

Auswirkungen einer aktivierenden *PIK3CA*-Mutation auf die Signaltransduktion von FasL und TRAIL in kolorektalen Karzinomzellen

Dissertation zu Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg

vorgelegt von

Dr. med. Martin Ehenschwender

aus

Ansbach

Würzburg, 2009

Eingereicht am: _____

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: _____

1. Gutachter: Prof. Dr. Wajant

2. Gutachter: Prof. Dr. Dandekar

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich erkläre zudem, von der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg den Grad eines Doktors der Medizin (Dr. med.) verliehen bekommen zu haben. Ich erkläre weiterhin, dass ich, außer mit den Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben habe, noch versucht habe zu erwerben.

Würzburg, den 30.09.2009

(Dr. med. Martin Ehenschwender)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 1. Oktober 2006 bis 30. September 2009 an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. Harald Wajant angefertigt.

Danksagung

Prof. Dr. Harald Wajant danke ich für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Thomas Dandekar für die Bereitschaft, die Arbeit als Gutachter engagiert zu begleiten.

PD Dr. Wulf Schneider-Brachert danke ich für viele interessanten Ideen, seinem steten Interesse am Fortgang dieser Arbeit und für die gute wissenschaftliche Kooperation.

Ein großes Danke geht auch an die Kooperationspartner Anja Trauzold, Jens Waschke, Volker Spindler, Oliver Dittrich-Breiholz, Margit Ott und Peter Friedl.

Auch an alle derzeitigen und ehemaligen Mitglieder Abteilung für Molekulare Innere Medizin ein Dankeschön.

Josef Ponzer und Hubert Stahl danke ich für die großzügige Möglichkeit, in ihren Revieren einen Ausgleich zur Laborarbeit finden zu können.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern und Schwiegereltern, meinem Bruder und besonders bei meiner Frau für den Rückhalt und die Unterstützung.

The proteasome doesn't ask questions !
(Michael Karin)

Für Eva

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	TNF-Liganden und ihre Rezeptoren	10
1.1.1	Liganden der TNF-Familie	10
1.1.2	Rezeptoren der TNF-Familie	11
1.1.3	Signaltransduktion von Todesrezeptoren	13
1.1.4	Das Typ-I/Typ-II Modell der Apoptoseinduktion	14
1.1.5	Regulation der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose	15
1.1.5.1	cFLIP-Proteine	15
1.1.5.2	Proteine der IAP-Familie	16
1.1.5.3	Proteine der Bcl-2-Familie	16
1.2	Das TRAIL/TRAIL-Rezeptor-System	17
1.2.1	TRAIL	17
1.2.2	TRAIL-Rezeptoren	18
1.2.2.1	Die Todesrezeptoren TRAILR1 und TRAILR2	18
1.2.2.2	TRAILR3, TRAILR4 und Osteoprotegerin	19
1.2.3	TRAIL-induzierte Signalwege	19
1.2.3.1	Apoptoseinduktion durch TRAIL	19
1.2.3.2	Nicht-apoptotische TRAIL-Signalwege	20
1.2.4	Physiologie und Pathophysiologie des TRAIL/TRAIL-Rezeptor-Systems	21
1.3	Das FasL/Fas-System	22
1.3.1	FasL	22
1.3.2	Fas	23
1.3.3	FasL-induzierte Signalwege	24
1.3.3.1	Apoptoseinduktion durch FasL	24
1.3.3.2	Nicht-apoptotische FasL Signalwege	25
1.3.4	Physiologie und Pathophysiologie des FasL/Fas-Systems	25
1.4	Der PI3K/Akt-Signalweg	27
1.4.1	Phosphatidylinositol-3-Kinasen	27
1.4.2	Akt-Kinasen	27
1.4.3	Physiologie und Pathophysiologie des PI3K/Akt-Signalweges	28
1.5	Ziel der Arbeit	30
2	Materialien	31
2.1	Chemikalien und Reagenzien	31
2.2	Antikörper	32
2.3	Verbrauchsmaterial und Geräte	32
2.4	Kits	33
2.5	Puffer und Lösungen	33
2.6	Zelllinien	34
2.7	Fusionsproteine	35
2.8	siRNA-Oligonukleotide	35

3	Methoden.....	37
3.1	Kultivierung eukaryontischer Zellen	37
3.2	Zytotoxizitätassay	37
3.3	Transfektion mit siRNA-Oligonukleotiden	38
3.4	IL8- und uPA-Bestimmung	38
3.5	Durchflusszytometrie	39
3.5.1	Expression von Rezeptoren an der Zelloberfläche	39
3.5.2	Apoptosenachweise mit Annexin-V und TUNEL.....	39
3.6	Herstellung von Zelllysaten	40
3.7	Vorhersage von Caspaseschnittstellen mit GraBCas	40
3.8	Western Blot	41
3.8.1	SDS-PAGE	41
3.8.2	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen.....	41
3.8.3	Immunfärbung	41
3.9	Immunpräzipitation.....	42
3.10	Isolation von "lipid rafts"	43
3.11	Mikroskopie.....	43
3.12	DNA-Microarray	44
4	Ergebnisse	45
4.1	<i>PIK3CA</i> -mut blockiert TRAIL und FasL-vermittelte Apoptose bei erhaltener Caspase-8 Aktivierung.....	45
4.2	TRAIL und FasL wirken proinflammatorisch in HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut protektierten Zellen	59
4.3	FasL und TRAIL induzieren amöboide Zellmorphologie in HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen	63
4.4	FasL- und TRAIL-induzierte Änderungen der Morphologie von HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen sind Caspase-8 vermittelt.....	70
4.5	Die FasL-/TRAIL-induzierte Morphologie ist abhängig von Caspase-8 vermittelter ROCK-1-Spaltung	75
4.6	cFLIP _S verhindert FasL- und TRAIL- vermittelte Änderung der Zellmorphologie	83
5	Diskussion	86
5.1	FasL- und TRAIL-Signaltransduktion in apoptose-resistenten HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen.....	86
5.2	Todesrezeptoren, Caspase-8 und Zellmigration	89
6	Zusammenfassung.....	93
7	Summary	95
8	Literaturverzeichnis	97

9	Anhang	113
9.1	Hochregulierte Gengruppen in HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen.....	113
9.2	Hochregulierte Gene in HCT116 <i>PIK3CA</i> -wt Zellen	114
9.3	Hochregulierte Gene in HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen	115
9.4	FasL- und TRAIL-induzierte Zielgene in HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen	116
9.5	Vorhergesagte Caspaseschnittstellen in ROCK-1	117
9.6	Abkürzungsverzeichnis	118
9.7	Abbildungsverzeichnis	121
9.8	Publikationen und Vorträge.....	124
9.9	Lebenslauf	125

1 Einleitung

1.1 TNF-Liganden und ihre Rezeptoren

1.1.1 Liganden der TNF-Familie

Die 19 bislang bekannten Liganden der "Tumor Nekrose Faktor " (TNF)-Familie sind Typ-II Transmembranproteine. Charakteristisch für alle Liganden ist eine C-terminale, konservierte Domäne, die "TNF homology domain" (THD). Die Sequenzidentität der THD zwischen den verschiedenen TNF-Liganden liegt bei ca. 20 - 30 % (detaillierte Übersicht in Bodmer et al., 2002). Die THD ist essentiell für die Rezeptorbindung der TNF-Liganden sowie deren Zusammenlagerung zu trimeren Molekülen. TNF-Liganden werden zunächst als membrangebundene Proteine exprimiert, aus diesen können jedoch durch limitierte Proteolyse lösliche Formen freigesetzt werden. Eine Ausnahme stellt $LT\alpha$ dar. Die Expression an der Zelloberfläche kann außer in einem heteromeren Komplex mit dem membranständigen $LT\beta$ ($LT\alpha_1\beta_2$) aufgrund der sehr schnellen Prozessierung nicht nachgewiesen werden. In Bezug auf die Bioaktivität kann sich die membranständige Form deutlich von der löslichen Form unterscheiden. Dies ist beispielsweise bei FasL der Fall. Die lösliche Form des Liganden zeigt im Vergleich zum membranständigen Molekül eine erheblich geringere Fähigkeit den Rezeptor zu aktivieren, obwohl die Bindung des löslichen Liganden an den Rezeptor effektiv möglich ist (Schneider et al., 1998; Shudo et al., 2001).

Die Liganden der TNF-Familie sind an einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse beteiligt. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Immunantwort, bei der Differenzierung von Geweben und bei der Tumorgenese (Locksley et al., 2001; Sethi et al., 2008). TNF, $LT\alpha$, $LT\beta$ und RANKL sind beispielsweise an der Regulation der Morphogenese sekundärer lymphatischer Organe beteiligt (Fu und Chaplin, 1999). Die Entwicklung und Aktivierung von B-Lymphozyten ist abhängig von BAFF und CD40L (Mackay et al., 1999) und die Proliferation von T-Zellen wird durch sequentielle Interaktion u.a. von CD27L, 4-1BBL, OX40L und TL-1A gesteuert (Croft, 2009). In den letzten Jahren wurde die Rolle einiger Vertreter der TNF-Liganden in pathologischen Prozessen wie chronischen Entzündungsgeschehen im Detail untersucht. So führten neutralisierende Antikörper gegen TL-1A in Tiermodellen zu einer substantiellen Verbesserung des Krankheitsbildes bei Asthma oder rheumatoider Arthritis (Croft, 2009). Die Beteiligung von TNF-Liganden an malignen Prozessen bedarf einer

differenzierten Betrachtung, da sowohl pro- als auch antitumorale Effekte auftreten können (Balkwill, 2009).

1.1.2 Rezeptoren der TNF-Familie

Von den Rezeptoren der TNF-Familie kommt der überwiegende Teil als Typ-I Transmembranprotein an der Zelloberfläche vor. Ausnahmen stellen BCMA, TACI, BAFFR und XEDAR dar, sie werden zu den Typ-III Transmembranproteinen gerechnet. Die Länge der Transmembrandomäne variiert je nach Rezeptor zwischen 20 und 30 Aminosäuren. Die Membran wird lediglich einmal durchlaufen, die Sekundärstruktur dieser Domäne besteht aus einer relativ hydrophoben α -Helix (Bodmer et al., 2002). Den Rezeptoren DcR3 und OPG fehlt eine Verankerung in der Plasmamembran, sie werden als lösliche Proteine sezerniert. Neben den ausschließlich sezernierten Proteinen existiert auch von vielen der membranständigen Rezeptoren eine lösliche Form. Diese kann wie bei den Liganden der TNF-Familie durch limitierte Proteolyse im extrazellulären Teil des membranständigen Proteins entstehen, wie etwa bei CD27, CD30, CD40, TNFR1 und TNFR2 (Aderka, 1996; Gruss und Dower, 1995). Im Falle von Fas und 4-1BB entstehen lösliche Formen der Rezeptoren zudem durch alternatives Spleißen (Smith et al., 1994). Trotz der oftmals verminderten Affinität für ihren Liganden wird löslichen Rezeptoren dennoch eine neutralisierende Wirkung zugeschrieben (Wallach et al., 1991). Durch Proteolyse freigesetzte TNF-Rezeptoren (TNFR) beeinflussen die Sensitivität von Zellen gegenüber dem korrespondierenden Liganden in zweierlei Hinsicht: durch Neutralisierung des löslichen Liganden und durch Abnahme der Anzahl der Rezeptoren an der Zelloberfläche (Garton et al., 2006).

Gemeinsames strukturelles Merkmal aller Rezeptoren der TNFR-Superfamilie sind cysteinreiche Regionen ("cysteine rich domain", CRD) im extrazellulären Rezeptorteil (Zhang, 2004). CRDs finden sich in allen Rezeptoren der TNF-Familie, jedoch variiert ihre Anzahl. Der BAFFR und Fn14 besitzen lediglich eine CRD, während man bei CD30 sechs solcher Domänen findet. Funktionell wichtig ist die Beteiligung der CRDs an der Ligandenbindung (Smith et al., 1994) und der Rezeptortrimerisierung in Abwesenheit von Liganden (Chan et al., 2000). Auf einer Länge von ca. 40 Aminosäuren sind typischerweise sechs Cysteinreste in einer CRD enthalten, somit ist die Ausbildung von 3 leiterähnlich angeordneten Disulfidbrücken möglich, welche zur Stabilisierung der länglichen Domänenform beitragen (Smith et al., 1994).

Röntgenkristallstrukturanalysen von TNFR1-LT α -Komplexen zeigten keinen direkten Kontakte der Rezeptormonomere untereinander, was zur Annahme führte, dass die Bindung eines Liganden zur Rekrutierung bzw. Quervernetzung der Rezeptormonomere zum Homotrimer führt (Banner et al., 1993). Da sich jedoch nach

neueren Erkenntnissen auch in Abwesenheit von Liganden präformierte Oligomere von Rezeptoren in der Plasmamembran finden, gilt diese Ansicht teilweise als widerlegt (Chan et al., 2000; Siegel et al., 2000). Stattdessen wurde innerhalb der aminoterminalen CRD mancher TNF-Rezeptoren ein Motiv identifiziert, welches die Zusammenlagerung von Rezeptormonomeren erlaubt und als "pre-ligand assembly domain" (PLAD) bezeichnet wurde (Chan, 2007; Chan et al., 2000).

Neben den strukturellen Gemeinsamkeiten der TNF-Rezeptoren in der extrazellulären Domäne existiert eine intrazelluläre Struktur, welche die grobe Einteilung aller TNF-Rezeptoren in zwei Gruppen ermöglicht, die sogenannte Todesdomäne ("death domain", DD), welche nahe dem C-Terminus liegt (Ashkenazi und Dixit, 1998). Die Gruppe der Rezeptoren mit einer solchen Domäne werden daher entsprechend als Todesrezeptoren bezeichnet. Derzeit sind acht solcher Rezeptoren bekannt: TNFR1, TRAILR1, TRAILR2, DR3, EDAR, Fas, DR6 und p75-NGFR (Wajant, 2003). Die Länge der Todesdomäne schwankt je nach Rezeptor zwischen 70 und 80 Aminosäuren. Abbildung 1 gibt einen schematischen Überblick über die Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie.

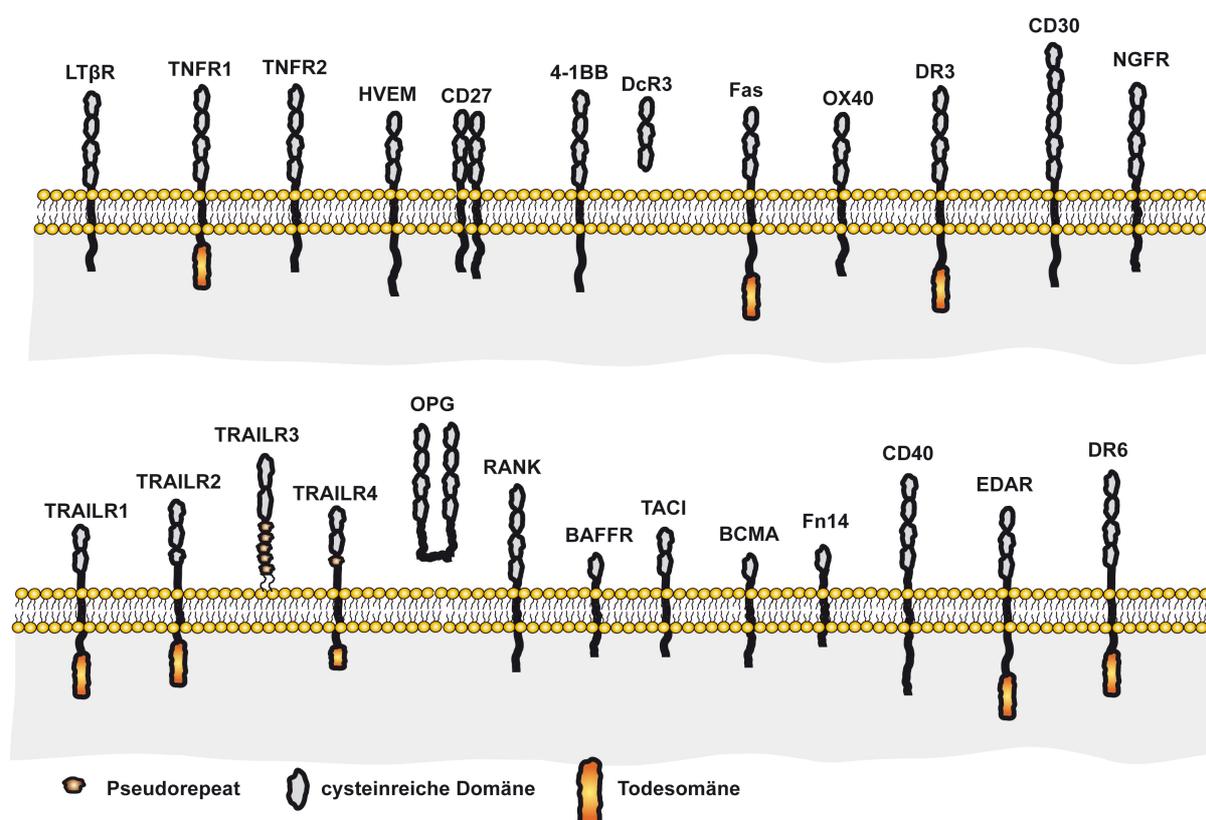


Abbildung 1: Die Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie

Schematisch dargestellt sind die CRDs im extrazellulären Teil des Moleküls, die Transmembrandomäne und, falls vorhanden, die intrazelluläre Todesdomäne.

1.1.3 Signaltransduktion von Todesrezeptoren

In anfänglichen Studien zogen die Todesrezeptoren vor allem durch die Induktion des apoptotischen Zelltods die Aufmerksamkeit auf sich. Später stellte sich heraus, dass neben der Zelltodinduktion noch weitere, teilweise sogar antiapoptotische Signalwege ihren Ursprung an Todesrezeptoren haben. In der vorliegenden Arbeit wurden vor allem die Todesrezeptoren Fas, TRAILR1 und TRAILR2 untersucht, darum werden nachfolgend zunächst allgemeine Mechanismen der Signaltransduktion erläutert, bevor die genannten Rezeptoren näher beleuchtet werden.

Es gibt zwei prototypische Signalwege, die in einer Zelle zur Induktion von Apoptose führen können. Neben dem extrinsischen Weg, der auf Ligandenbindung an Todesrezeptoren und deren Aktivierung beruht, kann auch die Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem Mitochondrium zur Einleitung der Apoptose führen. Hier spricht man vom intrinsischen Weg der Apoptoseinduktion (siehe auch Abbildung 2).

Nach Bindung ihres Liganden rekrutieren Todesrezeptoren über ihre DD die Adapterproteine FADD (Fas-associated death domain) und/oder TRADD (TNF-receptor associated death domain). Die Adapterproteine enthalten weitere Protein-Protein-Interaktionsmotive wie die "death effector domain" (DED), welche die Anlagerung apikaler Effektorenzyme erlaubt (Wilson et al., 2009). TRADD initiiert vor allem nicht-apoptotische Signale über die Rekrutierung von RIP1 (receptor interacting protein 1) (Festjens et al., 2007) und den E3-Ubiquitin Ligasen TRAF2 (TNF-receptor associated factor 2), cIAP1 und cIAP2 (cellular inhibitor of apoptosis proteins) (Varfolomeev und Vucic, 2008). Diese Proteine aktivieren nachgeschaltete Signalkaskaden, welche zur Aktivierung von NF κ B (nuclear factor κ B) und den MAPKs (mitogen-activated protein kinase) JNK (c-Jun n-terminal kinase) und p38 führen (Wilson et al., 2009). TNFR1 und DR3 entfalten über den Komplex aus TRADD, TRAF2 und RIP1 hauptsächlich proinflammatorische Effekte (Ashkenazi, 2002).

Mittels des Adapterproteins FADD werden die Initiatorcaspasen 8 und 10, sowie cFLIP (cellular FLICE inhibitory protein) an Todesrezeptoren oder TRADD rekrutiert, der entstandene rezeptorassoziierte Multiproteinkomplex wird als "death inducing signalling complex" (DISC) bezeichnet (Ashkenazi und Dixit, 1998; Peter et al., 2007). Die resultierende räumliche Nähe begünstigt die Dimerisierung der im Zytosol als Monomere vorliegenden Initiatorcaspasen (Salvesen und Dixit, 1999). Durch die Dimerisierung wird ein zweistufiger proteolytischer Aktivierungsprozess in Gang gesetzt, der letztendlich aktive, heterotetramere Caspase-8 oder Caspase-10 aus dem DISC freisetzt (Boatright et al., 2003).

Nicht alle Komponenten des DISCs begünstigen die Einleitung der Apoptose. Die Spleißvarianten von cFLIP, cFLIP_L und cFLIP_S, zeigen eine hohe Sequenzhomologie zu Initiatorcaspasen, werden wie diese an den DISC rekrutiert und inhibieren unterschiedliche Schritte der Aktivierung von Caspase-8 (Krueger et al., 2001). Aktivierte Initiatorcaspasen können durch Proteolyse sog. Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7) aktivieren (Stennicke et al., 1998), welche nachfolgend durch Spaltung verschiedener zellulärer Struktur- und Signalproteine den apoptotischen Zelltod herbeiführen. Die Bindung von TRADD oder FADD an einen Todesrezeptor führt nicht zu exklusiver Aktivierung proinflammatorischer oder proapoptotischer Signalwege. Es bestehen durchaus Überschneidungen. So kann TNFR1 beispielsweise über TRADD, TRAF2 und RIP1 NF κ B aktivieren, mittels TRADD, RIP1 und FADD aber auch Caspase-8 aktivieren und proapoptotisch wirken (Micheau und Tschopp, 2003; Wang et al., 2008).

