmann S, Bayer E, Walczak H, Kalthoff H, Ungefroren H (2000). Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene*, 19, 5477-5486.
- Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M (2002). Multiple control of interleukin-8 gene expression. *Leukoc. Biol.*, 72, 847-855.
- Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*, 84, 299-308.
- Hu WH, Johnson H, Shu HB (2000). Activation of NF-kappaB by FADD, Casper, and caspase-8. *J. Biol. Chem.*, 275, 10838-10844.
- Hu WH, Johnson H, Shu HB (1999). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappaB and JNK activation and apoptosis through distinct pathways. *J. Biol. Chem.*, 274, 30603-30610.
- Hymowitz SG, O'Connell MP, Ultsch MH, Hurst A, Totpal K, Ashkenazi A, de Vos AM, Kelley RF (2000). A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry*, 39, 633-640.
- Hymowitz SG, Christinger HW, Fuh G, Ultsch M, O'Connell M, Kelley RF, Ashkenazi A, de Vos AM (1999). Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol. Cell*, 4, 563-571.
- Jo M, Kim TH, Seol DW, Esplen JE, Dorko K, Billiar TR, Strom SC (2000). Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat. Med.*, 6, 564-567.
- Johnsen AC, Haux J, Steinkjer B, Nonstad U, Egeberg K, Sundan A, Ashkenazi A, Espevik T (1999). Regulation of APO-2 ligand/trail expression in NK cells-involvement in NK cell-mediated cytotoxicity. *Cytokine*, 11, 664-672.

- Juo P, Kuo CJ, Reynolds SE, Konz RF, Raingeaud J, Davis RJ, Biemann HP, Blenis J (1997). Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases. *Mol. Cell Biol.*, 17, 24-35.
- Karin M, Lin A (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.*, 3, 221-227.
- Karin M, DelKaninchen M (2000). The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin. Immunol.*, 12, 85-98.
- Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Eto H, Okumura K, Yagita H (1999). Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J. Exp. Med.*, 189, 1451-1460.
- Kim K, Fisher MJ, Xu SQ, el-Deiry WS (2000). Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 6, 335-46.
- Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J. Biol. Chem.*, 276, 46639-46646.
- Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity.*, 12, 611-620.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.*, 14, 5579-5588.
- Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM (1992). Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*, 258, 1798-1801.

- Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH (2000). Proapoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.*, 7, 1166-1173.
- Kreuz S, Siegmund D, Rumpf JJ, Samel D, Leverkus M, Janssen O, Hacker G, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Scheurich P, Wajant H (2004). NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *Cell Biol.*, 166, 369-380.
- Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H (2001). NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol. Cell Biol.*, 21, 3964-3973.
- Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S (2001a). FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 21, 8247-8254.
- Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S (2001b). Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.*, 276, 20633-20640.
- Kumar-Sinha C, Varambally S, Sreekumar A, Chinnaiyan AM (2002). Molecular cross-talk between the TRAIL and interferon signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, 277, 575-585.
- Kyriakis JM, Avruch J (2001a). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.*, 81, 807-869.
- Kyriakis JM (2001b). Life-or-death decisions. *Nature*, 414, 265-266.
- Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, Achilles K, Shih D, Mounho B, Hillan K, Totpal K, DeForge L, Schow P, Hooley J, Sherwood S, Pai R, Leung S, Khan L, Gliniak B, Bussiere J, Smith CA, Strom SS, Kelley S, Fox JA, Thomas D, Ashkenazi A (2001). Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat. Med.*, 7, 383-385.

- Lee HH, Dadgostar H, Cheng Q, Shu J, Cheng G (1999). NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 9136-9141.
- Lenczowski JM, Dominguez L, Eder AM, King LB, Zacharchuk CM, Ashwell JD (1997). Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 17, 170-181.
- Leverkus M, Sprick MR, Wachter T, Mengling T, Baumann B, Serfling E, Brocker EB, Goebeler M, Neumann M, Walczak H (2003). Proteasome inhibition results in TRAIL sensitization of primary keratinocytes by removing the resistance-mediating block of effector caspase maturation. *Mol. Cell Biol.*, 23, 777-790.
- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.*, 74, 49-139.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998). Cleavage of BID by Caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94, 491-501.
- Lin A (2003). Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays*, 25, 17-24.
- Lin Y, Devin A, Cook A, Keane MM, Kelliher M, Lipkowitz S, Liu ZG (2000). The death domain kinase RIP is essential for TRAIL (Apo2L)-induced activation of IkappaB kinase and c-Jun N-terminal kinase. *Mol. Cell Biol.*, 20, 6638-6645.
- Lin Y, Devin A, Rodriguez Y, Liu ZG (1999). Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev.*, 13, 2514-2526.
- Liu J, Lin A (2005). Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res.*, 15, 36-42.
- Lockshin RA, Zakeri Z (2001). Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 545-550.

- van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P (2002). The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ.*, 9, 1031-1042.
- Lu G, Janjic BM, Janjic J, Whiteside TL, Storkus WJ, Vujanovic NL (2002). Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. II. Role of TNF, lymphotoxin alpha(1)beta(2), Fas ligand, and TNF-related apoptosis-inducing ligand. *J. Immunol.*, 168, 1831-1839.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94, 481-490.
- MacFarlane M, Merrison W, Bratton SB, Cohen GM (2002). Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J. Biol. Chem.*, 277, 36611-36616.
- MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM, Alnemri ES (1997). Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.*, 272, 25417-25420.
- Mariani SM, Krammer PH (1998). Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells. *Eur. J. Immunol.*, 28, 1492-1498.
- Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A (1997). A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr. Biol.*, 7, 1003-1006.
- Martinon F, Holler N, Richard C, Tschopp J (2000). Activation of a pro-apoptotic amplification loop through inhibition of NF-kappaB-dependent survival signals by caspase-mediated inactivation of RIP. *FEBS Lett.*, 468, 134-136.
- Matsuzaki H, Schmiech BM, Ulrich A, Standop J, Schneider MB, Batra SK, Picha KS, Pour PM (2001). Combination of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and actinomycin D induces apoptosis even in TRAIL-resistant human pancreatic cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 7, 407-414.

- Miyazaki T, Reed JC (2001). A GTP-binding adapter protein couples TRAIL receptors to apoptosis-inducing proteins. *Nat. Immunol.*, 2, 493-500.
- Mori S, Murakami-Mori K, Nakamura S, Ashkenazi A, Bonavida B (1999). Sensitization of AIDS-Kaposi's sarcoma cells to Apo-2 ligand-induced apoptosis by actinomycin D. *Immunol.*, 162, 5616-5623.
- Muhlenbeck F, Schneider P, Bodmer JL, Schwenzer R, Hauser A, Schubert G, Scheurich P, Moosmayer D, Tschopp J, Wajant H (2000). The tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have distinct cross-linking requirements for initiation of apoptosis and are non-redundant in JNK activation. *J. Biol. Chem.*, 275, 32208-32213.
- Muhlenbeck F, Haas E, Schwenzer R, Schubert G, Grell M, Smith C, Scheurich P, Wajant H (1998). TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J. Biol. Chem.*, 273, 33091-33098.
- Munshi A, Pappas G, Honda T, McDonnell TJ, Younes A, Li Y, Meyn RE (2001). TRAIL (APO-2L) induces apoptosis in human prostate cancer cells that is inhibitable by Bcl-2. *Oncogene*, 20, 3757-3765.
- Nagata S (1997). Apoptosis mediated by Fas and its related diseases. *Nippon Ika Daigaku Zasshi*, 64, 459-462.
- Nicholson DW (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.*, 6, 1028-1042.
- Nitsch R, Bechmann I, Deisz RA, Haas D, Lehmann TN, Wendling U, Zipp F (2000). Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet*, 356, 827-828.
- Ono K, Han J (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*, 12, 1-13.

- Ozoren N, El-Deiry WS (2003). Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells. *Semin. Cancer Biol.*, 13, 135-147.
- Ozoren N, El-Deiry WS (2002). Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia*, 4, 551-557.
- Pahl HL (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18, 6853-6866.
- Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM (1997a). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*, 276, 111-113.
- Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM (1997b). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*, 277, 815-818.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb H (2001). Mitogen-activated protein (MAP) Kinase pathways: regulation and physical functions. *Endocrinol. Rev.* 22, 153-183
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.*, 271, 12687-12690.
- Ravi R, Bedi GC, Engstrom LW, Zeng Q, Mookerjee B, Gélinas C, Fuchs EJ, Bedi A (2001). Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat Cell Biol.*, 3, 409-416.
- Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell*, 83, 1243-1252.
- Rothwarf DM, Karin M (1999). The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci. STKE*, RE1.