1.1.4 Das Typ-I/Typ-II Modell der Apoptoseinduktion

Die Effizienz der Aktivierung der Effektorcaspasen durch die Initiatorcaspasen ist nicht in allen Zelltypen gleich. Wird, wie beispielsweise in Thymozyten, durch Caspase-8 eine für die Apoptoseinduktion ausreichende Aktivierung der Effektorcaspasen direkt erreicht, so spricht man von Typ-I Zellen (Wilson et al., 2009). In Typ-II Zellen ist dies nicht der Fall. Auch diese Zellen sterben nach Stimulation eines Todesrezeptors an Apoptose, jedoch ist die direkte Aktivierung der Effektorcaspasen durch Initiatorcaspasen nicht ausreichend, da sie beispielsweise durch Antagonisten wie XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) gehemmt wird (Barnhart et al., 2003). Dem Caspase-8 Substrat Bid (Bcl-2 homology domain 3-interacting domain death agonist) kommt in diesem Fall eine zentrale Rolle zu. Es wird zu tBid (truncated Bid) gespalten, tBid bindet an die mitochondriale Membran, wodurch es zur Aggregation der Proteine Bax (Bcl-2 associated X protein) und Bak (Bcl-2 antagonist/killer) kommt (Yin, 2006). Hierdurch wird die äußere Mitochondrienmembran destabilisiert, es folgt die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren wie Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of apoptosis/direct IAP binding protein with low pI) und Cytochrom c, welches zusammen mit Caspase-9 und Apaf-1 (apoptosis inducing factor-1) ATP-abhängig das sog. Apoptosom bildet (Waterhouse et al., 2002). Aktivierte Caspase-9 spaltet wiederum die Effektorcaspase-3, welche anschließend wie in Typ-I Zellen die Apoptose einleitet. tBid stellt somit eine Verbindung zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Weg der Apoptose dar (Yin, 2006). Eine vereinfachte Übersicht über die Abläufe gibt Abbildung 2.

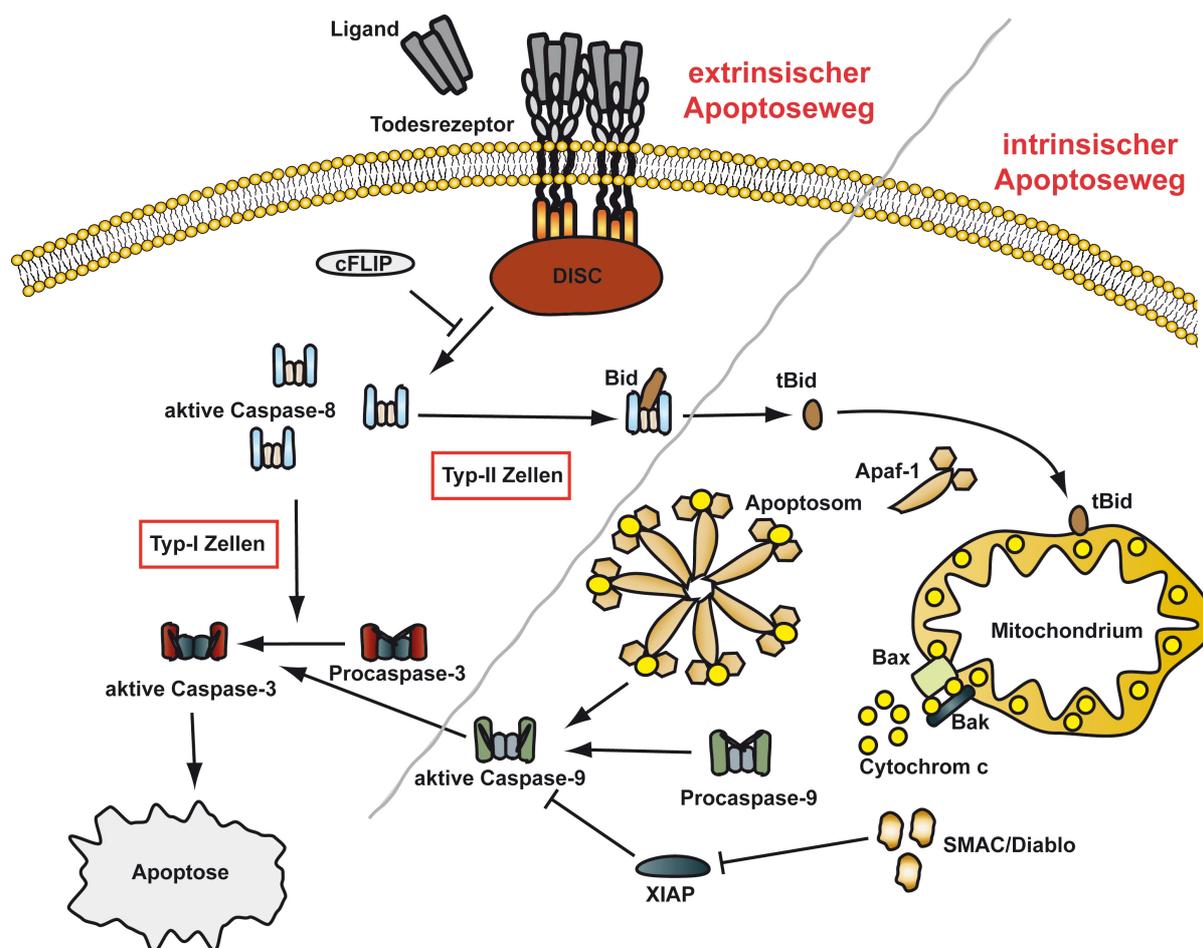


Abbildung 2: Extrinsischer und intrinsischer Weg der Apoptose

1.1.5 Regulation der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose

1.1.5.1 cFLIP-Proteine

Mechanismen, die den Todesrezeptor-induzierten Zelltod verhindern, können an unterschiedlichen Stellen in die apoptotische Kaskade eingreifen. Eine Möglichkeit besteht darin, die Aktivierung der Procaspase-8 am DISC durch Isoformen des Proteins cFLIP zu inhibieren. cFLIP wird durch seine DED an FADD rekrutiert (Thome et al., 1997). Vom *FLIP*-Gen leiten sich mehr als 10 Spleißvarianten ab, auf Proteinebene wurden bislang jedoch lediglich drei Formen auf Proteinebene gefunden: cFLIP-Long (cFLIP_L), cFLIP-Short (cFLIP_S) und cFLIP-Raji (cFLIP_R). Die am besten charakterisierten sind cFLIP_L und cFLIP_S (Krueger et al., 2001). Beide besitzen am N-Terminus zwei DEDs, des Weiteren besitzt cFLIP_L eine katalytisch inaktive Caspasedomäne, welche bei cFLIP_S fehlt. Während cFLIP_S jegliche Prozessierung von Caspase-8 am DISC verhindert, erlaubt cFLIP_L noch den ersten Prozessierungsschritt, die Spaltung zwischen p18 und p10 (Wajant, 2003). In der

Literatur wird cFLIP_L meist als antiapoptotisch wirksames Protein, funktionell analog zu cFLIP_S beschrieben (Irmeler et al., 1997). Jedoch finden sich auch Studien, die eine proapoptotische Wirkungsweise des Proteins durch verstärkte autokatalytische Aktivierung von Caspase-8 am DISC postulieren (Micheau et al., 2002).

1.1.5.2 Proteine der IAP-Familie

Eine weitere Klasse von Apoptoseinhibitoren sind die "inhibitor of apoptosis" (IAP)-Proteine. Heute sind acht IAP-Proteine beim Menschen bekannt: NAIP (NLR family apoptosis inhibitory protein), cIAP1 und cIAP2 (cellular inhibitor of apoptosis proteins), XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), ILP2 (Inhibitor of apoptosis-like protein 2), BRUCE (BIR containing ubiquitin conjugating enzyme), Survivin und Livin (LaCasse et al., 2008). Alle IAP-Proteine besitzen als strukturelle Gemeinsamkeit die BIR (baculovirus internal repeat)-Domäne. Je nach Protein sind eine bis drei Kopien davon enthalten. Die BIR-Domäne umfasst 70-80 Aminosäuren und kodiert ein Zinkfingermotiv, welches ein Zinkion koordiniert (Hinds et al., 1999). Neben der BIR-Domäne enthalten einige Mitglieder der IAP-Familie auch eine RING (really interesting new gene)-Domäne am C-Terminus. Bei cIAP1, cIAP2 und XIAP wurde eine E3-Ubiquitin Ligase Aktivität nachgewiesen, welche direkt Auto- oder Transubiquitinierung und Proteindegradation reguliert (Cheung et al., 2008; Silke et al., 2005; Suzuki et al., 2001). cIAP1 und cIAP2 besitzen als einzige Vertreter der IAP-Familie eine "caspase recruitment domain" (CARD) (Martin, 2001). Die IAPs sind die einzig bekannte Proteinfamilie, die sowohl auf Effektor- als auch auf Initiatorcaspasen negativ regulierend wirkt (LaCasse et al., 2008). XIAP ist hierbei am besten charakterisiert und gilt als potentester Caspaseinhibitor der IAP-Familie (Holcik und Korneluk, 2001). Es bindet direkt an die Caspasen 3, 7 und 9. Die Interaktion mit der Initiatorcaspase-9 findet über die BIR3-Domäne statt, während die Anlagerung an die Effektorcaspasen 3 und 7 über die sog. "Sinker" und "Hook" Regionen zwischen BIR1 und BIR2 stattfindet (Salvesen und Duckett, 2002). In beiden Fällen wird das katalytische Zentrum der Caspase blockiert. Der inhibitorische Effekt von XIAP kann durch das mitochondriale Protein SMAC/DIABLO aufgehoben werden. Es bindet an BIR2 und BIR3 von XIAP und verhindert so die Interaktion mit Caspase-3 und -7 (Chai et al., 2000).

1.1.5.3 Proteine der Bcl-2-Familie

Die Proteine der "B-cell lymphoma-2" (Bcl-2)-Familie umfassen drei Untergruppen: die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine, die proapoptotischen Bax (Bcl-2-associated X protein)- und Bak (Bcl-2-antagonist/killer)-Proteine und die ebenfalls

proapoptotischen BH3-only-Proteine (Bcl-2 homology domain-3) (Youle und Strasser, 2008). Lediglich die Proteine der Bcl-2-Untergruppe können die Todesrezeptor-induzierte Apoptose verhindern. Zu dieser Untergruppe zählen neben Bcl-2 auch Bcl-XL (a Bcl-2-like protein), Bcl-W (Bcl-2-like-2), Bfl-1 (Bcl-2 regulated protein A1) und MCL-1 (myeloid cell leukaemia sequence-1). Während die Mitglieder der IAP-Familie in der Lage sind, durch Inhibition von Initiator- und Effektorcaspasen sowohl mit dem intrinsischen als auch mit dem extrinsischen Apoptoseweg zu interferieren, können die antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie lediglich den intrinsischen Weg blockieren. Dies geschieht über die Inhibition von Bak und Bax, wodurch die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und die damit verbundene Freisetzung von Cytochrom c verhindert wird (Lessene et al., 2008). Proapoptotische Mitglieder der BH3-only-Gruppe binden an Bcl-2 und antagonisieren so deren Inhibition von Bax und Bak (Youle und Strasser, 2008).

1.2 Das TRAIL/TRAIL-Rezeptor-System

1.2.1 TRAIL

Der "Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand" (TRAIL) wurde von zwei verschiedenen Gruppen unabhängig voneinander aufgrund seiner Sequenzhomologie zu der extrazellulären Domäne von FasL und TNF (28 % Sequenzidentität zu FasL, 23 % zu TNF) entdeckt (Pitti et al., 1996; Wiley et al., 1995). TRAIL wird wie andere Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie als Typ-II Transmembranprotein exprimiert, bestehend aus 281 Aminosäuren. Die N-terminale, zytoplasmatische Domäne umfasst 17 Aminosäuren, die Transmembrandomäne 21 Aminosäuren. Die extrazelluläre Domäne reicht von Aminosäure 39 bis Aminosäure 281. Das Molekulargewicht des Liganden beträgt 32.5 kDa. Bemerkenswert in der Aminosäuresequenz ist das Cystein in Position 230, welches mit einem divalenten Zinkion koordiniert ist und die Formation von TRAIL-Homotrimeren stabilisiert. Es ist deshalb essentiell für Stabilität und Bioaktivität des Proteins (Bodmer et al., 2000; Hymowitz et al., 2000). Das *TRAIL*-Gen ist auf Chromosom 3 Position 3q26 lokalisiert (Pitti et al., 1996; Wiley et al., 1995). Transkripte von TRAIL wurden in vielen humanen Geweben nachgewiesen, exprimiert wird das Protein jedoch hauptsächlich von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems (Kelley und Ashkenazi, 2004).

Die membranständige Form des Liganden kann durch proteolytische Spaltung in eine lösliche Form überführt werden (Bodmer et al., 2002). Die Bioaktivität der beiden Formen ist jedoch erheblich unterschiedlich. Lösliches, trimeres TRAIL ist für

nichttransformierte Zellen nur in sehr geringem Maße toxisch, bei der Applikation von trimeren TRAIL in Mäusen und Affen treten nur moderate Nebenwirkungen auf (Lawrence et al., 2001; Walczak et al., 1999). In vielen Tumorzelllinien vermag lösliches, trimeres TRAIL jedoch Apoptose auszulösen, was den Liganden aufgrund der Diskriminierung zwischen normalen und entarteten Zellen für die Tumorthherapie interessant macht. Sekundäre Aggregation löslicher TRAIL-Trimere oder membrangebundenes TRAIL zeigen hingegen deutliche zytotoxische Effekte auch gegenüber nichttransformierten Zellen. Aggregierte TRAIL-Präparationen oder membrangebundenes TRAIL sind beispielsweise hepatotoxisch im Mausmodell und zeigen toxische Effekte in Primärkulturen von Keratinozyten, Endothelzellen und Astrozyten (Lawrence et al., 2001; Voelkel-Johnson et al., 2002). Der selektive Wirkmechanismus geht hier verloren.

1.2.2 TRAIL-Rezeptoren

TRAIL kann an fünf verschiedene Rezeptoren binden: TRAILR1 (auch DR4 genannt), TRAILR2 (DR5), TRAILR3 (DcR1), TRAILR4 (DcR2) und Osteoprotegerin (OPG) (Kelley und Ashkenazi, 2004). TRAILR1 und TRAILR2 gehören der Klasse der Todesrezeptoren an, TRAIL kann somit Apoptose auslösen. TRAILR3, TRAILR4 und OPG werden zu den sog. Decoy-Rezeptoren gezählt.

1.2.2.1 Die Todesrezeptoren TRAILR1 und TRAILR2

TRAILR1 und TRAILR2 wurden 1997 entdeckt (Pan et al., 1997; Walczak et al., 1997), beide Rezeptoren zeigen eine Sequenzhomologie von 58 %. Die Identifikation von TRAILR1 erfolgte über Vergleiche zwischen "expressed sequence tags" aus Sequenzbibliotheken mit der Aminosäuresequenz der Todesdomäne von TNFR1. Im intrazellulären Teil findet sich bei TRAILR1 und TRAILR2 die für die Gruppe der Todesrezeptoren kennzeichnende DD. Diese stellt eine Protein-Protein Interaktionsplattform dar und ist entscheidend an der Signaltransduktion beteiligt (Lahm et al., 2003). Im extrazellulären Anteil von TRAILR1 und TRAILR2 befinden sich zwei vollständige CRDs, welche an der Ligandenbindung beteiligt sind (Bodmer et al., 2002). TRAILR2 existiert in zwei unterschiedlichen Spleißvarianten, welche sich durch An- bzw. Abwesenheit von 23 Aminosäuren zwischen Transmembrandomäne und CRD2 im extrazellulären Anteil des Rezeptors unterscheiden (Screaton et al., 1997). Unterschiede in der Funktion dieser beiden TRAILR2-Varianten wurden bislang nicht gefunden (Kimberley und Screaton, 2004).

1.2.2.2 TRAILR3, TRAILR4 und Osteoprotegerin

TRAILR3 ist mit einem Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Plasmamembran verankert und besitzt keine intrazelluläre Domäne. Derzeit geht man von keiner Signaltransduktion nach Bindung des Liganden aus, eine Weiterleitung eines potentiellen Signals über assoziierte Proteine erscheint jedoch möglich (Kinoshita et al., 2008). TRAILR3 ist hauptsächlich auf peripheren Blutlymphozyten zu finden (Degli-Esposti et al., 1997b; Mongkolsapaya et al., 1998). Seine Funktion als Decoy-Rezeptor wurde aus Überexpressionsstudien abgeleitet (Degli-Esposti et al., 1997b). TRAILR4 zeigt eine hohe Sequenzhomologie von 58 - 70 % zu den anderen TRAIL-Rezeptoren und wird im Gegensatz zu TRAILR3 auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert (Degli-Esposti et al., 1997a). Er besitzt drei potentielle N-Glykosylierungsstellen und eine verkürzte intrazelluläre Todesdomäne. Somit kommt es bei Aktivierung dieses TRAIL-Rezeptors nicht zur Apoptoseinduktion. Überexpressionsstudien zeigten allerdings, dass der TRAILR4, den antiapoptotischen NF κ B-Signalweg aktivieren kann (Degli-Esposti et al., 1997a). Weiterhin kann TRAIL an den löslichen Rezeptor Osteoprotegerin (OPG) binden. Neben TRAIL bindet OPG auch den "Receptor Activator of Nuclear factor KappaB Ligand" (RANKL) und konkurriert so mit dem membranständigen Rezeptor RANK um den Liganden. Die Bindung von TRAIL an OPG kann somit dessen Kapazität für RANKL herabsetzen, wodurch es zu einer vermehrten Bindung von RANKL an RANK kommt. Die RANKL-RANK-Interaktion führt zu verstärkter Knochenresorption, die physiologische Relevanz der OPG-TRAIL-Interaktion ist noch unklar (Newsom-Davis et al., 2009).

1.2.3 TRAIL-induzierte Signalwege

1.2.3.1 Apoptoseinduktion durch TRAIL

Der am besten untersuchte durch TRAIL aktivierte Signalweg ist die Induktion von Apoptose. Bindung von TRAIL an TRAILR1 oder TRAILR2 führt zur Homo- oder Heterotrimerisierung der Rezeptoren (Mongkolsapaya et al., 1999) und nachfolgend zur Rekrutierung von FADD (Fas associated death domain) an die Todesdomäne. FADD fungiert als Adapterprotein, welches über seine DD an den Rezeptor bindet und über eine "death effector domain" (DED) die Rekrutierung von Caspase-8, Caspase-10 und cFLIP (cellular FLICE inhibitory protein) ermöglicht. Der entstehende Multiproteinkomplex wird als DISC (death inducing signalling complex) bezeichnet (Newsom-Davis et al., 2009). Dieser Komplex begünstigt die Aktivierung monomerer Procaspase-8 durch Dimerisierung und deren proteolytische

Prozessierung zur reifen, enzymatisch aktiven Form. Aktive, heterotetramere Caspase-8 wird vom TRAILR1/2-DISC freigesetzt und kann nachgeschaltete Effektorcaspasen (z.B. Caspase-3, Caspase-6, Caspase-7) aktivieren (Stennicke et al., 1998). Der genaue Ablauf des intrinsischen und extrinsischen Apoptosewegs sowie Mechanismen zur Gegenregulation sind unter 1.1.3 und 1.1.5 ausführlich dargestellt.

1.2.3.2 Nicht-apoptotische TRAIL-Signalwege

Neben der Einleitung des Zelltods können eine Reihe weiterer zellulärer Effekte durch das TRAIL/TRAIL-Rezeptor-System induziert werden (Wajant, 2003). So können beispielsweise Aktivierungs-, Proliferations- oder Differenzierungsprozesse in Gang gesetzt werden (Wajant, 2004). Diese nicht-apoptotischen Effekte kommen vor allem in apoptoseresistenten Zellen zum tragen. TRAIL-Bindung an TRAILR1 und TRAILR2 führt, abhängig von RIP1, zur Aktivierung des antiapoptotischen NF κ B-Signalwegs (Ehrhardt et al., 2003; Newsom-Davis et al., 2009). In TRAIL resistenten Zellen kommt es so zu Proliferation und gesteigertem Zellüberleben. Weiterhin kommt es zur Aktivierung der "mitogen activated kinases" (MAPK) c-Jun N-terminal kinase (JNK) und p38 (Varfolomeev et al., 2005). Studien haben auch gezeigt, dass TRAIL durch die MAPK "extracellular regulated kinase" (ERK) proliferationsfördernd wirken kann (Secchiero et al., 2004). Zusätzlich kann TRAIL den PI3K/Akt-Signalweges stimulieren, sowohl in apoptoseresistenten als auch in sensitiven Zellen (Secchiero et al., 2003; Zauli et al., 2005). Im ersten Fall kann es hierdurch zur Zellproliferation kommen (Morel et al., 2005). Abbildung 3 gibt einen vereinfachten Überblick über die pro- und antiapoptotischen Signalwege des TRAIL/TRAIL-Rezeptor-Systems.