- Roux PP, Blenis J (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 68, 320-344
- Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.*, 16, 6914-6925.
- Salvesen GS, Duckett CS (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol. Cell Biol.*, 3, 401-410.
- Salvesen GS, Renshaw MW (2002). Apoptosome: the seven-spoked death machine. *Dev. Cell*, 2, 256-257.
- Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH (2001). Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chemobiochem.*, 2, 20-29
- Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 274, 1541-1548.
- 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.
- Scherer DC, Brockman JA, Chen Z, Maniatis T, Ballard DW (1995). Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 11259-11263.
- Secchiero P, Milani D, Gonelli A, Melloni E, Campioni D, Gibellini D, Capitani S, Zauli G (2003a). Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TNF-alpha promote the NF-kappaB-dependent maturation of normal and leukemic myeloid cells. *Leukoc. Biol.*, 74, 223-232.
- Secchiero P, Gonelli A, Carnevale E, Milani D, Pandolfi A, Zella D, Zauli G (2003b). TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular

endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways. *Circulation*, 107, 2250-2256.

Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*, 277, 818-821.

Shi Y (2002). Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure*, 10, 285-288.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89, 309-319.

Smith AD, Datta SP, Howard Smith g, Campbell PN, Bentley R, McKenzie HA (1997). *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press.

Soderstrom TS, Poukkula M, Holmstrom TH, Heiskanen KM, Eriksson JE (2002). Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling in activated T cells abrogates TRAIL-induced apoptosis upstream of the mitochondrial amplification loop and caspase-8. *Immunol.*, 169, 2851-2860.

Sprick MR, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand MA, Walczak H (2002). Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J.*, 21, 4520-4530.

Stehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, Schmid JA, Binder BR, Lipp J (1998). Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J. Exp. Med.*, 188 211-216.

- Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R (2001). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 8662-8667.
- Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K (2002). Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J. Exp. Med.*, 195, 161-169.
- Tang G, Yang J, Minemoto Y, Lin A (2001). Blocking caspase-3-mediated proteolysis of IKKbeta suppresses TNF-alpha-induced apoptosis. *Mol. Cell*, 8, 1005-1016.
- Tartaglia LA, Goeddel DV (1992). Two TNF receptors. *Immunol. Today*, 13, 151-153.
- Thome M, Tschopp J (2001). Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat. Rev. Immunol.*, 1, 50-58.
- Tran SE, Holmstrom TH, Ahonen M, Kahari VM, Eriksson JE (2001). MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *J. Biol. Chem.*, 276, 16484-16490.
- Trauzold A, Wermann H, Arlt A, Schutze S, Schafer H, Oestern S, Roder C, Ungefroren H, Lampe E, Heinrich M, Walczak H, Kalthoff H (2001). CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene*, 20, 4258-4269.
- Varfolomeev EE, Boldin MP, Goncharov TM, Wallach D (1996). A potential mechanism of "cross-talk" between the p55 tumor necrosis factor receptor and Fas/APO1: proteins binding to the death domains of the two receptors also bind to each other. *J. Exp. Med.*, 183, 1271-1275.
- Wajant H (2004). TRAIL and NFkappaB signaling - a complex relationship. *Vitam. Horm.*, 67, 101-132.
- Wajant H (2003a). Death receptors. *Essays Biochem.*, 39, 53-71.

- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003b). Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 14, 53-66.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2002). TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy. *Apoptosis*, 7, 449-459.
- Wajant H, Moosmayer D, Wuest T, Bartke T, Gerlach E, Schonherr U, Peters N, Scheurich P, Pfizenmaier K (2001). Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene*, 20, 4101-4106.
- Wajant H, Haas E, Schwenzer R, Muhlenbeck F, Kreuz S, Schubert G, Grell M, Smith C, Scheurich P (2000). Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). *J. Biol. Chem.*, 275, 24357-24366.
- Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.*, 5, 157-163.
- Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, Rauch CT (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.*, 16, 5386-5397.
- Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW, Baldwin AS Jr (1999). NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 19, 5923-5929.
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science.*, 281, 1680-1683.