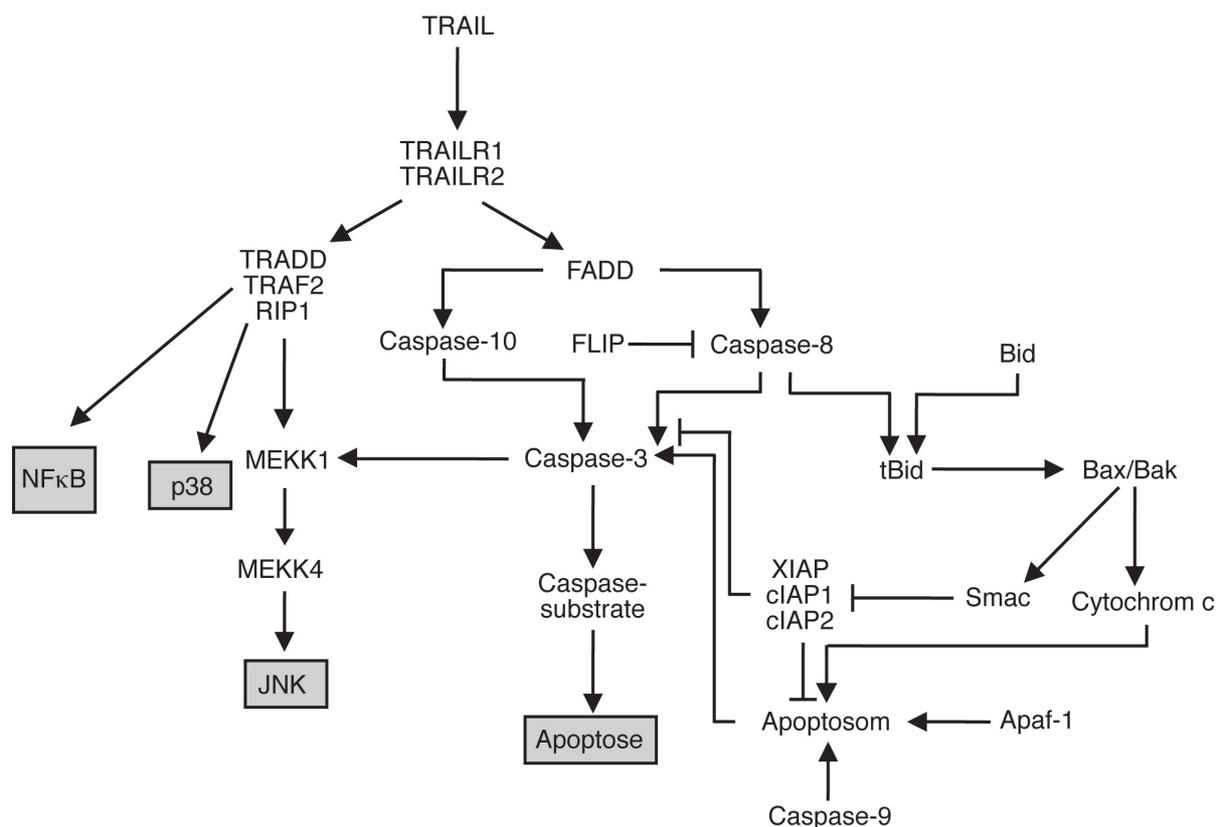


Abbildung 3: TRAIL-Signalwege

Vereinfachte Darstellung der pro- und antiapoptotischen Signalwege, die durch TRAIL stimuliert werden. Erläuterungen siehe Text.

1.2.4 Physiologie und Pathophysiologie des TRAIL/TRAIL-Rezeptor-Systems

TRAIL wird hauptsächlich auf Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems exprimiert. Auf NK-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und dendritischen Zellen kann TRAIL stimulationsabhängig induziert werden (Ehrlich et al., 2003; Halaas et al., 2000). Obwohl TRAIL-defiziente Mäuse keine Anzeichen für vermehrtes Auftreten von Autoimmunerkrankungen zeigen, konnte eine Rolle von TRAIL an der Regulation autoreaktiver T-Zellen nachgewiesen werden (Cretney et al., 2005; Lamhamedi-Cherradi et al., 2003). Das TRAIL/TRAIL-Rezeptor-System gilt weiterhin als wichtiger Effektor für die antivirale Wirkung von Interferonen (IFN). IFN α/β kann TRAIL-Expression in verschiedenen Zelllinien induzieren, weiterhin wird die TRAIL-Expression in verschiedenen Zelllinien durch Virusinfektion verstärkt. Molekulare Grundlage hierfür ist die Regulation des humanen TRAIL-Promotors durch Interferone, TRAIL ist eines der ersten Gene die durch Interferon induziert werden (Almasan und Ashkenazi, 2003). *In vivo* konnte an Mäusen gezeigt werden, dass antikörpervermittelte TRAIL-Blockade nach Infektion mit dem

Encephalomyokarditis Virus mit einem höheren Virustiter und gesteigerter Letalität einhergeht (Sato et al., 2001).

In vielen transformierten Zelllinien kann TRAIL Apoptose auslösen, was auf eine Rolle als physiologischer Modulator von Zelltod in Tumorzellen hindeutet (Ashkenazi, 2002), und damit das Interesse für seinen Einsatz in der Krebstherapie begründet (Johnstone et al., 2008). Jedoch finden sich in neueren Publikationen auch Hinweise auf protumorale Effekte des Liganden in TRAIL-resistenten Tumorzellen. Neben erhöhtem Zellüberleben und Proliferation wurden auch verstärkte Migration und Invasion beobachtet (Ehrhardt et al., 2003; Ishimura et al., 2006; Trauzold et al., 2006). Ob Tumorzellen sensitiv oder resistent gegenüber einer Behandlung mit TRAIL sind, kann von mehreren Faktoren abhängen. Die Expression der Decoy-Rezeptoren TRAILR3, TRAILR4 und OPG kann beispielsweise durch Konkurrenz um den Liganden die Bindung von TRAIL an TRAILR1 und TRAILR2 vermindern (De Toni et al., 2008; Kimberley und Screaton, 2004; LeBlanc und Ashkenazi, 2003). Die Relevanz der Decoy-Rezeptoren für die Resistenz gegenüber TRAIL wird jedoch in anderen Studien als gering eingeschätzt (Hornstein et al., 2008). Auch die Expression antiapoptotischer Proteine wie cFLIP (Horak et al., 2005), IAPs (Makhov et al., 2008) oder Proteinen der Bcl-2-Familie (Hinz et al., 2000) können an der Resistenzentstehung beteiligt sein.

1.3 Das FasL/Fas-System

1.3.1 FasL

Im humanen Genom liegt das Gen für Fas-Ligand (FasL) auf Chromosom 1q23, es umfasst ca. 8 kb DNA und beinhaltet 4 Exons (Takahashi et al., 1994). Kloniert wurde der Ligand erstmals 1993 (Suda et al., 1993). Auch FasL liegt als Typ-II Transmembranprotein vor. Die extrazelluläre Domäne besteht aus 179 Aminosäuren und besitzt neben der charakteristischen THD drei mögliche N-Glykosylierungsstellen (Bodmer et al., 2002; Orlinick et al., 1997a). Der intrazelluläre Anteil umfasst 80 Aminosäuren und beinhaltet eine prolinreiche Region (AS 45-65), welche über Src homology 3 (SH3)- und WW-Domänen eine Interaktion mit anderen zellulären Proteinen ermöglicht (Wenzel et al., 2001). Weiterhin finden sich mehrere Tyrosin-Phosphorylierungsstellen sowie ein Kaseinkinase-Phosphorylierungsmotiv in der intrazellulären Domäne des FasL. Diese spielen eine Rolle bei der retrograden Signaltransduktion des Moleküls und in intrazellulären Sortierungsprozessen (Janssen et al., 2003; Wenzel et al., 2001).

Die Metalloproteinasen-3 und -7 können membranständigen FasL zwischen K129 und Q130 spalten und so eine lösliche Form des Moleküls freisetzen (Mitsiades et al., 2001; Tanaka et al., 1998; Wetzel et al., 2007). Obwohl beide Formen des Liganden fähig sind, an Fas zu binden, tritt eine Aktivierung des Rezeptors nur durch die membrangebundene oder artifiziell immobilisierte Form des Liganden auf (Samel et al., 2003; Schneider et al., 1998). Löslicher FasL kann mit membranständigem FasL um die Bindung an Fas konkurrieren und somit antagonistisch wirken, andererseits kann diese Wirkung durch Bindung und Immobilisierung des löslichen Liganden an der extrazellulären Matrix umgekehrt werden (Aoki et al., 2001). Weiterhin zeigt löslicher FasL positiv chemotaktische und migrationsfördernde Effekte auf Neutrophile und Phagozyten (Ottonello et al., 1999; Seino et al., 1997).

1.3.2 Fas

Fas (FS7-associated cell surface antigen) gilt als Prototyp der Todesrezeptoren in der TNF-Rezeptorfamilie. Im humanen Genom ist das *FAS*-Gen auf Chromosom 10q24.1 lokalisiert und umfasst 26 kb DNA und 9 Exons. Das Fehlen von Konsensussequenzen für TATA- und CAAT-Boxen zum 5'-Ende hin führt zu multiplen Startpunkten der Transkription (Cheng et al., 1995). Durch alternatives Spleißen wurden bislang sieben unterschiedliche Transkripte gefunden, die auch mehrere lösliche Formen des Rezeptors kodieren. *In vitro* konnten für diese negativ regulatorische Effekte nachgewiesen werden (Wajant et al., 2003). Fas ist ein Typ-I Transmembranprotein, bestehend aus 319 Aminosäuren. Der extrazelluläre Anteil umfasst 157 AS, der intrazelluläre 145 AS. In der extrazellulären Domäne finden sich die für Rezeptoren der TNF-Familie kennzeichnenden CRDs. Fas besitzt 3 CRDs, welche funktionell alle an der Ligandenbindung beteiligt sind (Orlinick et al., 1997b). Direkten Kontakt zum Liganden haben jedoch nur CRD2 und CRD3 (Starling et al., 1997). CRD1 hingegen ist an der Formation der PLAD beteiligt und begünstigt die Ausbildung von ligandenfreien Fas-Komplexen, welche im Gegensatz zu Fas-Monomeren eine hohe Affinität für FasL zeigen. In der C-terminalen Hälfte der intrazellulären Domäne ist die für die Apoptoseinduktion essentielle Todesdomäne lokalisiert. Die Expression von Fas wurde für zahlreiche Zelltypen beschrieben, unter anderem für Fibroblasten, Epithelzellen und Zellen des hämatopoetischen System.

1.3.3 FasL-induzierte Signalwege

1.3.3.1 Apoptoseinduktion durch FasL

Für die Aktivierung von Fas wurde kürzlich ein fünfstufiges Modell vorgeschlagen (Lee et al., 2006). (1) Ligandenbindung führt zur Formierung stabiler Fas-Mikroaggregate und beginnender DISC-Bildung. (2) Durch die Assoziation von Fas mit "lipid rafts" kommt es zur Ausbildung sog. SPOTS (signaling protein oligomeric transduction structures) und (3) deren anschließendem Verschmelzen zu großen Signalplattformen. (4) Darin enthaltene Rezeptoren werden internalisiert, (5) im endosomalen Kompartiment kommt es im großen Maßstab zur DISC-Bildung. Im ersten Schritt kommt es zur Ligandenbindung an über die PLAD präformierte, trimere Rezeptoren. Trimere FasL-Fas-Komplexe sind noch immer inaktiv. Für die Aktivierung des Rezeptors ist die Ausbildung hochmolekularer Rezeptor-Ligand-Komplexe wichtig. Löslicher, trimere FasL ist hierzu nicht in der Lage, es bedarf stattdessen membranständigen FasL, agonistischen Fas-Antikörper oder oligomerisierten bzw. immobilisierten FasL (Algeciras-Schimnich et al., 2002; Aoki et al., 2001). Die Formation der hochmolekularen Komplexe wird durch die konstitutive und induzierbare Assoziation von Fas mit "lipid rafts" erleichtert (Eramo et al., 2004; Legembre et al., 2006), wo eine weitere Oligomerisierung der Rezeptor-Ligandkomplexe über sog. SPOTS (Siegel et al., 2004) zu großen, multimeren Rezeptor-Ligand-Aggregaten auftritt. Die Anlagerung von zytoplasmatischen Proteinen wird durch die Komplexbildung vereinfacht. Obwohl die Formation des DISC bereits an der Plasmamembran beginnt, ist sie nach Internalisierung des Rezeptors im endosomalen Kompartiment am stärksten (Schutze et al., 2008). Neben ligiertem Fas besteht der DISC aus FADD und Procaspase-8 (Muzio et al., 1996), welche nach Dimerisierung über eine zweistufige Autoproteolyse aktiviert und freigesetzt wird. cFLIP kann wie auch bei TRAIL-Rezeptoren die Aktivierung von Caspase-8 am DISC verhindern. Neben Apoptose kann Fas auch Nekrose auslösen. RIP1 und FADD sind hierfür entscheidend, der Mechanismus wie diese Proteine Sauerstoffradikale erzeugen ist jedoch unklar (Berghe et al., 2004; Holler et al., 2000). Da RIP1 durch Caspase-8 gespalten und inaktiviert wird, tritt Nekrose vor allem bei fehlender oder inhibierter Caspase-8 Aktivierung auf.

1.3.3.2 Nicht-apoptotische FasL-Signalwege

Apoptoseinduktion ist nicht die einzige zelluläre Reaktion, die nach Bindung von FasL an Fas erfolgen kann. Auch die Aktivierung des antiapoptotisch wirksamen NF κ B-Signalweges ist möglich. Da jedoch wichtige Komponenten des NF κ B-Signalweges als Substrat aktivierter Caspasen im Laufe der Apoptoseinduktion gespalten und funktionsunfähig werden, tritt die Fas-vermittelte NF κ B-Aktivierung vor allem bei apoptoseresistenten Zellen auf. Die Beteiligung von RIP1, FADD und Caspase-8 wurde hierbei nachgewiesen, wobei die enzymatische Aktivität von Caspase-8 entbehrlich ist (Hu et al., 2000; Kreuz et al., 2004). cFLIP hat einen stark inhibitorischen Effekt auf die Fas-vermittelte NF κ B-Aktivierung (Kreuz et al., 2004).

Fas kann auch den JNK-Signalweg aktivieren, was caspaseabhängig oder -unabhängig erfolgen kann. Im ersten Fall führt z.B. die Spaltung der MAP3K MEKK1 zu deren Aktivierung, was die JNK-Signalkaskade in Gang setzen kann (Widmann et al., 1998a). Durch direkte Anlagerung von DAXX (death domain associated protein 6) an den zytoplasmatischen Rezeptorteil und der zusätzlichen Assoziation mit der MAP3K ASK1 (apoptosis signaling kinase-1) kann JNK ebenfalls aktiviert werden (Wajant et al., 2003), in diesem Fall unabhängig von Caspaseaktivität. Die Fas-induzierte JNK-Aktivierung kann auch unter nicht-apoptotischen Umständen auftreten. So hat die JNK-Aktivierung durch Fas bei der Herzmuskelhypertrophy *in vitro* und *in vivo* eine entscheidende Rolle (Badorff et al., 2002). Abbildung 4 gibt einen vereinfachten Überblick über die vom FasL/Fas-System aktivierten Signalwege.

1.3.4 Physiologie und Pathophysiologie des FasL/Fas-Systems

Untersuchungen zur *in vivo* Funktion des FasL/Fas-Systems basieren hauptsächlich auf der Untersuchung von Mäusen. *Gld*-Mäuse, die einen infunktionellen FasL exprimieren, entwickeln eine generalisierte lymphoproliferative Erkrankung, gleiches gilt für *lpr*-Mäuse, die einen defekten Fas-Rezeptor exprimieren (Cohen und Eisenberg, 1991). Im Immunsystem hat das FasL/Fas-System eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Apoptoseinduktion von T-Zellen (Beisner et al., 2003; Green et al., 2003). Weiterhin wird die Aufrechterhaltung der physiologischen Immunsuppression in immunprivilegierten Organen wie dem Auge durch FasL-induzierte Apoptose in inflammatorischen, Fas-sensitiven Immunzellen gewährleistet (Stuart et al., 1997). FasL und Fas wirken mit bei Differenzierungs- und Regenerationsprozessen im Nervensystem, in Homöostase und Regeneration der

Leber, bei der Angiogenese im kardiovaskulären System sowie bei physiologischen und krankhaften Prozessen im Herzen (Ehrenschwender und Wajant, 2009)

In der Tumorbilogie sind eine Reihe von Funktionen für das FasL/Fas-System herausgestellt worden. Neben der physiologischen Immunsuppression in immunprivilegierten Organen ermöglicht die Expression von FasL auf Tumorzellen die Schaffung eines immunprivilegierten Tumormikromilieus, um so der Immunantwort des Wirtsorganismus zu entkommen. Apoptoseinduktion in tumorinfiltrierenden Lymphozyten konnte *in situ* beobachtet werden (Bennett et al., 1998; Okada et al., 2000). Andererseits wird auch die apoptotische Wirkung von T-Zellen und NK-Zellen auf Tumorzellen durch FasL- und TRAIL-Expression auf deren Oberfläche vermittelt (Wajant, 2006). Daneben besitzen beide Liganden proinflammatorisches Potential. Aufgrund der FasL-Expression auf Tumor- und Immunzellen entsteht eine zweite, von beiden Zelltypen initialisierte und auf die Tumorumgebung restringierte Immunantwort. Hieraus begründet sich auch das Interesse, das FasL/Fas-System als therapeutisches Ziel zu nutzen (Ehrenschwender und Wajant, 2009).

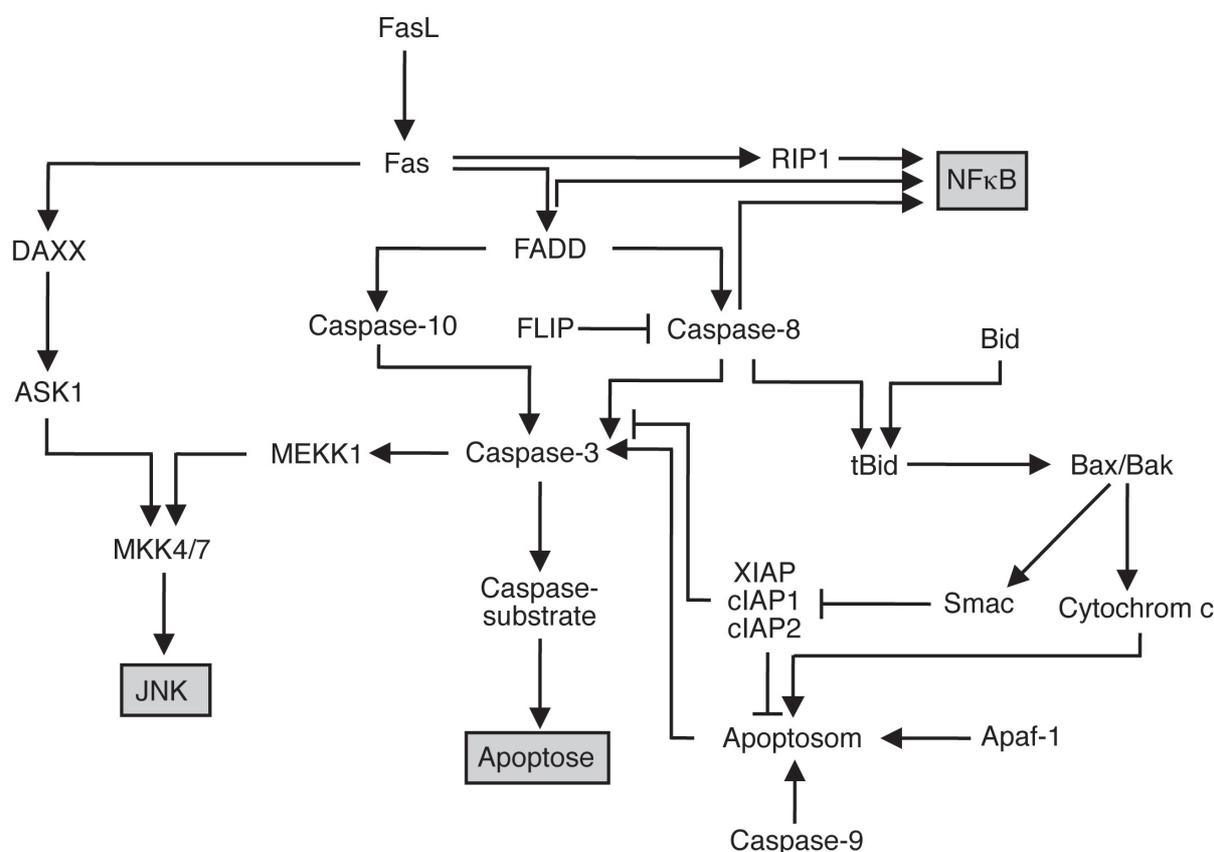


Abbildung 4: Fas-Signalwege

Schematische Darstellung der pro- und antiapoptotischen Fas-Signalwege. Erläuterungen siehe Text.

1.4 Der PI3K/Akt-Signalweg

1.4.1 Phosphatidylinositol-3-Kinasen

Für das Verständnis der Akt-Regulation war die Erkenntnis entscheidend, dass die Aktivierung von Akt durch die vorgeschaltete Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) bedingt wird. Aufgrund der Domänenstruktur werden die PI3K in unterschiedliche Untergruppen aufgeteilt.

Die für die Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) Signaltransduktion wichtigen PI3K finden sich in der Untergruppe IA und sind Heterodimere, bestehend aus einer von fünf regulatorischen ($p85\alpha$, $p85\beta$, $p55\alpha$, $p55\gamma$, $p50\alpha$) und einer von drei katalytischen ($p110\alpha$, $p110\beta$, $p110\gamma$) Untereinheiten (Zhao und Vogt, 2008). An der Plasmamembran phosphoryliert PI3K Phosphoinositide an der 3'-OH Position am Inositolring und erzeugt so unter anderem aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP_3). Die negative Regulation des PI3K-Signalweges erfolgt hauptsächlich über PTEN (phosphatase and tensin homolog), welches die Hydrolyse von PIP_3 zu PIP_2 katalysiert. Lediglich für PI3Ks der Untergruppe I konnte eine Beteiligung bei der Karzinogenese nachgewiesen werden (Franke, 2008).

1.4.2 Akt-Kinasen

Das *AKT*-Gen ist das zelluläre Homolog zu dem viralen Onkogen *v-akt*. Es wurde 1991 kloniert. Akt (auch Protein Kinase B, PKB, genannt) ist eine Serin/Threonin Kinase und alle Isoformen des Enzyms teilen einen ähnlichen Aufbau. Am N-Terminus findet sich eine regulatorische Domäne mit einer PH (pleckstrin homology)-Domäne, welche über eine bewegliche Region an die Kinasedomäne angebunden ist. Am C-Terminus findet sich eine für die Aufrechterhaltung der Kinasefunktion wichtige Domäne (Chan et al., 1999). Drei Akt-Isoformen sind beim Menschen bekannt, jede wird von einem eigenen Gen kodiert. Akt1 findet sich ubiquitär, Akt2 v.a. in insulinsensitivem Gewebe und Akt3 in Testes, Gehirn und im Intestinaltrakt (Franke, 2008). Die Aktivierung aller 3 Isoformen erfolgt nach gleichem Schema in zwei Schritten. Über die PH-Domäne wird die Kinase an Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP_3), dem Produkt der PI3K, an das zytosolische Blatt der Plasmamembran lokalisiert. Hier befindet sich auch PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1), welche ebenfalls über ein PH-Motiv an PIP_3 bindet. PDK1 phosphoryliert Akt, was zur Aktivierung führt (Toker und Newton, 2000). Trotz

struktureller Gemeinsamkeiten und gleichem Aktivierungsmechanismus unterscheiden sich die Akt-Isoformen in ihrer Funktion (Franke, 2008).

1.4.3 Physiologie und Pathophysiologie des PI3K/Akt-Signalweges

Nach PDK1-vermittelter Aktivierung von Akt phosphoryliert diese eine Vielzahl von Proteinen. So kommt es nach einer Interaktionskaskade mit TSC (tuberous sclerosis complex), Rheb (Ras homolog enriched in brain) und TOR (target of rapamycin) durch die Proteine S6K 1/2 (p70 S6 kinase) und 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein) zur Initiierung der Proteinsynthese (Abbildung 5).

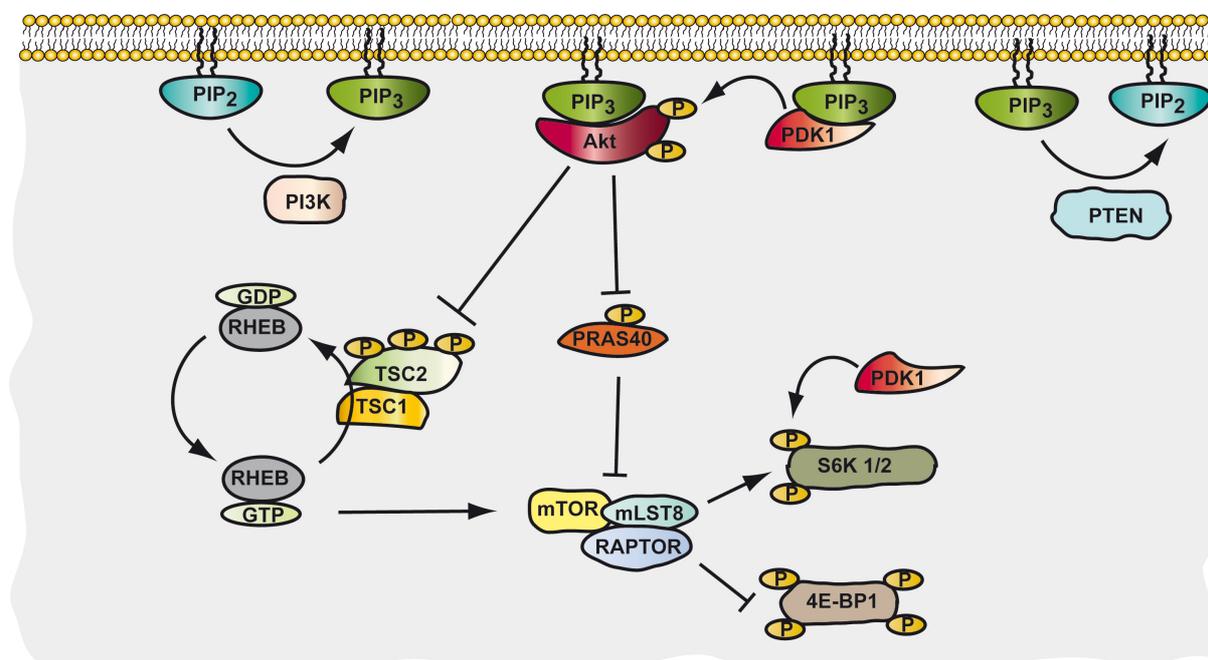


Abbildung 5: Der PI3K/Akt-Signalweg

Schematische Darstellung einiger wichtiger Komponenten des PI3K/Akt-Signalweges. Erläuterungen siehe Text.

Auch die Transkription wird über Akt reguliert, beispielsweise durch Degradation des Transkriptionsfaktors FOXO1 (forkhead box O transcription factor) und GSK3 β (glycogen synthase kinase-3 β). Letztere reguliert die onkogenen Transkriptionsfaktoren cJun und cMyc negativ. Stressregulierte Kinasen, wie JNK oder p38, werden durch Akt-abhängige Phosphorylierung einzelner Komponenten der entsprechenden Signalwege inhibiert. Auch metabolische Funktionen wie die Regulation der insulinabhängigen Glukosehomöostase werden über Akt-abhängige Mechanismen gesteuert, ebenso wie Schritte in der Regulation des Zellzyklus (Übersicht in Franke, 2008, und darin enthaltene Referenzen).

Akt phosphoryliert auch das proapoptotische Protein BAD (Bcl-2 antagonist of cell death). Es kommt zur hochaffinen Bindung von BAD an 14-3-3 Moleküle, die proapoptotische Wirkung des Proteins wird dadurch antagonisiert (Zha et al., 1996). Auch Caspase-9 zählt zu den Akt-Substraten, was die Apoptoseresistenz nach Cytochrom c Freisetzung in einigen Zellen erklären kann (Cardone et al., 1998). Daneben werden auch antiapoptotische, dem Mitochondrium nachgeschaltete Proteine wie XIAP als mögliche Akt-Substrate angesehen (Dan et al., 2004).

In den letzten Jahren hat sich eine Rolle der PI3Ks in der Tumorentstehung gezeigt (Manning und Cantley, 2007). Dabei wurde festgestellt, dass das *PIK3CA*-Gen, welches für die katalytische p110 α -Untereinheit kodiert, in einer Vielzahl von Tumorentitäten mutiert ist (Samuels und Ericson, 2006). Mit einer Frequenz von ca. 30 % finden sich *PIK3CA*-Mutationen in Karzinomen von Leber, Kolon, Brust, Endometrium und Prostata (Zhao und Vogt, 2008). Die Mutationen beruhen zumeist auf der Substitution eines einzelnen Nukleotids, welches in 80 % der Fällen in drei sog. "hotspots" zu finden ist. Durch die genannten Mutationen erhöht sich die Lipidkinaseaktivität der Untereinheit deutlich (Karakas et al., 2006), so dass es zu einer konstitutiven PI3K/Akt-Signaltransduktion kommt, detektierbar durch den erhöhten Anteil der phosphorylierten Formen von Akt, S6K, 4E-BP und GSK3 β (Zhao und Vogt, 2008). Die funktionellen Konsequenzen der *PIK3CA*-Mutationen im kolorektalen Karzinom wurde erstmals 2005 beschrieben (Samuels et al., 2005). Durch den Vergleich isogener Zelllinien, welche entweder das *PIK3CA* Wildtyp-Allel oder eine mutierte Form trugen, wurden in dieser Studie die Auswirkungen von zwei der häufigsten Mutationen untersucht, die Substitution H1047R in Exon 20 sowie E545K in Exon 9. Mutationen in *PIK3CA*-Gen konnten hierbei mit Wachstumsfaktor-unabhängiger Zellproliferation, Apoptoseresistenz gegenüber TRAIL und erhöhter Invasivität in Verbindung gebracht werden (Samuels et al., 2005). Nachfolgende Studien zeigten weiterhin ein erhöhtes metastatisches Potential in einem orthotopen Mausmodell (Guo et al., 2007).

1.5 Ziel der Arbeit

Eine Reihe von Liganden der TNF-Familie wurde in den letzten Jahren als vielversprechendes Ziel für die Therapie maligner Tumoren in Betracht gezogen. Der Einsatz von FasL und TRAIL bietet sich z.B. für die Induktion des Zelltods in entarteten Zellen an. Unter bestimmten Voraussetzungen können TRAIL und FasL jedoch auch protumorale, für die Tumorthherapie gänzlich ungewünschte Wirkungen entfalten.

In vorhergehenden Studien wurde die Assoziation des PI3K/Akt-Signalweges mit Tumorentstehung gezeigt, welche in vielen Fällen durch aktivierende Mutationen im *PIK3CA*-Gen bedingt wird. Diese Arbeit untersucht die Effekte der Todesliganden FasL und TRAIL auf kolorektale Karzinomzellen, welche die aktivierende H1047R *PIK3CA*-Mutation besitzen. Dabei soll besonderes das Zusammenspiel nicht-apoptotischer, FasL- oder TRAIL-induzierter Signalwege mit dem onkogenen PI3K/Akt-Signalwerk berücksichtigt werden.

2 Materialien

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt
Anti-FLAG M2 Agarose	Sigma, Deisenhofen
Bortezomib	Prof. Ralf Bargou, Würzburg
Caspase-3 Inhibitor V	Merck, Mannheim
Cyclohexamid (CHX)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Sigma, Deisenhofen
FLAG-Peptid	Sigma, Deisenhofen
fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Lipofectamine® 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Milchpulver	AppliChem, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
Phosphataseinhibitorcocktail-1 und -2	Sigma, Deisenhofen
Protease-Inhibitor "complete"	Roche, Mannheim
Protein G Agarose	Roche, Mannheim
Protein Marker (prestained, 7-175 kDa)	New England Biolabs, Frankfurt
RPMI1640 Medium	PAA, Pasching, Österreich
Sucrose	Sigma, Deisenhofen
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
TNF, rekombinant, human	Knoll AG, Ludwigshafen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA Lösung	PAA, Pasching, Österreich
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Y27632	Merck, Mannheim
zVAD-fmk	Bachem, Heidelberg

2.2 Antikörper

Anti-Akt	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling, Beverly, USA
Anti-Bax	Maus	monoklonal	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Caspase-2	Maus	monoklonal	BD, Heidelberg
Anti-Caspase-3	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling, Beverly, USA
Anti-Caspase-8	Maus	monoklonal	Schultze-Osthoff, Düsseldorf
Anti-Caspase-9	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling, Beverly, USA
Anti-ERK	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling, Beverly, USA
Anti-FADD	Maus	monoklonal	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Fas	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-FLIP	Maus	monoklonal	Alexis, Lörrach
Anti-Flotillin	Maus	monoklonal	BD, Heidelberg
Anti-I κ B α	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling, Beverly, USA
Anti-JNK	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling, Beverly, USA
Anti-p38	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling, Beverly, USA
Anti-PARP-1	Maus	monoklonal	BD, Heidelberg
Anti-phospho-Akt	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling, Beverly, USA
Anti-phospho-ERK	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling, Beverly, USA
Anti-phospho-I κ B α	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling, Beverly, USA
Anti-phospho-JNK	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling, Beverly, USA
Anti-phospho-p38	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling, Beverly, USA
Anti-ROCK-1	Ziege	polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg
Anti- β -Aktin	Maus	monoklonal	Sigma, Deisenhofen
Anti-Transferrinrezeptor	Maus	monoklonal	BD, Heidelberg

2.3 Verbrauchsmaterial und Geräte

15 cm Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen
15 ml Polypropylenröhrchen	Greiner, Frickenhausen
175 cm ² Zellkulturflasche	Greiner, Frickenhausen
50 ml Polypropylenröhrchen	Greiner, Frickenhausen
6 cm Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen
6-Well Platten	Greiner, Frickenhausen
75 cm ² Zellkulturflasche	Greiner, Frickenhausen
96-Well Platten, Flachboden	Greiner, Frickenhausen
Begasungsbrutschrank Heraeus Cell Safe	Heraeus, Hanau

Blockheizer	Peqlab, Erlangen
Dialyseschlauch "Viking", MWCO 15kDa	Roth, Karlsruhe
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD, Heidelberg
Durchflusszytometrie Röhrrchen	Falcon, Heidelberg
Elektrophoresesystem "Mini-Protean Tetra Cell"	BioRad, München
Kryoröhrrchen	Greiner, Frickenhausen
Luminometer Lucy 2	Anthos, Krefeld
Nitrocellulosemembran, 0.2 µM Porengröße	Whatman, Dassel
Reaktionsgefäße 1.5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Stromquelle EPS 301	GE Healthcare, Garching

2.4 Kits

OptEIA IL8-ELISA Kit	BD, Heidelberg
Apo-BrdU [®] Kit	Merck, Darmstadt
Venor [®] GeM Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs, Berlin
peqGOLD RNAPure	Peqlab, Erlangen

2.5 Puffer und Lösungen

Blotpuffer	0.025 M Tris 0.192 M Glycin 20 % (v/v) Methanol pH 8.3
ELISA Coating Buffer	0.1 M Carbonat pH 9.5
Laemmli-Puffer (4x konz.)	0.25 M Tris 8 % (w/v) SDS 40 % Glycerol 20 % 2-Mercaptoethanol 0.004 % Bromphenolblau
Laufpuffer (SDS-PAGE)	0.05 M Tris 0.38 M Glycin 0.004 M SDS pH 8.3
MTT-Lysispuffer	50 % (v/v) Dimethylformamid 15 % SDS pH 4.7

PBS (phosphate buffered saline)	0.02 M Natriumphosphat 0.7 % (w/v) NaCl pH 7.2
PBS-T	PBS + 0.05 % (v/v) Tween-20
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	0.5 M Tris 0.015 M SDS pH 6.8
TBS (Tris buffered saline)	0.02 M Tris 0.8 % (w/v) NaCl pH 7.6
TBS-T	TBS + 0.05 % (v/v) Tween-20
TNE-Puffer	0.025 M Tris 0.15 M NaCl 0.005 M EDTA 0.001 M Pefabloc 0.005 M Iodoacetamid 0.001 M NaF 0.001 M Na ₃ VO ₄
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	1.5 M Tris 0.015 M SDS pH 8.8
Triton X-100 Lysispuffer	0.03 M Tris-HCl 1 % (v/v) Triton X-100 10 % Glycerol 0.120 M NaCl pH 7.5

2.6 Zelllinien

Die HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden im Labor von Bert Vogelstein (Howard Hughes Medical Institute, Baltimore, USA) durch "gene targeting" erstellt (Samuels et al., 2005) und freundlicherweise überlassen. Parentale HCT116 Zellen sind am *PIK3CA*-Lokus diploid, ein Allel trägt im Exon 20 eine H1047R Mutation. Diese betrifft die Kinasedomäne der PI3Kinase was zu einer konstitutiven Aktivierung führt. Durch gezielte Insertion über ein Adeno-assoziiertes Virus in Exon 1 wurde je ein Allel in parentalen HCT116 Zellen zerstört (Hirata et al., 2002; Kohli et al., 2004). Somit wurden Zelllinien erzeugt, welche nur ein funktionsfähiges *PIK3CA*-Allel besitzen, entweder das Wildtyp- oder das mutierte Allel.

Aus den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden von Dr. Daniela Siegmund (Abt. für Molekulare Innere Medizin, Universität Würzburg) durch retroviralen Gentransfer Zelllinien erstellt, welche das antiapoptotische Protein FLIP-Short (FLIPs) überexprimieren, sowie eine korrespondierende Vektorkontrolle.

Die Parentalzelllinie HCT116 sowie die Bax-defizienten HCT116 Zellen waren in der Arbeitsgruppe vorhanden.

2.7 Fusionsproteine

Da TRAIL in seiner trimeren Form nur eine äußerst geringe Bioaktivität aufweist, wurden alle Experimente mit der hochaktiven, in *E.coli* produzierten TRAIL Variante KillerTRAIL® (Axxora, Lörrach) durchgeführt.

Fc-FasL wurde von Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Innere Medizin kloniert. Für die Produktion des Liganden in HEK293 Zellen wurden 40×10^6 Zellen in 1 ml Medium aufgenommen, mit 40 µg entsprechender Plasmid-DNA versetzt und elektroporiert (Küvetten mit 4 mm Elektrodenabstand, 250 V, 1800 µF, maximaler Widerstand). Die Zellen wurden auf 15 cm Platten ausplattiert, über Nacht kultiviert und am nächsten Tag das Medium gewechselt (RPMI1640 + 0.5 % FCS). Die Überstände wurden nach 72 h gesammelt und die Konzentration des produzierten Proteins im Überstand im Western Blot anhand eines Standards näherungsweise bestimmt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie über einen im Protein vorhandenen FLAG-Tag. Verwendet wurde Anti-FLAG-M2 Agarose (Sigma, Deisenhofen), die Elution des gebundenen Proteins von der Agarose erfolgte mit 100 µg/ml FLAG-Peptid (Sigma, Deisenhofen). Das Eluat wurde über Nacht gegen PBS dialysiert, die Proteinkonzentration wiederum im Western Blot anhand eines Proteinstandards näherungsweise bestimmt.

2.8 siRNA-Oligonukleotide

Alle siRNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen.

Zielprotein	siRNA
Caspase-8	Sense: 5'-GAGUCUGUGCCCAAUAATT-3'
	Antisense: 5'-UUGAUUUGGGCACAGACUCTT-3'
ROCK-1	Sense: 5'-AGCUCGAAUUACAUCUUUATT-3'
	Antisense: 5'-UAAAGAUGUAAUUCGAGCUTG-3'

In jedem Experiment wurde eine Kontrollgruppe mit einem unspezifischen siRNA-Oligonukleotid (AllStars® negative control; Qiagen, Hilden; Sequenz patentrechtlich geschützt) mitgeführt.

3 Methoden

3.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die Parentalzelllinie HCT116 sowie die daraus hervorgegangenen Zelllinien HCT116 *PIK3CA*-wt, HCT116 *PIK3CA*-mut, HCT116 *PIK3CA*-mut pEGZ, HCT116 *PIK3CA*-mut pEGZ-FLIPs und HCT116 Bax^{-/-} wurden in RPMI1640 Medium (PAA Laboratories, Pasching, Österreich), supplementiert mit 10 % hitzeinaktivierten fötalem Kälberserum (FCS Gold, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei ausreichender Konfluenz des Zellrasens wurden die Zellen mit Trypsin (0.025 %) und EDTA (10 mM) abgelöst und im Verhältnis 1:5 bis 1:10 gesplittet. Das Bestimmen der Zellzahl vor dem Aussäen erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer.

Alle Zellen wurden in regelmäßigen Abständen mit dem "Venor[®]GeM Mycoplasma Detection Kit" (Minvera Biolabs, Berlin) auf Mykoplasmen untersucht.

3.2 Zytotoxizitätassay

Für die Zytotoxizitätsbestimmung wurden 2×10^4 Zellen pro Well in eine 96-Well Mikrotiterplatte (Flachboden) eingesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde mit Fc-FasL oder TRAIL behandelt. Dabei wurden entweder konstante Konzentrationen eingesetzt oder sequentielle Verdünnungsreihen auf die Zellen titriert, für jede Versuchsgruppe wurden Dreifachwerte angesetzt. Die Zugabe von pharmakologischen Inhibitoren erfolgte immer vor Stimulationsbeginn. Um die Effekte von Caspaseinhibition auf die Zellvitalität zu untersuchen, wurde in einigen Experimenten der Pan-Caspaseinhibitor zVAD-fmk (100 µM) oder ein Caspase-3 spezifischer Inhibitor (20 µM) 1 h vor Stimulationsbeginn vorinkubiert. Der ROCK (Rho-associated coiled-coil containing protein kinase)-Inhibitor Y27632 wurde 2 h vor Stimulation 10 µM zugegeben.

Die Zellvitalität wurde mittels MTT-Färbung im Vergleich zu einer Kontrollgruppe bestimmt. Vitale Zellen reduzieren das wasserlösliche 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid über NADH/NADPH (und partiell über mitochondriale Succinat-Dehydrogenase) in ein bläuliches, wasserunlösliches Formazan. Die Menge des umgesetzten Farbstoffs entspricht somit der Glykolyserate der Zelle.

Nach 16 h Stimulation wurde 10 µl MTT-Lösung (10 mg/ml) zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von 90 µl MTT-Lysispuffer (1 Teil Dimethylformamid, 1 Teil H₂O, 15 % SDS, pH 4.7), nach 6 h Lyse wurden die

Mikrotiterplatten im Luminometer bei 570 nm vermessen. Die erhaltenen OD-Werte wurden bezogen auf die Kontrollgruppe in Prozenträge umgerechnet und mit dem Programm "GraphPad Prism 5" (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) graphisch dargestellt.

3.3 Transfektion mit siRNA-Oligonukleotiden

Die Zellen wurden 24 h vor Beginn der Transfektion in 6-Well Platten (2.5×10^5 Zellen pro Well) ausgesät. Pro Gruppe wurde in einem Volumen von 2 ml 200 pmol siRNA-Oligonukleotid verwendet. Die Transfektion erfolgte transient mit "Lipofectamine[®] 2000 Transfection Reagent" nach Angaben des Herstellers. Die Effizienz der RNA-Interferenz wurde 48 h nach Transfektion durch Detektion der Zielproteine im Western Blot bestimmt. Bei siRNA Experimenten, in welchen nachfolgend mit Fc-FasL oder TRAIL stimuliert wurden, erfolgte zuvor ein Mediumwechsel.