- Wang X (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, 15, 2922-2933.
- Werner AB, de Vries E, Tait SW, Bontjer I, Borst J (2002). Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit its collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax. *J. Biol. Chem.*, 277, 22781-22788.
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, et al (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 3, 673-682.
- Wu GS, Kim K, el-Deiry WS (2000). KILLER/DR5, a novel DNA-damage inducible death receptor gene, links the p53-tumor suppressor to caspase activation and apoptotic death. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 465, 143-151.
- Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D (1997). Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*, 89, 1067-1076.
- Yu C, Minemoto Y, Zhang J, Liu J, Tang F, Bui TN, Xiang J, Lin A (2004). JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Mol. Cell*, 13, 329-340.
- Zhivotovsky B (2003). Caspases: the enzymes of death. *Essays Biochem.*, 39, 25-40.
- Zhou T, Mountz JD, Kimberly RP (2002). Immunobiology of tumor necrosis factor receptor superfamily. *Immunol. Res.*, 26, 323-336.
- Zong WX, Edelstein LC, Chen C, Bash J, Gelinas C (1999). The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev.*, 13, 382-387.

10 Abbildungsverzeichnis

Bild 1: Aktivierung des extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalweges durch TRAIL.....	15
Bild 2: Überexpression von Bcl-XL schützt Colo 357 Zellen vor TRAIL-vermittelter Apoptose.....	44-45
Bild 3: TRAIL aktiviert die MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 in Colo 357 Zellen unabhängig vom apoptotischen Zelltod, aber abhängig von der Caspaseaktivität.....	47
Bild 4a-b: Die Überexpression von FLIP-Long schützt SV 80 Zellen vor TRAIL-vermittelter Apoptose.....	50
Bild 4 c-d: In SV 80 Zellen erfolgt die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung caspase-unabhängig.....	51
Bild 5: Sowohl in Apoptose-sensitiven Colo 357 VK Zellen als auch in Apoptose-resistenten Colo 357 Bcl-XL Zellen wird Caspase-8 nach TRAIL-Stimulation aktiviert.....	54
Bild 6: TRAIL induziert IL-8 in Colo 357 Zellen.....	56-57
Bild 7a: Die Inhibition der JNK-Aktivierung in Colo 357 Zellen.....	59
Bild 7b: Die Inhibition von JNK schützt Colo 357 Zellen nicht vor TRAIL-vermittelter Apoptose.....	60
Bild 7c: Die Inhibition von JNK hemmt die TRAIL-vermittelte IL-8-Produktion in Colo 357 Zellen.....	60

Bild 8: Die Inhibition des Proteasoms hemmt die TRAIL-vermittelte IL-8-Produktion in Colo 357 Zellen und sensitiviert die Zellen für Apoptose.....63

Bild 9: Modell der caspase-abhängigen TRAIL-induzierten JNK-Aktivierung und IL-8-Expression in Colo 357 Bcl-XL Zellen.....78

Bild 10: Modell der caspase-sensitiven TRAIL-induzierten NF κ B-Aktivierung und IL-8-Expression in Colo 357 Bcl-XL Zellen.....79

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Bei Professor Dr. Harald Wajant für die Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit sowie für die Schulung des wissenschaftlichen Arbeitens mit Fokussierung auf das Wesentliche und die Korrektheit.

Bei Daniela Siegmund für die gute Einführung in die experimentellen Methoden für meine Arbeit und die nette Zusammenarbeit im Labor.

Bei allen Mitarbeitern vom Labor der Molekularen Inneren Medizin für die Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Bei meinen lieben Eltern und lieben Geschwistern für die Geduld und Unterstützung während der letzten Jahre.

Vielen Dank!

Curriculum Vitae

ANGABEN ZUR PERSON

Name: Stella Schaffstein
Geburtsdatum: 17.02.1982
Geburtsort: Frankfurt/Main
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

AUSBILDUNG

2002-2009: **Studium der Humanmedizin**
Julius-Maximilian-Universität Würzburg

2009: **Zweite Ärztliche Prüfung (Staatsexamen)**

2004: **Ärztliche Vorprüfung (Physikum)**

1992-2001: **Gymnasium «Altkönigschule» Kronberg im Taunus**

Kronberg, den 21.03.2010

Stella Schaffstein