3.4 IL8- und uPA-Bestimmung

Für die Interleukin-8 (IL8)-Bestimmung wurden in einer 96-Well Flachboden Mikrotiterplatte 2×10^4 Zellen pro Well eingesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die einzelnen Versuchsgruppen wurden als Dreifachwerte angesetzt. Um den Einfluss endogener IL8-Produktion auf das Messergebnis zu minimieren, wurde unmittelbar vor Stimulationsbeginn am folgenden Tag das Medium gewechselt. Anschließend wurden die Zellen mit 200 ng/ml Fc-FasL bzw. 50 ng/ml TRAIL für 6 h stimuliert. Die Überstände der Platte wurden abgenommen und die IL8-Konzentration entsprechend den Herstellervorgaben mit dem "OptEIA IL8-ELISA-Kit" (Pharmingen, San Diego, USA) bestimmt.

Für die Messung von uPA (urokinase-type plasminogen activator) aus den Überständen der HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden 2×10^6 Zellen in 6-Well Platten ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Vor der Stimulation wurde das Medium gegen serumfreies ersetzt, die Zellen dann mit 200 ng/ml Fc-FasL oder 50 ng/ml TRAIL für 16 h stimuliert. Der Überstand wurde abgenommen, zweimal bei 14.000 U/min 20 min abzentrifugiert und die Konzentration von uPA mit dem "human u-Plasminogen Activator ELISA" (R&D Systems, Minneapolis, USA) entsprechend der Herstellerangaben bestimmt. Die im Well verbliebenen Zellen wurden gezählt und die gemessene uPA-Menge im Überstand auf die Anzahl der Zellen normiert. Das Auftragen der Proben und die technische Durchführung des ELISAs erfolgte durch PD Dr. Anna Trauzold, Abt. für Molekulare Onkologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

3.5 Durchflusszytometrie

3.5.1 Expression von Rezeptoren an der Zelloberfläche

Die Expression der Rezeptoren Fas, TRAILR1 und TRAILR2 wurde im Durchflusszytometer nachgewiesen. Hierfür wurden 1×10^5 Zellen pro Gruppe eingesetzt und mit 125 ng/ml PE-markierten Antikörpern gegen TRAILR1 und TRAILR2 (R&D Systems, Minneapolis, USA) oder FITC-konjugierten Antikörpern gegen Fas (R&D Systems) 30 min auf Eis inkubiert. Die Spezifität der Färbung wurde mit den korrespondierenden fluoreszenzmarkierten, isotypspezifischen Antikörpern kontrolliert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde ungebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen in PBS entfernt, die zellgebundenen Antikörper wurden im Durchflusszytometer (FACSCalibur; BD Bioscience, San Jose, USA) entsprechend dem Herstellerprotokoll nachgewiesen. Jede Antikörperfärbung wurde als Dreifachwert angesetzt.

3.5.2 Apoptosenachweise mit Annexin-V und TUNEL

Um mit unterschiedlichen Methoden die Apoptoseresistenz der HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen nachzuweisen, wurden auch durchflusszytometrische Verfahren wie die Annexin-V Färbung und das "TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling" (TUNEL) Verfahren verwendet.

Für die Annexin-V Färbung wurden 1×10^5 Zellen pro Gruppe eingesetzt und für 6 h mit 200 ng/ml Fc-FasL oder 50 ng/ml TRAIL stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, zweimal in Annexin-V-Puffer (PBS + 0.33 g/l CaCl_2) gewaschen und in 70 μL aufgenommen. Dazu wurden 5 μL FITC-markiertes Annexin-V (Immunotools, Friesoythe) pipettiert, 15 min im Dunkeln inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert.

Der TUNEL Assay wurde mit dem "Apo-BrdU[®] Kit" (Merck, Darmstadt) durchgeführt. Nach Stimulation mit 200 ng/ml Fc-FasL oder 50 ng/ml TRAIL für 6 h wurden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und mit 1 % Paraformaldehyd in PBS 30 min auf Eis fixiert. Die Zellzahl wurde auf 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt, 5 min bei 300 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal in 5 ml PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Zellen in 1 ml eiskalten 70 % Ethanol 30 min permeabilisiert. Der von der terminalen Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) vermittelte Einbau des Basenanalogs Bromdeoxyuridin (BrdU) und anschließende Färbung mit FITC-markiertem Anti-BrdU und Propidiumiodid erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

3.6 Herstellung von Zelllysaten

Für die Analyse phosphorylierter Proteine im Western Blot wurden Gesamtzelllysate verwendet. Am Versuchsende wurden die Zellen mit einem Zellschaber geerntet, in ein 15 ml Polypropylenröhrchen überführt und bei 200 U/min 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Zellpellet in 4x Laemmli-Probenpuffer (0.25 M Tris, 8 % SDS, 40 % Glycerol, 20 % 2-Mercaptoethanol, 0.004 % Bromphenolblau; Zugabe 100 μ L pro 1.5×10^6 Zellen) aufgenommen. Um eine Dephosphorylierung zu verhindern wurde der Puffer zusätzlich mit den Phosphataseinhibitor-Cocktail-I und -II (Sigma, Deisenhofen) versetzt. Die Proben wurden sonifiziert und bei 96 °C 5 min gekocht, anschließend 10 min bei 13.000 U/min zentrifugiert und bei -20 °C bis zu Analyse gelagert.

Für alle anderweitigen Proteinanalysen im Western Blot wurden die Zellen am Versuchsende in Triton X100-Lysispuffer (0.03 M Tris-HCL pH 7.4, 0.12 M NaCl, 10 % Glycerol, 1 % Triton X-100) supplementiert mit Proteaseinhibitor (complete protease inhibitor, Roche, Mannheim) aufgenommen. Pro 5×10^6 Zellen wurden 100 μ L Lysispuffer zugegeben. Die Proben wurden 20 min auf Eis inkubiert, mit drei sequentiellen Zentrifugationen (5000 U/min, 5 min, 4 °C; zweimal 14.000 U/min 20 min, 4 °C) wurden unlösliche Membranbestandteile abgetrennt, der verbliebene Überstand mit 4x Laemmli-Probenpuffer versetzt und bis zu Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

3.7 Vorhersage von Caspaseschnittstellen mit GraBCas

Die Aminosäuresequenz des Proteins ROCK-1 (Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1) wurde mit Hilfe des Programms GraBCas (verfügbar unter <http://www.uniklinikum-saarland.de/de/einrichtungen/fachrichtungen/humangenetik/software>) auf das Vorliegen möglicher Caspaseschnittstellen untersucht. Die Aminosäuresequenz von ROCK-1 wurde der Internet Datenbank "Uniprot" (www.uniprot.org) entnommen und im FASTA Format in GrabCas eingegeben. Das Programm sucht mögliche Schnittstellen der Caspasen 1-9 (Backes et al., 2005). Dabei werden in einer Aminosäuresequenz alle Tetrapeptide mit Aspartat an letzter Position gesucht und aufgrund der im Tetrapeptid vorhandenen Aminosäuren sowie deren Position innerhalb des Motivs einen Punktwert zwischen 0 und 100 errechnet. 0 bezeichnet keine Übereinstimmung mit dem Konsensus-Erkennungsmotiv der jeweiligen Caspase, 100 bezeichnet die vollständige Übereinstimmung.

3.8 Western Blot

3.8.1 SDS-PAGE

Die Proteinproben für die Western Blot Analyse wurden über Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. SDS-PAGE) nach ihrer Größe aufgetrennt. Der Acrylamid Anteil der verwendeten Trenngele lag je nach Größe des zu detektierenden Proteins bei 8 % - 13.5 %, die weiteren Bestandteile des Trenngels (0.374 M Tris pH 8.8, 0.0035 M SDS, 0.1 % APS) blieben konstant. Die Polymerisation wurde mit 0.1 % Tetramethylethylendiamin (TEMED) in Gang gesetzt. Das Trenngel wurde nach Auspolymerisation mit Sammelgel (6 % Acrylamid, 0.123 M Tris pH 6.8, 0.00375 M SDS, 0.1 % APS, 0.1 % TEMED) überschichtet, ein Kamm für die Probenaschen eingesetzt und nach Aushärtung mit den Proteinproben beladen und mit Spannungen zwischen 90 und 130 Volt elektrophoretisch aufgetrennt.

3.8.2 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine in einer horizontalen Blotkammer (PerfectBlue SEDEC M; Peqlab, Erlangen) auf Nitrocellulosemembranen (Protran®, Porengröße 0.2 μ M; Whatman, Dassel) transferiert. Beladung und Zusammenbau der Blotkammer erfolgten entsprechend den Herstellerangaben. Die Stromstärke betrug je cm^2 Gelfläche 1.5 mA, die Dauer des Transfervorgangs je nach Proteingröße 1.5 h bis 2 h.

3.8.3 Immunfärbung

Die auf die Nitrocellulosemembran transferierten Proteine wurden mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Hierfür wurde zunächst zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen die Membran 1 h in Blockpuffer (TBS-T + 5 % Milch) geschwenkt. Nachfolgend wurde die Membran dreimal in TBS-T gewaschen und über Nacht mit einem spezifischen Antikörper gegen das nachzuweisende Protein inkubiert. Die Antikörperkonzentration betrug, soweit nicht anders angegeben, 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Anschließend wurde wieder dreimal in TBS-T gewaschen und die Membran 1 h mit einem gegen den Erstantikörper gerichteten, peroxidase-konjugiertem zweiten Antikörper inkubiert. Die Konzentration des Zweitantikörpers richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Nach erneutem Waschen mit TBS-T wurden die

Membranen mit einem luminolbasierten Substrat (ECL Western Blotting Detection System; GE Healthcare, Garching) benetzt und die entstandene Chemolumineszenz auf Röntgefilmen (Amersham ECL HyperFilm; GE Healthcare, Garching) detektiert. Die Filme wurden mit einer Agfa Curix 60 Entwicklermaschine (Agfa, Düsseldorf) entwickelt, anschließend eingescannt und mit Adobe Photoshop® CS3 zu Abbildungen verarbeitet.

3.9 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wurde für die Analyse des Fas Signalkomplexes in den HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen sowie zum Nachweis der Assoziation von ROCK-1 mit Caspase-8 in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen angewendet. Für jede Bedingung wurde eine konfluente 175 cm² Zellkulturflasche (20x10⁶ Zellen) eingesetzt.

Für die Analyse des Fas Rezeptorsignalkomplexes wurden die Zellen mit 200 ng/ml Fc-FasL für 1 h und 2 h in 5 ml Medium stimuliert, anschließend mit einem Zellschaber geerntet, in ein 15 ml Polypropylenröhrchen überführt und 3 min bei 1.200 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Triton X-100 Lysispuffer versetzt mit "complete protease inhibitor" (Roche, Mannheim) aufgenommen und 20 min auf Eis lysiert. Unlösliche Membranbestandteile wurden durch sequentielle Zentrifugation (5 min, 5.000 U/min; zweimal 20 min, 14.000 U/min) abgetrennt, von den erhaltenen Proben wurde je 150 µL für die Analyse der Lysate abgenommen. Der verbliebene Überstand wurde für die Immunpräzipitation eingesetzt. Jede Gruppe wurde mit 40 µL Protein G gekoppelter Agarose (Roche, Mannheim) versetzt und 16 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Als Kontrolle wurden Lysate von unstimulierten Zellen, welche mit 50 ng/ml Fc-FasL versetzt wurden, präzipitiert. Die Agarose wurde fünfmal mit eiskaltem Triton X-100 Lysispuffer gewaschen, nach dem letzten Waschschrift der Überstand verworfen und die Agarose mit 120 µL 1x Laemmli Probenpuffer versetzt. Die Proteine wurden durch 15 min kochen bei 75 °C von der Agarose eluiert, mit einer Insulinspritze der Überstand abgenommen und die Proben bei -20 °C bis zur Analyse gelagert.

Die Immunpräzipitation von ROCK-1 erfolgte nach einem ähnlichen Schema. Nach Beendigung der Stimulation, Ernte und Zellyse wurde in jede Gruppe 5 µg ROCK-1-spezifischer Antikörper (C-19, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) zugegeben und für 1 h bei 4 °C inkubiert und anschließend 50 µL Protein G gekoppelte Agarose pro Gruppe zugegeben. Alle weiteren Schritte erfolgten analog zu den oben beschriebenen.

3.10 Isolation von "lipid rafts"

Für die Isolation von Detergenz-resistenten Membranfraktionen wurde eine konfluente 175 cm² Zellkulturflasche pro Gruppe (20x10⁶ Zellen) eingesetzt. Die Zellen wurden nach Beendigung des Versuchs mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein 15 ml Polypropylenröhrchen überführt und 3 min bei 1200 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in TNE-Puffer (0.025 M Tris pH 7.5, 0.150 M NaCl, 0.005 M EDTA, 0.001 M Pefabloc, 0.005 M C₂H₄INO, 0.001 M Na₃VO₄, 0.001 M NaF) versetzt mit 0.75 % Triton X-100 aufgenommen. Nach 20 minütiger Lyse auf Eis wurden die Proben mit 200 µL serumfreien RPMI1640 Medium versetzt, in 400 µL Sucroslösung aufgenommen (80 % in TNE-Puffer) und schließlich mit 30 % Sucroslösung (2,8 ml in TNE-Puffer) überschichtet. Die Fraktionierung über den diskontinuierlichen Sucrosegradienten erfolgte durch Zentrifugation (257.000 g, 20 h) in einem Beckman SW60 Rotor (Beckman Coulter, Krefeld). Nach Beendigung des Zentrifugenlaufs wurden von jeder Probe 4 Fraktionen abgenommen, die Detergenz-unlöslichen Membranbestandteile einschließlich der "lipid rafts" waren in der Fraktion mit der geringsten Dichte (Fraktion 1) enthalten.

3.11 Mikroskopie

Für die Aufnahmen des Aktinzytoskeletts der HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurde ein konfokales Lasermikroskop Zeiss LSM510 (Zeiss, Oberkochen) eingesetzt. 4x10⁴ Zellen wurden auf ein Deckglas ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 200 ng/ml Fc-FasL für 4 h. Die Deckgläschen wurden in PBS gewaschen, 10 min in 2 % Paraformaldehyd fixiert und 5 min in PBS mit 0.1 % Triton X-100 permeabilisiert. Das F-Aktinzytoskelett wurde mit AlexaFluor[®]488-markiertem Phalloidin (Morbitec, Göttingen) dargestellt. Die Deckgläschen wurden auf Objektträger aufgebracht, die Zwischenschicht bestand 60 % Glycerol in PBS mit 1.5 % (v/v) N-Propylgallat (Serva, Heidelberg). Die Färbung und Mikroskopie der Proben wurde von Volker Spindler, Lehrstuhl für Anatomie III der Universität Würzburg durchgeführt.

Die Durchlichtaufnahmen zur Dokumentation der Zellmorphologie entstanden mit einem Zeiss Axiovert 40 (Zeiss, Oberkochen), ausgestattet mit der digitalen Kamera Canon PowerShot 620 (Canon, Köln). Die Steuerung der Kamera erfolgte über die Software "PSRemote" (Breeze Systems, Bagshot, UK). Alle Aufnahmen haben einheitlich 400-fache Vergrößerung, alle Experimente wurden in 3 unabhängigen Ansätzen durchgeführt.

Für die Durchlichtmikroskopie wurden die Zellen in 6-Well Platten (5×10^5 Zellen pro Well) ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Experimente durch Zugabe von Fc-FasL oder TRAIL gestartet, jegliche pharmakologische Inhibitoren wurden in angegebener Konzentration vor Stimulationsbeginn zugegeben. Am Versuchsende wurden zufällig ausgewählte Gesichtsfelder der Wells mikroskopiert und fotografisch dokumentiert, für die graphische Darstellung wurde das Programm "GraphPad Prism 5" (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) eingesetzt.

3.12 DNA-Microarray

Die Genexpression der HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurde mit dem "Whole Human Genome" DNA-Microarray (G4112F, ID 014850) der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, USA) analysiert. Dieser Array umfaßt Sequenzen von über 45.015 Oligonukleotidsequenzen, welche das gesamte humane Transkriptom abdecken. Die benötigte RNA wurde mit dem Kit "peqGOLD RNAPure" (Peqlab, Erlangen) isoliert. Das Umschreiben der RNA, Fluoreszenzmarkierung, Hybridisierung mit dem Microarray und die komplexe Normalisierung der Signale wurden von Dr. Oliver Dittrich-Breiholz, Institut für Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover, durchgeführt.

Die erhaltenen Daten über hochregulierte Gene in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden weiter mit dem Internet-basierten Programm "Gene Ontology Tree Machine" (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/gotm/>) der Vanderbilt University ausgewertet. Das Programm ermöglicht nach Registrierung kostenfrei neben der visuellen Darstellung der Datenmenge eine schnelle Navigation und statistische Analysen.

4 Ergebnisse

4.1 *PIK3CA*-mut blockiert TRAIL- und FasL-vermittelte Apoptose bei erhaltener Caspase-8 Aktivierung

Die antiapoptotische Wirkung einer Punktmutation im *PIK3CA*-Gen, die zu einem Aminosäureaustausch an Position 1047 von H zu R und zu einer konstitutiv aktiven Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) führt, fiel bereits in einer früheren Studie mit der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 auf. Dabei zeigte sich, dass die Expression eines mutierten Allels bereits ausreichend ist, um eine deutliche Resistenz gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose zu erreichen (Samuels et al., 2005).

Dieser Befund konnte in Zytotoxizitätsassays bestätigt werden (Abbildung 6). Während isogene, nur das *PIK3CA*-wt Allel exprimierende HCT116-Zellen nach Behandlung mit Fc-FasL, einer hochaktiven, hexameren Variante des Liganden (Holler et al., 2003), fast vollständig starben (ED_{50} ca. 10 ng/ml), überlebten die meisten Zellen mit *PIK3CA*-mut Allel selbst die Behandlung mit hohe Dosen dieses Todesliganden. Ein vergleichbares Ergebnis zeigte sich für TRAIL. HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen überlebten auch Behandlungen mit niedrigen Dosen des Liganden nicht, während die *PIK3CA*-mut exprimierenden Zellen nahezu vollständig vor dem Zelltod geschützt waren.

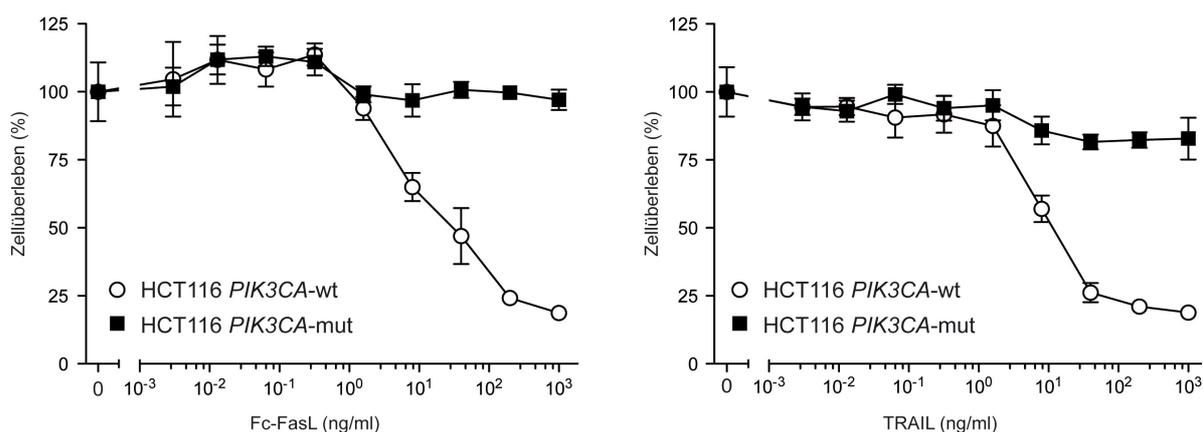


Abbildung 6: Toxizität von FasL und TRAIL auf HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen

HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden in 96-Well Platten ausgesät (2×10^4 Zellen pro Well) und am nächsten Tag mit den angegebenen Konzentrationen (Dreifachwerte) von Fc-FasL oder TRAIL stimuliert. Die Zellvitalität wurde am nächsten Tag mittels MTT-Färbung ermittelt.

Die Apoptoseresistenz der HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen zeigte sich auch in anderen Vitalitätsassays (Abbildung 7). So war die DNA-Fragmentierung, die als eines der Charakteristika des apoptotischen Zelltods (Zhang und Xu, 2000) gilt, im TUNEL-Assay nach Behandlung mit FasL oder TRAIL im Vergleich zur Positivkontrolle nicht nachweisbar oder nur äußerst gering (Abbildung 7A). Weiterhin gilt die Translokation von Phosphatidylserin von der zytosolischen Seite der Plasmamembran an deren extrazelluläre Seite als frühes Ereignis nach Apoptoseinduktion. Extrazelluläres Phosphatidylserin kann durch rekombinantes Fluorophor-markiertes Annexin-V im Durchflusszytometer nachgewiesen werden (van Engeland et al., 1998). Die apoptoseresistenten HCT116 *PIK3CA*-mut exprimierenden Zellen zeigen nach Behandlung mit FasL oder TRAIL keine Annexin-V Bindung an der Zelloberfläche (Abbildung 7B).

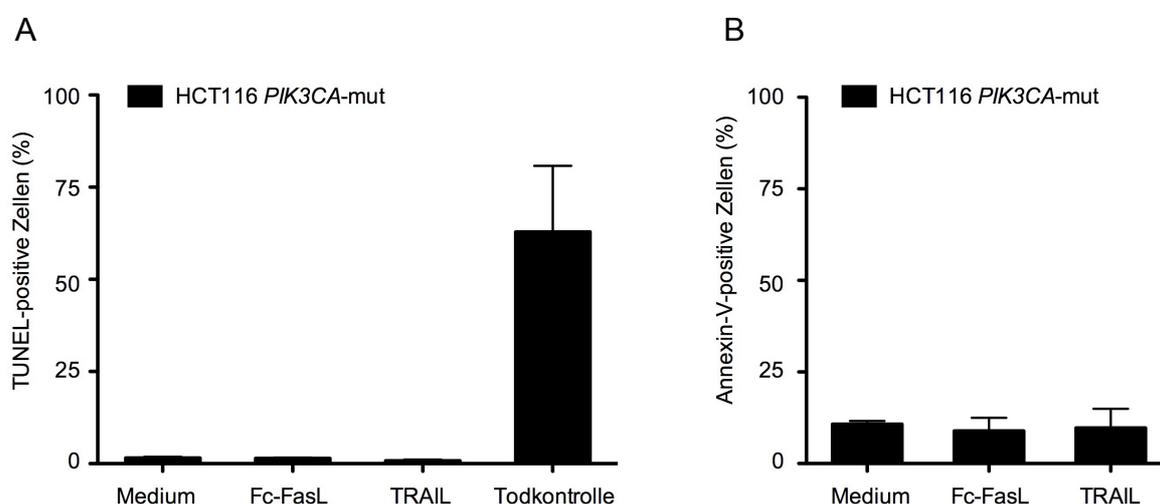


Abbildung 7: *PIK3CA*-mut schützt HCT116 Zellen gegen FasL- und TRAIL-vermittelte Apoptose

HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden auf 12-Well Platten (5×10^5 Zellen pro Well) ausgesät und am nächsten Tag in Triplikaten mit Fc-FasL (200 ng/ml) oder TRAIL (50 ng/ml) für 6 h behandelt. Anschließend wurde die Anzahl TUNEL- (A) sowie Annexin-V-positiver Zellen (B) im Durchflusszytometer bestimmt. Für jede Gruppe wurden Dreifachwerte angesetzt.

Zusammenfassend bestätigen die Vitalitätsassays die bereits vorbeschriebene Resistenz der HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen gegenüber Todesrezeptor-induzierter Apoptose.

Durch Vorinkubation mit dem Pan-Caspaseinhibitor zVAD-fmk konnte in den HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen der durch FasL oder TRAIL ausgelöste Zelltod nahezu vollständig verhindert werden (Abbildung 8). Dies zeigte, dass der durch FasL- oder TRAIL-induzierte Zelltod essentiell von der Aktivierung von Caspasen abhängig ist, was ein typisches Kennzeichen für Apoptose ist.

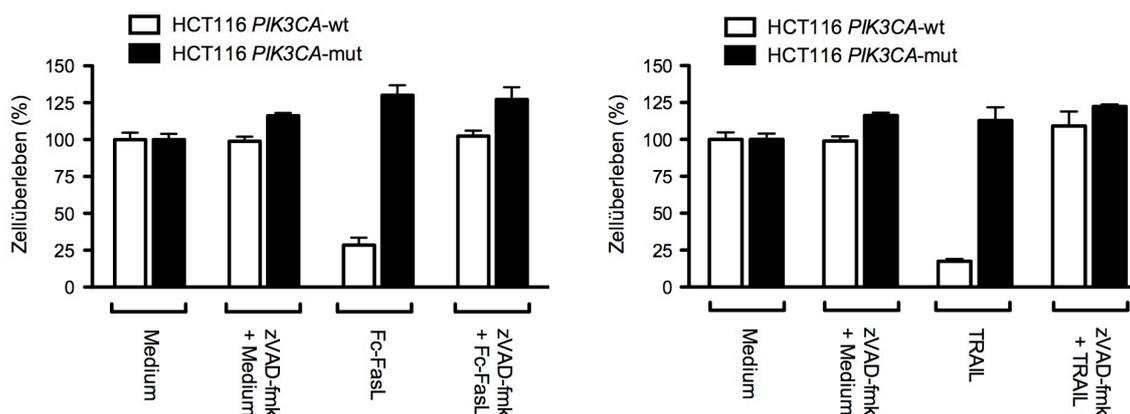


Abbildung 8: Protektion der HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen durch den Pan-Caspaseinhibitor zVAD-fmk

HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen (2×10^4 Zellen pro Well) wurden in 96-Well Platten ausgesät und am nächsten Tag in An- oder Abwesenheit des Pan-Caspaseinhibitors zVAD-fmk (100 μ M, 1 h Vorinkubation) mit 200 ng/ml Fc-FasL oder 50 ng/ml TRAIL stimuliert (Dreifachwerte). Am nächsten Tag wurde wiederum die Vitalität der Zellen mit Hilfe des MTT-Assays bestimmt.

Um auszuschließen, dass die unterschiedliche Sensitivität der HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut exprimierenden Zellen gegenüber FasL und TRAIL lediglich von Unterschieden in der Oberflächenexpression der entsprechenden Todesrezeptoren herrührt, wurde diese im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 9).

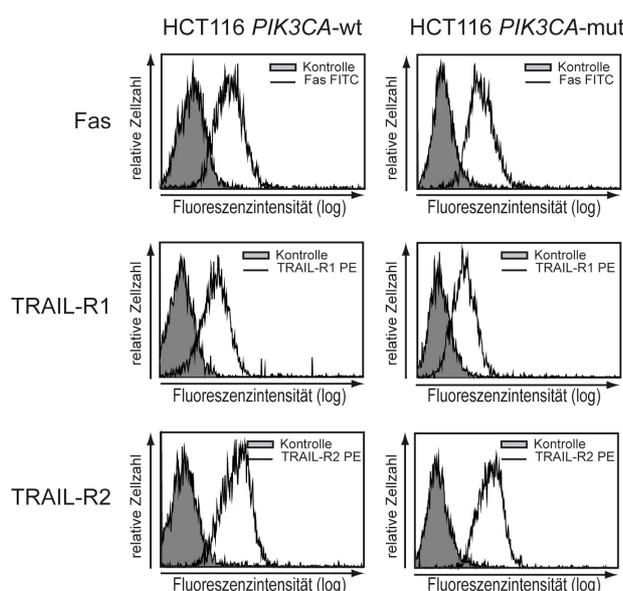


Abbildung 9: Oberflächenexpression von Fas, TRAILR1 und TRAILR2

HCT116 *PIK3CA*-wt und *PIK3CA*-mut Zellen (1×10^5 pro Gruppe) wurden mit 2,5 μ g/ml fluorophorkonjugiertem Antikörper gegen Fas, TRAILR1 oder TRAILR2 bzw. der jeweiligen Isotypkontrolle inkubiert und die Fluoreszenz im Durchflusszytometer detektiert.

Das Expressionsniveau von Fas, TRAILR1 und TRAILR2 war in beiden Zelllinien vergleichbar, und konnte daher nicht für die beobachtete Resistenz der HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen verantwortlich sein.

Die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges kann zur erhöhten Expression der Todesrezeptoren-inhibierenden cFLIP-Proteine führen (Panka et al., 2001; Suhara et al., 2001). Als nächstes wurde deshalb geprüft, ob die FasL-/TRAIL-Resistenz der HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen auf der Induktion dieser Moleküle beruht. Auf Proteinebene wurden bislang die drei Isoformen cFLIP_S, cFLIP_L und cFLIP_R gefunden. Da alle Isoformen des Proteins zusammen mit Procaspase-8 an Todesrezeptoren rekrutiert werden und dort an unterschiedlichen Schritten mit der Caspase-8 Aktivierung interferieren können, wurde die Formation des Fas Signalkomplexes in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen in Immunpräzipitations-experimenten (IP) untersucht (Abbildung 11).

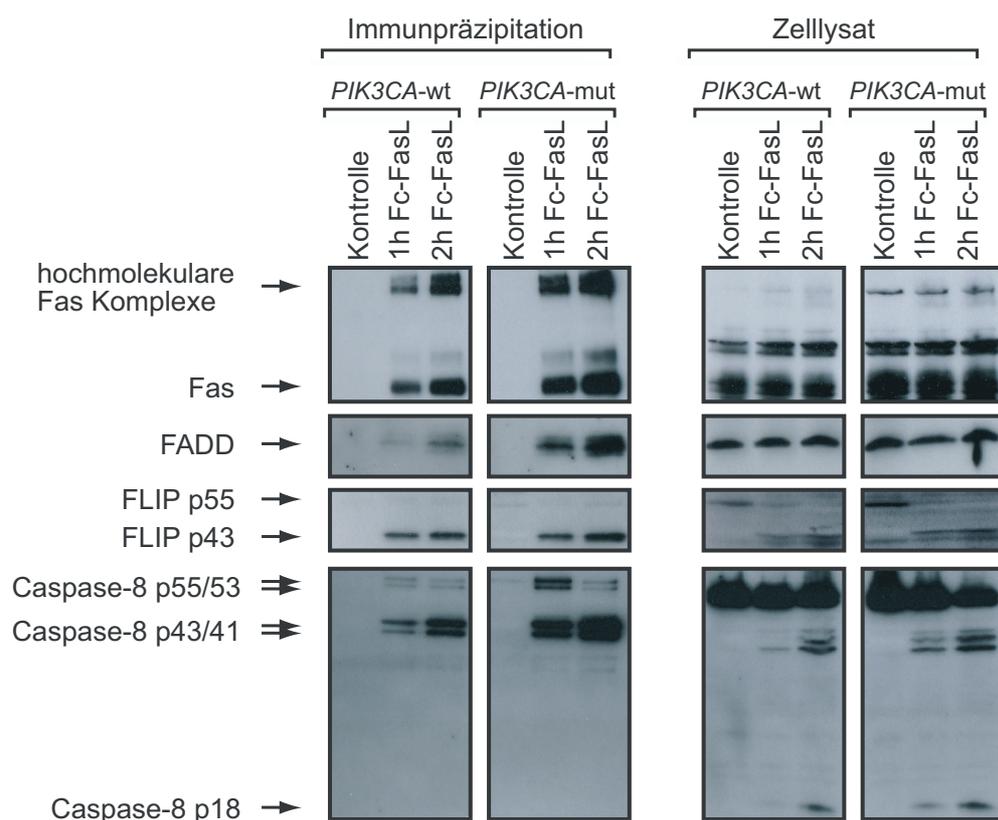


Abbildung 10: Analyse des Fas Signalkomplexes

HCT116 *PIK3CA*-wt und *PIK3CA*-mut Zellen (3×10^7 pro Gruppe) wurden mit 200 ng/ml Fc-FasL für 1 h oder 2 h stimuliert. Der Ligand-Rezeptorkomplex sowie assoziierte Proteine wurden mit Protein G Sepharose präzipitiert und zusammen mit den zugehörigen Lysaten mittels Western Blot auf die Anwesenheit von Fas sowie die weiteren Bestandteile des Signalkomplexes FADD, FLIP und Caspase-8 analysiert.

Die für die Aktivierung von Fas bekanntermaßen wichtige Formation hochmolekularer, SDS-stabiler Rezeptoraggregate (Algeciras-Schimnich et al., 2002) war in *PIK3CA*-wt und *PIK3CA*-mut exprimierenden HCT116 Zellen vergleichbar effektiv, ebenso wie die Assoziation mit FADD, Caspase-8 und cFLIP_L. Die Aktivierung von Caspase-8 und die Spaltung des Caspase-8 Substrats cFLIP_L folgte ebenfalls in beiden Zelllinien dem gleichen Muster. Die Induktion von FLIP-Proteinen spielt daher für die Resistenz der HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen gegenüber Todesrezeptor-induzierter Apoptose offensichtlich keine oder nur eine sehr untergeordnete Rolle.

In einer Studie wurde für Fas der protektive Effekt des PI3K/Akt-Signalweges auch auf eine veränderte laterale Mobilität des Rezeptors in der Plasmamembran zurückgeführt (Varadhachary et al., 2001). Daher wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation die Assoziation von Fas mit "lipid rafts" untersucht (Abbildung 11). Verglichen mit den HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen ist die basale Assoziation von Fas mit Detergenz-unlöslichen "lipid raft"-Membranfraktionen in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen erhöht. In beiden Zelltypen führte jedoch die Fas-Stimulation zu einem weiteren Anstieg der "lipid raft"-assoziierten Menge an Fas. Die durch FasL induzierbare Verstärkung der "lipid raft" Assoziation erwies sich dabei als caspasevermittelt. So konnte durch Vorinkubation mit dem Pan-Caspaseinhibitor zVAD-fmk die FasL-induzierte Translokation des Rezeptors in die "lipid raft"-Fraktion blockiert werden. Da in den Immunpräzipitationsexperimenten kein Unterschied in der Bildung des funktionellen Rezeptor-Signalkomplexes beobachtet wurde (Abbildung 10), scheinen die Unterschiede in der basalen Assoziation von Fas mit "lipid rafts" lediglich eine untergeordnete Rolle bei der *PIK3CA*-mut vermittelten Resistenz zu spielen.

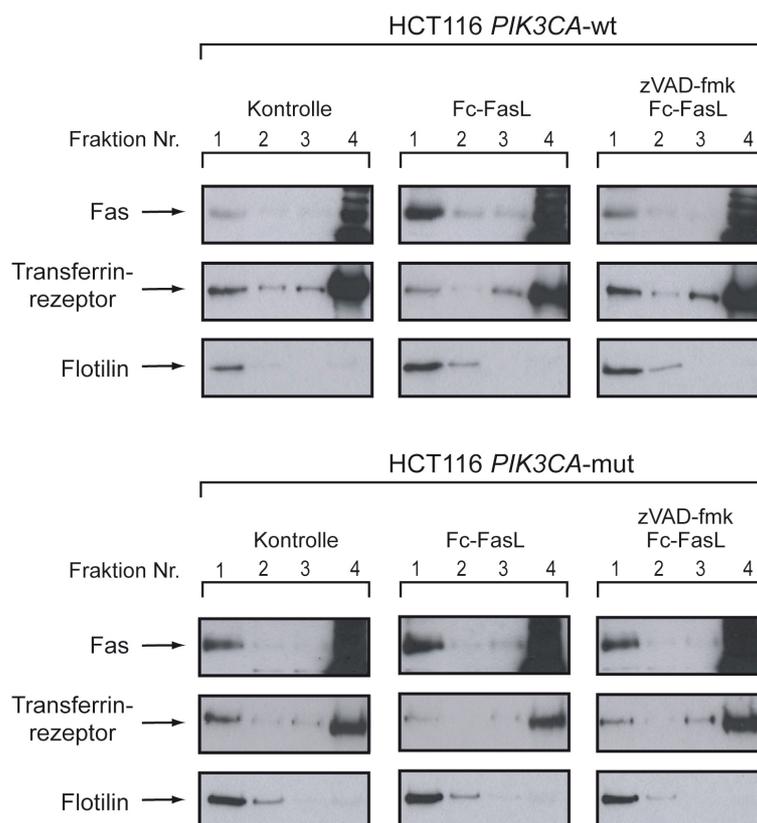


Abbildung 11: Isolation Detergenz-resistenter Membranfraktionen mittels Dichtegradientenzentrifugation

HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen (3×10^7 Zellen pro Gruppe) wurden für 2 h mit 200 ng/ml Fc-FasL stimuliert, geerntet und in Lysispuffer (0,75% Triton) lysiert. Die Auftrennung der Membranfraktionen erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation über einen diskontinuierlichen Sucrosegradienten. Die gewonnenen Fraktionen wurden mittels Western Blot auf Fas, Transferrinrezeptor und Flotillin analysiert. Fraktion 1 entspricht der niedrigsten Sucroседichte und enthält die Detergenz-resistenten Membranfraktionen, "lipid rafts" sowie "lipid raft"-assoziierte Proteine wie Flotillin. Fraktion 4 enthält den Großteil des zellulären Gesamtproteins und nicht "lipid raft"-assoziierte Rezeptoren wie den Transferrinrezeptor. Die Behandlung mit zVAD-fmk (100 μ M) erfolgte 1 h vor der Stimulation mit Fc-FasL.

Die in HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen unveränderte Fähigkeit von Fas und TRAIL-Todesrezeptoren, Caspase-8 zu aktivieren, wird auch durch die Western Blot Analyse von Zelllysaten nach FasL- oder TRAIL-Stimulation untermauert (Abbildung 12). In beiden Zelltypen erfolgte die FasL- bzw. TRAIL-induzierte Prozessierung der Procaspase-8 zur aktiven Form mit vergleichbarer Effizienz (Abbildung 12). Die initiale Prozessierung des Caspase-8 Substrats Procaspase-3 (Abbildung 12, p35) verlief in beiden Zelltypen gleichfalls vergleichbar effizient. Allerdings zeigte sich bei der weiteren Prozessierung des dabei anfallenden intermediären Caspase-3 Fragments (Abbildung 12, p19) ein funktionell bedeutender Unterschied zwischen den HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut exprimierenden Zellen. Während in den HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen nach Stimulation mit FasL oder TRAIL die Procaspase-3 vollständig prozessiert wurde, was sich in der Akkumulation der reifen p17-Untereinheit widerspiegelt, stoppte die

Prozessierung in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen auf Ebene der inaktiven p17-Vorstufe p19. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das p19-Fragment der Caspase-3 negativ durch cIAP1 reguliert wird, die reife p17-Untereinheit jedoch nicht (Choi et al., 2009). Es lag daher die Annahme nahe, dass die Prozessierung der Procaspase-3 zum vollständig aktiven (p17/p12)₂ Heterotetramer in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen durch IAP-Proteine inhibiert wird. In den HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen hingegen könnte die Freisetzung proapoptotischer mitochondrialer Faktoren die Wirkung der IAPs antagonisieren (Vaux und Silke, 2003).

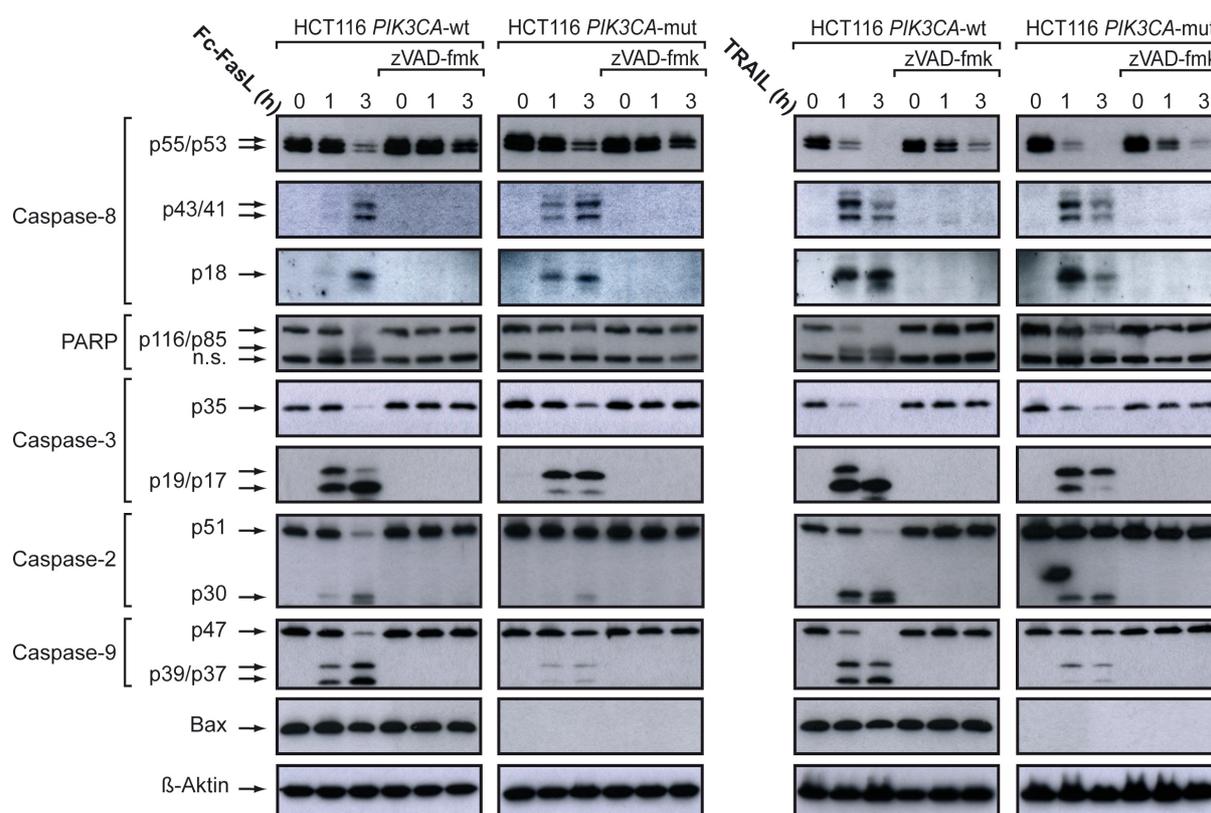


Abbildung 12: Caspaseprozessierung und Spaltung von Caspasesubstraten in HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen

HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden mit Fc-FasL (200 ng/ml) oder TRAIL (50 ng/ml) für 1 h oder 3 h stimuliert und anschließend Lysate hergestellt. Die angegebenen Proteine wurden mittels Western Blot untersucht.

Im Einklang mit dieser Idee zeigten HCT116 *PIK3CA*-wt und *PIK3CA*-mut Zellen auch Unterschiede in der Prozessierung von Procaspase-9. Während nach Ligandenstimulation bei den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen lediglich ein sehr geringer Anteil des Moleküls prozessiert wurde, war die Prozessierung von Caspase-9 bei den HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen deutlich detektierbar. Die nur partielle Prozessierung der Caspase-3 und die stark reduzierte Aktivierung von Caspase-9 in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen passt sehr gut zu dem Ausbleiben von Apoptose in diesen Zellen

nach Todesrezeptoraktivierung und spiegelte sich auch in der nur spärlichen Spaltung von von Effektorcaspasen und deren Substrat PARP-1 wider.

Zusammengenommen weisen die Daten aus Oberflächenexpression der Rezeptoren, Signalkomplexformation, "lipid raft"-Assoziation und Caspaseprozessierung auf eine *PIK3CA*-mut vermittelte Blockade der Todesrezeptor-induzierten Apoptose auf Ebene der Freisetzung proapoptotischer mitochondrialer Faktoren hin. Wesentliche Voraussetzung für die Freisetzung dieser Faktoren ist die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Den proapoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern Bax und Bak wird hierbei eine entscheidende Rolle zugeschrieben (Chipuk und Green, 2008). Durch Insertion und Ausbildung eines Kanals zwischen Zytosol und Intercristaeraum der Mitochondrien erlaubt der Bax/Bak-Komplex den Austritt proapoptotischer mitochondrialer Faktoren. In Übereinstimmung mit der Annahme, dass die durch *PIK3CA*-mut vermittelte Apoptoseresistenz auf der Inhibition der Freisetzung proapoptotischer mitochondrialer Faktoren beruht, wurde für die HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen eine deutlich reduzierte Expression von Bax beschrieben (Guo et al., 2007). Daher wurde als nächstes geprüft, ob das alleinige Fehlen von Bax-Expression HCT116 Zellen gegenüber FasL- und TRAIL-induzierter Apoptose protektieren kann. Hierfür wurden "parentale" HCT116 Zellen sowie eine daraus hergestellte isogene Bax-defiziente Linie verwendet (Zhang et al., 2000) und vergleichend analysiert (Abbildung 13).

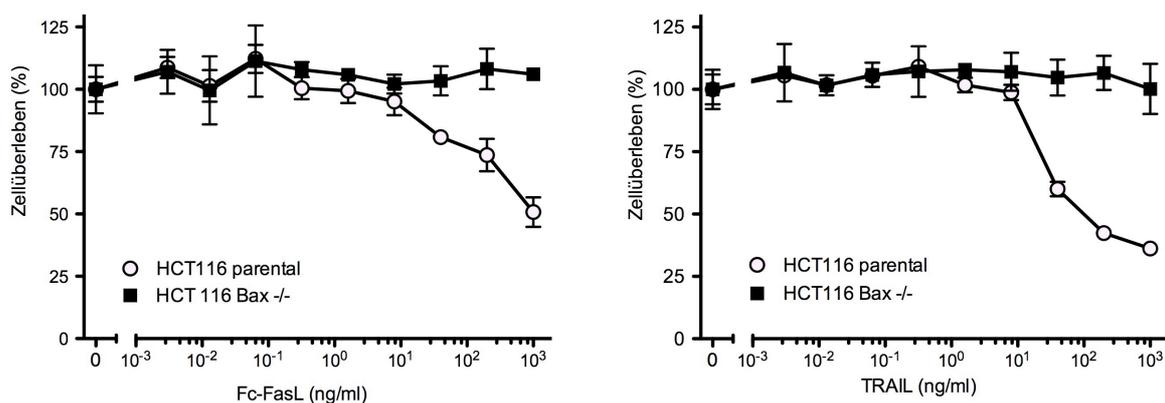


Abbildung 13: Toxizität von FasL und TRAIL auf parentale und Bax-defiziente HCT116 Zellen

Parentale HCT116 und HCT116 Bax^{-/-} Zellen wurden in 96-Well Platten ausgesät (2×10^4 Zellen pro Well) und am nächsten Tag mit den angegebenen Konzentrationen an Fc-FasL oder TRAIL stimuliert (Dreifachwerte). Die Zellvitalität wurde am nächsten Tag mittels MTT-Färbung ermittelt.

Beide Zelllinien sind im Bezug auf den *PIK3CA*-Locus mit einem Wildtyp und einem mutierten Allel heterozygot. Obgleich die parentalen HCT116 Zellen eine etwas niedrigere Sensitivität gegenüber FasL und TRAIL als die HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen

aufwiesen, waren sie dennoch signifikant sensitiver als die nahezu vollständig protektierten HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen. Die isogene Bax-defiziente Variante (Zhang et al., 2000) hingegen war ähnlich den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen weitestgehend resistent gegenüber FasL- und TRAIL-Behandlung. In Western Blot Analysen zeigte sich bei den Bax-defizienten Zellen nach Stimulation mit FasL oder TRAIL eine vergleichbare Blockade der Effektorcaspase Aktivierung wie zuvor in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen (Abbildung 14). Die Formation eines funktionellen Rezeptorsignalkomplexes war wiederum möglich, was sich in der Todesrezeptor-vermittelten Aktivierung von Caspase-8 in parentalen sowie Bax-defizienten HCT116 Zellen zeigte. Die Caspase-3 Prozessierung stoppte in der Bax-defizienten HCT116 Variante, vergleichbar mit den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen, auf Ebene des IAP-inhibierbaren p19-Fragments. Bei den parentalen HCT116 Zellen kam es hingegen zur vollständigen Caspase-3 Prozessierung, erkennbar an der Akkumulation des p17-Fragments. Das Fehlen proapoptotischer mitochondrialer Faktoren zeigte sich auch in der Prozessierung der Caspase-9. Diese erfolgte in der HCT116 Parentalzelllinie ähnlich gut wie in den HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen, während bei den Bax-defizienten HCT116 Zellen Caspase-9 nur in sehr geringem Maße prozessiert wurde.

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen die wichtige Rolle des proapoptotischen Proteins Bax für die Todesrezeptor-induzierte Apoptose in HCT116 Zellen. Genetische Bax-Defizienz der HCT116 Bax^{-/-} Zellen oder verminderte Bax-Expression in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen schützten vor FasL- und TRAIL-induzierter Apoptose downstream der DISC-Bildung durch Inhibition des Crosstalks des extrinsichen und intrinsichen Wegs der Apoptoseinduktion.

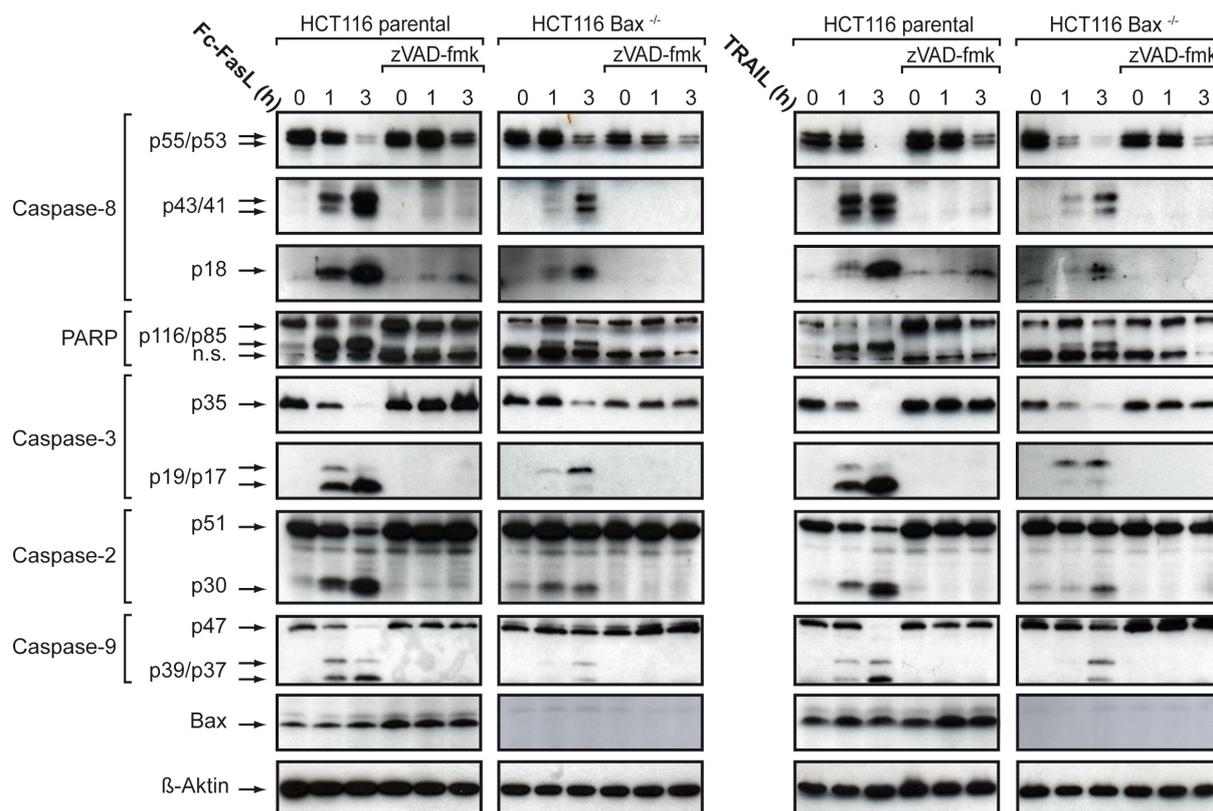


Abbildung 14: Caspaseprozessierung und Spaltung von Caspasesubstraten in HCT116 parental und HCT116 Bax^{-/-} Zellen

HCT116 parental und HCT116 Bax^{-/-} Zellen wurden mit Fc-FasL (200 ng/ml) oder TRAIL (50 ng/ml) für 1 h oder 3 h stimuliert und anschließend lysiert. Die angegebenen Proteine wurden mittels Western Blot untersucht.

Somit konnte die verminderte Bax-Expression in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen als Resistenzmechanismus gegenüber FasL- und TRAIL-induzierter Apoptose identifiziert werden. Wodurch der erniedrigte Spiegel von Bax in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen allerdings herrührt, ob von reduzierter Synthese des Proteins oder verstärkter proteasomaler Degradation, war weiter unklar. Eine Rolle des Proteasoms in der Regulation von Mitgliedern der Bcl-2-Familie konnte bereits gezeigt werden (Fennell et al., 2008). Auch die verstärkte proteasomale Degradation von Bax wurde in apoptoseresistenten Tumorzellen nachgewiesen (Liu et al., 2008). Weiterhin konnte die Resistenz gegenüber TRAIL in mehreren Tumorzelllinien mit dem Proteasomeninhibitor Bortezomib überwunden werden (Russo et al., 2007). Um eine Beteiligung des Proteasoms an der Resistenz gegenüber Todesrezeptor-induzierter Apoptose in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen zu prüfen, wurde das Ansprechen dieser Zellen auf TRAIL in Anwesenheit von Bortezomib im Vitalitätsassay untersucht (Abbildung 15). Durch die Vorbehandlung mit diesem Proteasomeninhibitor kam es zu einer deutlichen Sensitivierung der Zellen gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose.

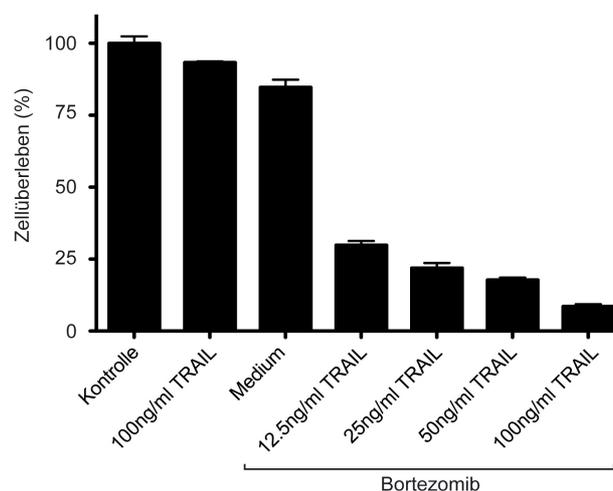


Abbildung 15: Bortezomib sensitiviert HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen für TRAIL-induzierte Apoptose

HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden in 96-Well Platten ausgesät (2×10^4 Zellen pro Well), am nächsten Tag die angegebenen Gruppen mit 15 nM Bortezomib 5 h vorbehandelt. Die Stimulation erfolgte über Nacht mit den angegebenen Konzentrationen von TRAIL (Dreifachwerte), die Zellvitalität wurde am nächsten Tag mittels MTT-Färbung ermittelt.

Die durch Bortezomib vermittelte Sensitivierung der HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurde auch auf Ebene der Caspaseaktivierung deutlich (Abbildung 16). Nach FasL- oder TRAIL-Stimulation kam es in Anwesenheit von Bortezomib nicht nur zur Aktivierung der Caspase-8, sondern auch zu einer Prozessierung der Procaspase-3 zum aktiven p17-Fragment, sowie zur Spaltung des Caspase-3 Substrats PARP-1. Beides war in Abwesenheit des Proteasomeninhibitors nicht oder nur in sehr geringem Umfang nachweisbar.

In der Literatur sind für die Resensitivierung von Tumorzellen durch Bortezomib eine Vielzahl von Mechanismen beschrieben. Darunter finden sich auch Berichte über eine blockierte proteasomale Degradation und damit einhergehender Akkumulation von Bax (Liu et al., 2008), was in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen mit ihrer massiv reduzierten Expression dieses Proteins ein interessanter Ansatzpunkt ist. Daher wurde nach FasL- oder TRAIL-Stimulation in Anwesenheit von Bortezomib neben der Caspaseprozessierung auch die Veränderung der Bax Menge untersucht (Abbildung 16). Eine Akkumulation des proapoptotischen Proteins Bax nach Inhibition des Proteasoms konnte jedoch als Ursache für die Resensitivierung der HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen ausgeschlossen werden, da sich Bax im Gegensatz zu den HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen weder in Bortezomib-behandelten noch in unbehandelten HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen nachweisen ließ.

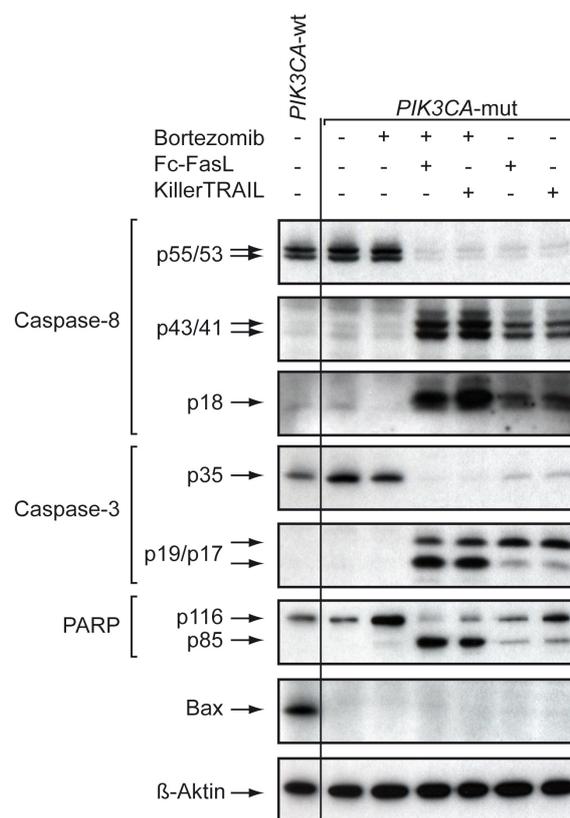


Abbildung 16: TRAIL und FasL induzieren Effektorcaspaseaktivität in Bortezomib-behandelten HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen unabhängig von Bax

HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden mit 200 ng/ml Fc-FasL oder 50 ng/ml TRAIL über Nacht stimuliert. Die Zugabe von Bortezomib (15 nM) erfolgte 5 h vor Stimulationsbeginn. Anschließend wurden die Zellen geerntet, lysiert und die angegebenen Proteine im Western Blot analysiert.

Dieser Befund war zunächst unerwartet, da die Resistenz der HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen sowohl in dieser Arbeit als auch in vorhergehenden Studien auf die verminderte Expression von Bax zurückgeführt werden konnte (Guo et al., 2007). Die Resensitivierung der Zellen gegenüber FasL- oder TRAIL-induzierter Apoptose durch Bortezomib war jedoch trotz weiterhin verminderter Bax-Expression möglich. Zusammenfassend weisen diese Daten auf eine Bax-unabhängige Mitbeteiligung des Proteasoms an der Resistenzbildung gegenüber Todesrezeptor-induzierter Apoptose in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen hin.

Neben der Verminderung von Bax auf Proteinebene kann die konstitutive PI3K/Akt-Aktivität in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen jedoch über den pleiotropen Akt-Signalweg eine Vielzahl weiterer Zellfunktionen beeinflussen. Um neben den Unterschieden bezüglich der Apoptoresistenz gegenüber FasL und TRAIL auch Hinweise auf Differenzen bezüglich der Genexpression der HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen zu erhalten, wurde in Kooperation mit Oliver Dittrich-Breiholz eine genomweite Analyse der Genexpression für beide Zelltypen durchgeführt.

Statistisch signifikant erhöhte mRNA Transkripte in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden mit dem Programm "Gene Ontology Tree Machine" (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/gotm>) zu funktionellen Gruppen zusammengefasst und die gemessene Genaktivität mit der berechneten zu erwartenden Aktivität verglichen. Es zeigte sich so in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen eine signifikante Erhöhung der Genaktivität in den funktionellen Gruppen Zellmobilität, Zellmigration, Zellproliferation, Angiogenese, Chemotaxis und PI3K Regulation (Abbildung 17).

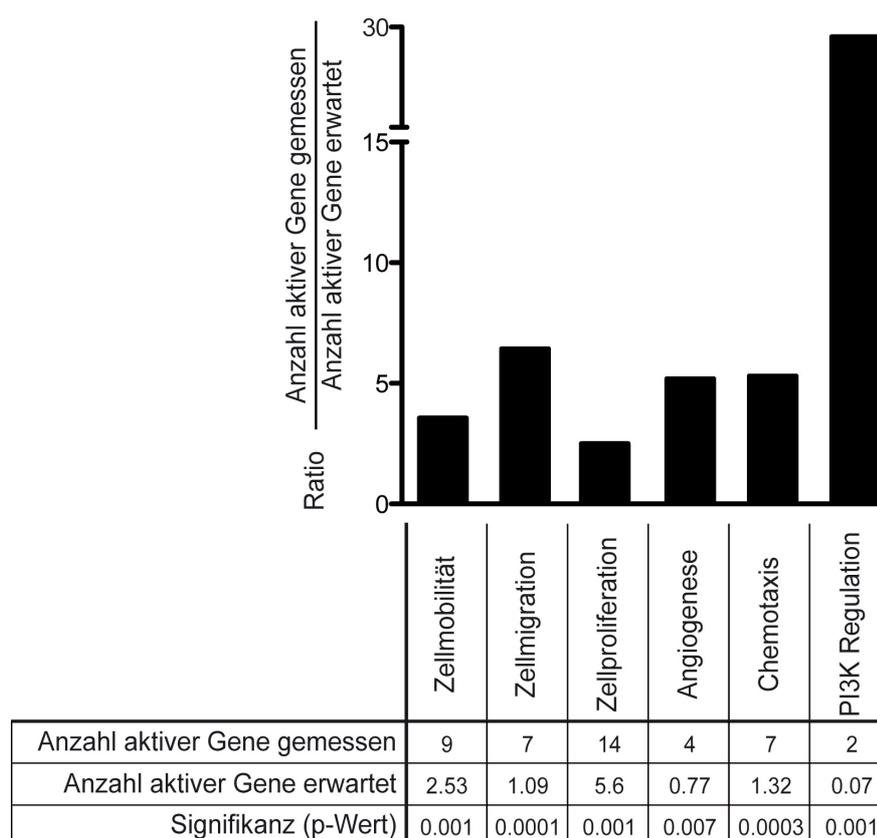


Abbildung 17: Expressionsanalyse verschiedener Gengruppen in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen

Mit einem Affymetrix GeneChip® wurde aus RNA-Isolaten der HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen die Genexpression genomweit analysiert. Die in den HCT116 *PIK3CA*-mut im Vergleich zu den HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen verstärkt exprimierten Gene wurden mit dem Web-basierten Programm "GOTree Machine" (University of Tennessee-Oak Ridge National Laboratory) analysiert. Das Programm ordnet die hochregulierten Gene einzelnen, nach biologischer Funktion zusammengestellten Gengruppen zu, vergleicht die gemessene Aktivität in diesen Gengruppen mit einem GeneChip spezifischen Referenzsatz und berechnet im Falle einer erhöhten Aktivität deren Signifikanz.

Die einzelnen, in den funktionellen Gruppen verstärkt exprimierten Proteine sind im Anhang unter 9.1 aufgeschlüsselt. Weiterhin finden sich dort unter 9.2 und 9.3 Tabellen mit allen hochregulierten Genen der HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen.

Auch die durch FasL- und TRAIL-induzierte Genexpression der HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurde genomweit analysiert. Eine Tabelle mit den hochregulierten Genen findet sich im Anhang unter Punkt 9.4. Die technische Durchführung der Arrays und die Filterung der Ergebnisse wurden von Dr. Oliver Dittrich-Breiholz, Medizinische Hochschule Hannover, übernommen.

Zusammengefasst zeigten die bisherigen Ergebnisse in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen eine trotz Apoptoseresistenz stattfindende DISC-Bildung und Aktivierung der Initiatorcaspase Caspase-8, während die Aktivierung von Effektorcaspasen und Initiatorcaspasen, die initial nicht durch Todesrezeptoren genutzt werden, unterblieb. Die verminderte Bax-Expression konnte als Resistenzmechanismus gegenüber FasL- und TRAIL-induzierter Apoptose identifiziert werden. Durch Inhibition des Proteasoms kam es zur Resensitivierung der HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen gegenüber Todesrezeptor-induzierter Apoptose, unabhängig von der Menge an Bax, sodass der genaue Mechanismus der Resensitivierung unklar blieb. Neben Apoptoseresistenz zeichnen sich die HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen auch durch verstärkte Aktivität verschiedener funktioneller Gengruppen, welche u.a. Zellmigration, Zellproliferation und Angiogenese regulieren, aus.

4.2 TRAIL und FasL wirken proinflammatorisch in HCT116 *PIK3CA*-mut protektierten Zellen

In apoptoseresistenten Zellen kommen nach Todesrezeptorstimulation teils antiapoptotisch oder proinflammatorisch wirkende Signalwege zum Tragen (Wajant, 2006), welche in apoptosesensiblen Zellen oftmals durch den ablaufenden Zelltod maskiert werden. Daher wurden neben der Induktion von Apoptose auch weitere von FasL und TRAIL aktivierte Signalwege in den HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen untersucht.

In beiden Zelltypen kam es nach Stimulation zu Aktivierung des JNK-, p38- und ERK-Signalweges, gemessen an der Zunahme der phosphorylierten Formen dieser Proteine (Abbildung 18). Interessant war die unterschiedliche Aktivierung des proinflammatorischen NF κ B-Signalweges in den HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen. TRAIL und FasL induzierten in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges, was sich deutlich an einer zunehmenden Phosphorylierung von I κ B α (inhibitor of NF κ B α) und der damit einhergehenden Abnahme von I κ B α 1 h und 4 h nach Stimulationsbeginn zeigte. In HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen hingegen war keine I κ B α -Phosphorylierung detektierbar. Dabei handelte es sich nicht um eine generelle Einschränkung der Aktivierbarkeit des NF κ B-Signalweges in diesen Zellen, da nach Inhibition der Caspaseaktivität die I κ B α -Phosphorylierung nach FasL-/TRAIL-Stimulation sogar noch stärker ausfiel als in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen. Der Grund hierfür liegt in der durch Caspase-8 und Effektorcaspasen vermittelten Spaltung wichtiger Proteine des NF κ B-Weges, wie RIP, IKK2 und weiterer Intermediate (Wajant et al., 2003). Weiterhin wurden auch Stimulationen mit dem hauptsächlich proinflammatorisch wirkenden Liganden TNF durchgeführt, was sowohl in den HCT116 *PIK3CA*-wt als auch in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen eine vergleichbare Aktivierung von NF κ B auf Ebene der I κ B α -Phosphorylierung zeigte.

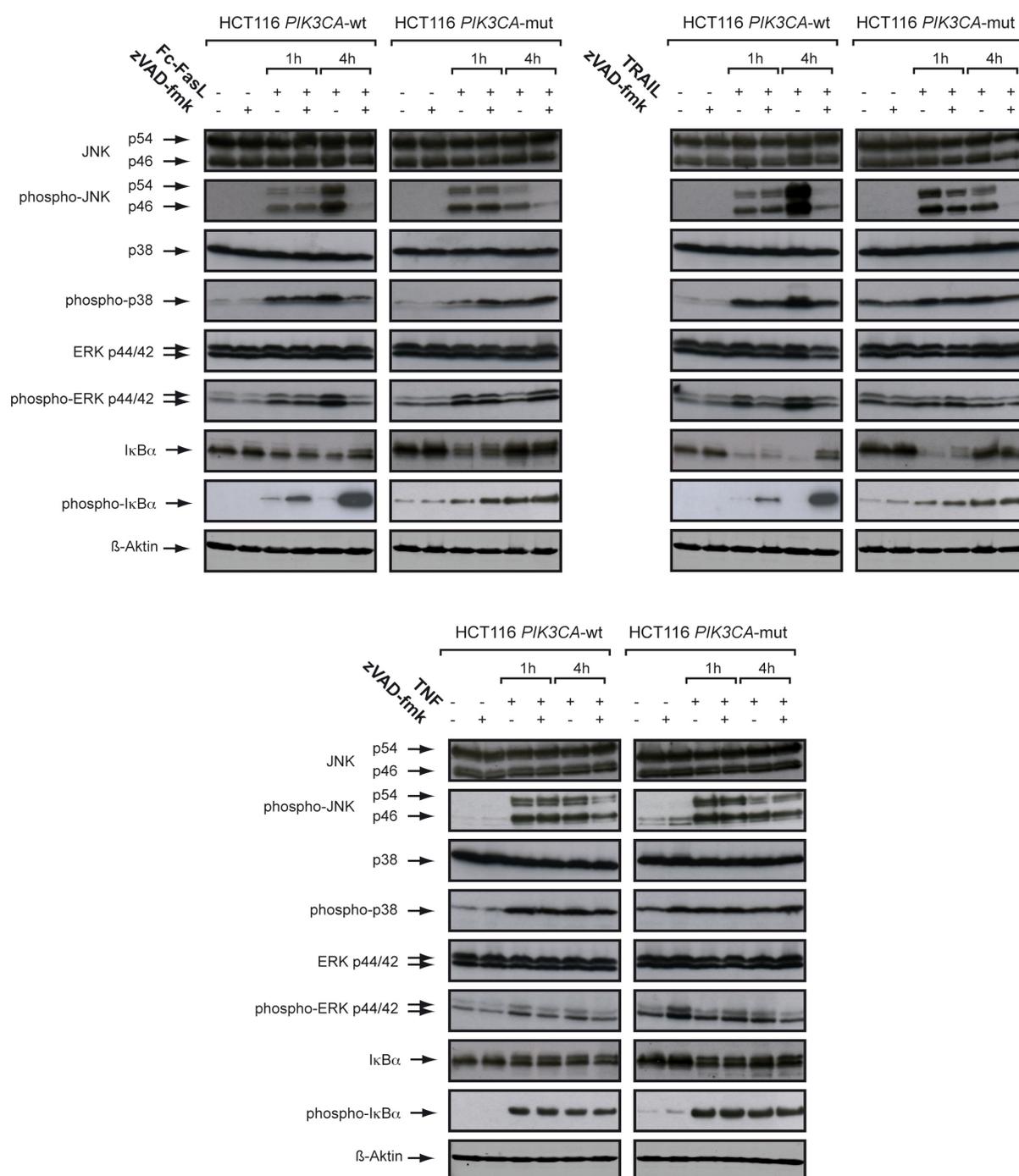


Abbildung 18: Proinflammatorischer Effekt von TRAIL und FasL in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen

HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden für 1 h oder 4 h mit Fc-FasL (200 ng/ml), TRAIL (50 ng/ml) oder TNF (50 ng/ml) in An- oder Abwesenheit von 100 μ M zVAD-fmk (1 h Vorinkubation) stimuliert, anschließend lysiert und die angegebenen Proteine mittels Western Blot detektiert.

Die Aktivierung des NF κ B-Weges durch FasL spiegelte sich auch in der erhöhten Produktion des NF κ B-regulierten Chemokins IL8 wider (Abbildung 19). Sie ist in HCT116 *PIK3CA*-mut und HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen detektierbar, in letzteren jedoch nur bei Protektion gegenüber Apoptose mit dem Caspaseinhibitor zVAD-fmk.

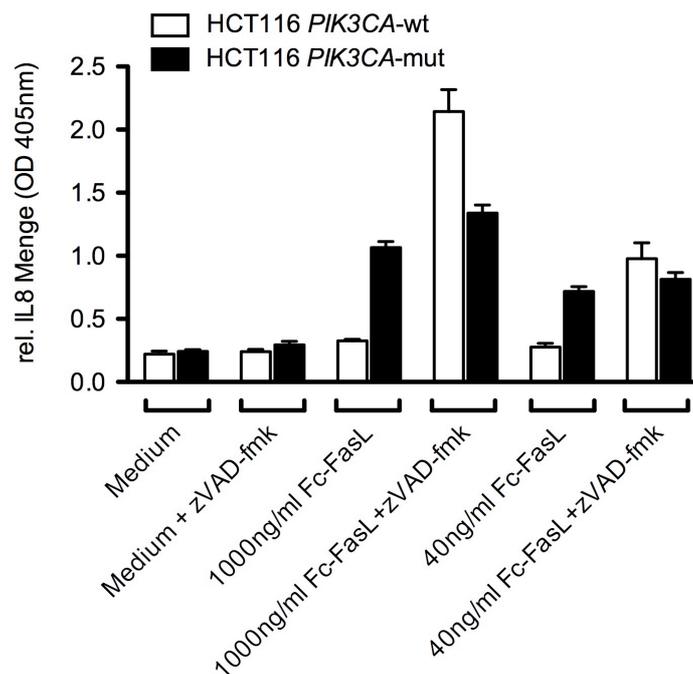


Abbildung 19: FasL vermittelt IL8-Induktion in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen

HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen Fc-FasL (Dreifachwerte) in An- oder Abwesenheit von zVAD-fmk (100 μ M, 1 h Vorinkubation) stimuliert. Um den Einfluss konstitutiver, endogener IL8-Produktion zu minimieren, wurde vor Stimulationsbeginn das Medium gewechselt. Die relative IL8-Menge im Überstand wurde mittels ELISA bestimmt.

Da kürzlich eine Rolle von Fas für die Phosphorylierung und damit Aktivierung von Akt gezeigt werden konnte (Kleber et al., 2008), wurde dies auch im verwendeten Zellsystem untersucht (Abbildung 20). In HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen war weder konstitutive noch induzierbare Akt-Phosphorylierung nachweisbar, jedoch nahm die Akt-Menge 2-4 h nach Stimulation mit FasL langsam ab. Dies geht höchstwahrscheinlich auf die bekannte Spaltung von Akt durch Caspasen zurück (Bachelder et al., 2001; Widmann et al., 1998b), da die Zugabe des Caspaseinhibitor zVAD-fmk diese Abnahme verhindert. In den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen war phospho-Akt konstitutiv vorhanden, 15 min nach Stimulation mit FasL kam es zu einer transienten Zunahme mit anschließender gradueller Akkumulation von 1 h bis 4 h. Bemerkenswerterweise war die initiale Zunahme von phospho-Akt nach FasL-Stimulation durch Zugabe von zVAD-fmk unbeeinflusst, während das erneute langsame Ansteigen nur unter Caspaseinhibition zu beobachten war.

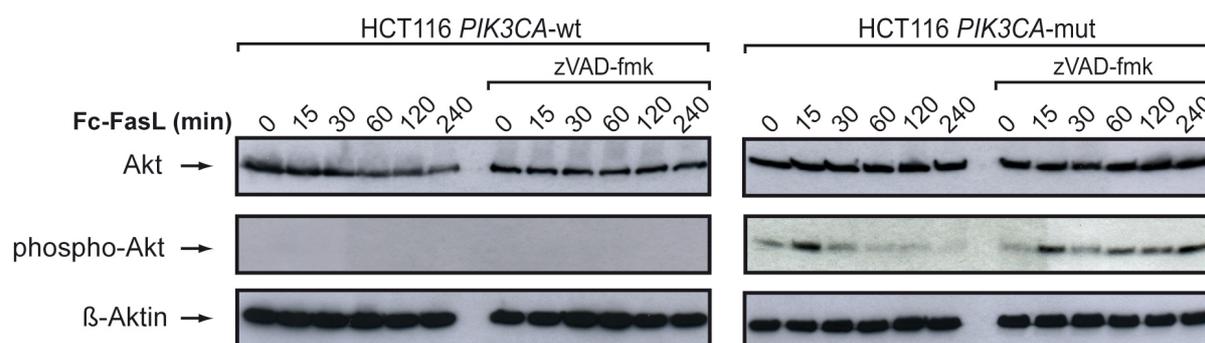


Abbildung 20: Aktivierung des Akt-Signalweges in HCT116 *PIK3CA*-wt und *PIK3CA*-mut Zellen

HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden mit 200 ng/ml Fc-FasL für die angegebenen Zeitspannen behandelt. Die Detektion von Akt und phospho-Akt erfolgte im Western Blot.

Der Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ und PI3K/Akt wird auch eine wichtige Rolle beim Umbau der extrazellulären Matrix im Rahmen der Metastasierung von Tumorzellen zugeschrieben (Agarwal et al., 2005). Um zu untersuchen, ob auch in *PIK3CA*-mut Zellen die Aktivierung der beiden Signalwege metastasierungsfördernd wirken kann, wurde die Produktion des Enzyms uPA (Urokinase Plasminogen Aktivator) im Zellüberstand nach FasL- oder TRAIL-Stimulation bestimmt (Abbildung 21). Es zeigte sich eine Todesliganden-induzierte Erhöhung der uPA-Produktion. Die uPA-Messung im ELISA wurde von PD Dr. Anna Trauzold, Universität Kiel, durchgeführt.

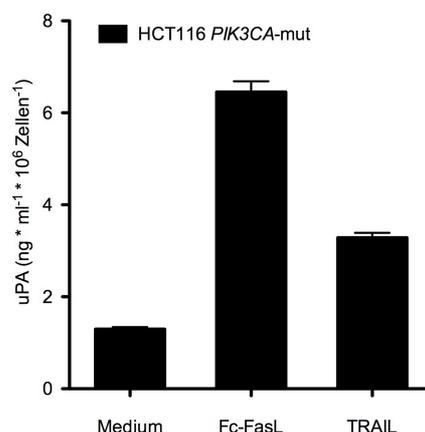


Abbildung 21: HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen produzieren uPA nach FasL- und TRAIL-Stimulation

Die Zellen wurden pro Gruppe 18 h mit 200 ng/ml Fc-FasL oder 50 ng/ml TRAIL stimuliert (Dreifachwerte), anschließend wurde die uPA-Menge im Überstand mittels ELISA bestimmt.

Zusammengenommen zeigten diese Experimente, dass in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen neben dem konstitutiv aktiven PI3K/Akt-Signalweg durch Stimulation von Fas oder der TRAIL-Todesrezeptoren der proinflammatorische $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweg und die Produktion des metastasierungsfördernden Enzyms uPA in Gang gesetzt wird.

4.3 FasL und TRAIL induzieren amöboide Zellmorphologie in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen

Die unterschiedliche Sensitivität der HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT *PIK3CA*-mut Zellen gegenüber dem Todesrezeptor-induziertem Zelltod zeigte sich auch morphologisch im Durchlichtmikroskop. Während HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen nach Stimulation mit FasL oder TRAIL eine für die ablaufende Apoptose typische Morphologie zeigten (Abbildung 22), kam es interessanterweise auch bei *PIK3CA*-mut Zellen ligandeninduziert zu Änderungen in der Zellmorphologie: die Zellen rundeten sich ab und nahmen eine amöboide Form an.

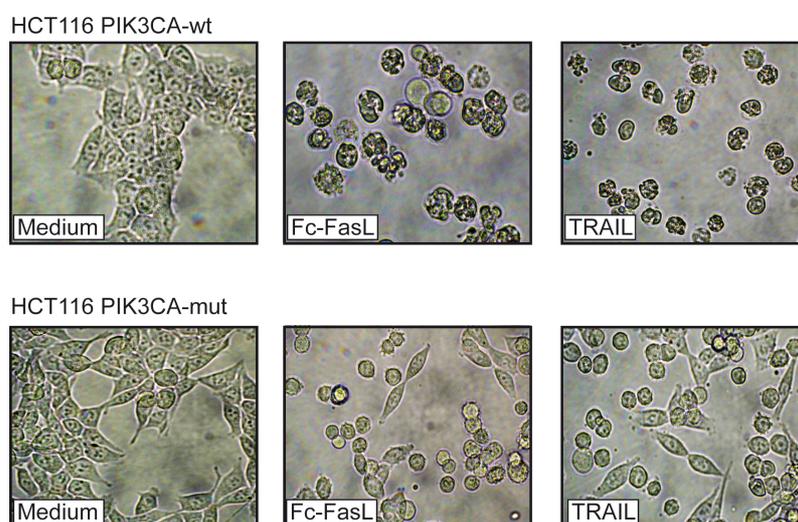


Abbildung 22: TRAIL und FasL induzieren eine amöboide Zellmorphologie in *PIK3CA*-mut protektierten HCT116 Zellen

HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden in 6-well Platten ausgesät (5×10^5 pro Gruppe) und am nächsten Tag mit 200 ng/ml Fc-FasL oder 50 ng/ml KillerTRAIL über Nacht behandelt. Anschließend wurde die Abrundung der Zellen mikroskopisch dokumentiert. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Vergrößerung 400x.

Diese Morphologie der HCT116 *PIK3CA*-mut protektierten Zellen hat Ähnlichkeiten mit einer weiteren Form der Zelltods, der Nekrose. Nekrose ist durch Abrundung der Zellen und Anschwellen des Zellvolumens gekennzeichnet (Broker et al., 2005). Somit galt es zunächst auszuschließen, dass die ligandeninduzierte Änderung der Zellmorphologie lediglich auf den Zelltod durch Nekrose zurückzuführen ist. Gegen diese Annahme sprachen die Ergebnisse der Vitalitätsassays mit den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen (Abbildung 6 und Abbildung 7), die eindeutig eine Protektion gegenüber FasL- und TRAIL-induziertem Zelltod zeigten. Weiterhin konnte die ligandeninduzierte Änderung der Zellmorphologie auch durch Einsatz von

Necrostatin, einem pharmakologischen Inhibitor der RIP-abhängigen Nekrose (Degterev et al., 2008) nicht blockiert werden (Abbildung 23).

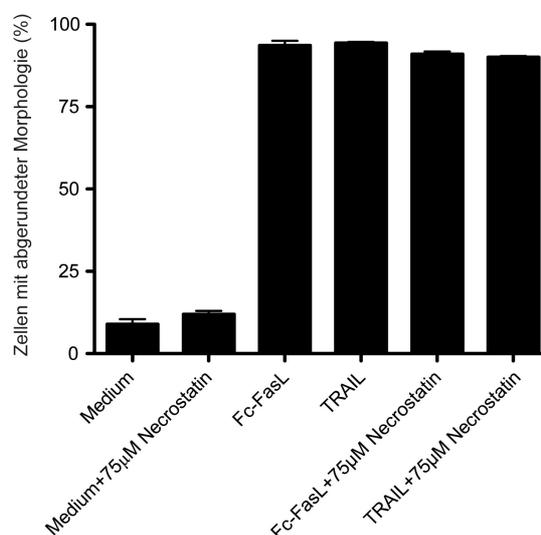


Abbildung 23: Amöboide Zellmorphologie der HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen ist nicht durch Nekrose bedingt.

HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden in 6-well Platten ausgesät (5×10^5 pro Gruppe) und, falls angegeben, mit 75 μM Necrostatin über Nacht vorbehandelt. Am nächsten Tag erfolgte die Stimulation mit 200 ng/ml Fc-FasL oder 50 ng/ml TRAIL für 4 h, die Zellen mit abgerundeter Morphologie wurden mikroskopisch ausgezählt. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

So konnte durch die Ergebnisse der Vitalitätsassays und dem Einsatz des pharmakologischen Inhibitors Necrostatin Nekrose als Grund für die beobachtete Todesliganden-induzierte Änderung der Zellmorphologie in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen ausgeschlossen werden.

Da Änderungen der Zellmorphologie eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts erfordern (Papakonstanti und Stournaras, 2008), wurden die Veränderungen im filamentösen Aktinzytoskelett (F-Aktin) nach Stimulation mit FasL in den HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen mit konfokaler Lasermikroskopie untersucht (Abbildung 24). Während bei HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen nach Zugabe von FasL aufgrund der zerstörten Aktinfilamente nur noch eine diffuse Färbung zu detektieren war, blieben die F-Aktin Strukturen bei den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen erhalten. Die Abrundung der HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen nach FasL-Zugabe spiegelte sich in der F-Aktin Färbung durch eine ringförmige Anordnung der Filamente wider.

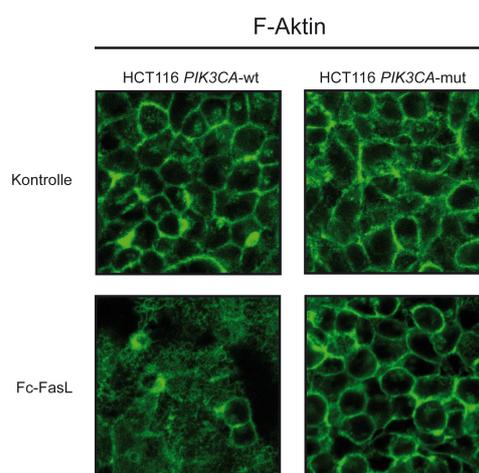


Abbildung 24: Ligandeninduzierte Reorganisation des Aktinzytoskeletts in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen

HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät (4×10^4 Zellen pro Gruppe) und mit 200 ng/mL Fc-FasL für 4 h stimuliert. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und das filamentöse Aktinzytoskelett mit AlexaFluor®488-markiertem Phalloidin dargestellt. Die Färbung und Aufnahmen wurden von Volker Spindler, Lehrstuhl für Anatomie III, Universität Würzburg, durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Damit kam es in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen Todesliganden-induziert über eine Reorganisation des F-Aktinzytoskeletts zu Änderungen in der Zellmorphologie, während die HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen im Zuge des ablaufenden Zelltods eine Destruktion des Aktinzytoskeletts aufwiesen. Liganden-induzierte Effekte in Zellsystemen lassen sich generell durch zwei Charakteristika näher beschreiben. Erstens, die Abhängigkeit des beobachteten Effekts von der Konzentration des Liganden bzw. der Überschreitung eines Schwellenwerts und zweitens, die Dauer von der Ligandenzugabe bis zur Beobachtbarkeit des Effekts. Daher wurde die Veränderung der Zellmorphologie nach FasL- oder TRAIL-Stimulation in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen auch anhand dieser Kriterien näher charakterisiert (Abbildung 25). Dabei ergab sich eine Abhängigkeit von der eingesetzten Ligandenkonzentration und der Stimulationsdauer. Die Konzentrationsreihe zeigte, dass die eingesetzten Konzentrationen der Liganden (200 ng/ml FasL oder 50 ng/ml TRAIL) ausreichten, um einen maximalen Effekt zu erzielen. Dieser wurde bereits 4 h nach Beginn der Stimulation erreicht, interessanterweise nahm der Anteil an Zellen mit amöboider Morphologie nach 24 h wieder ab.

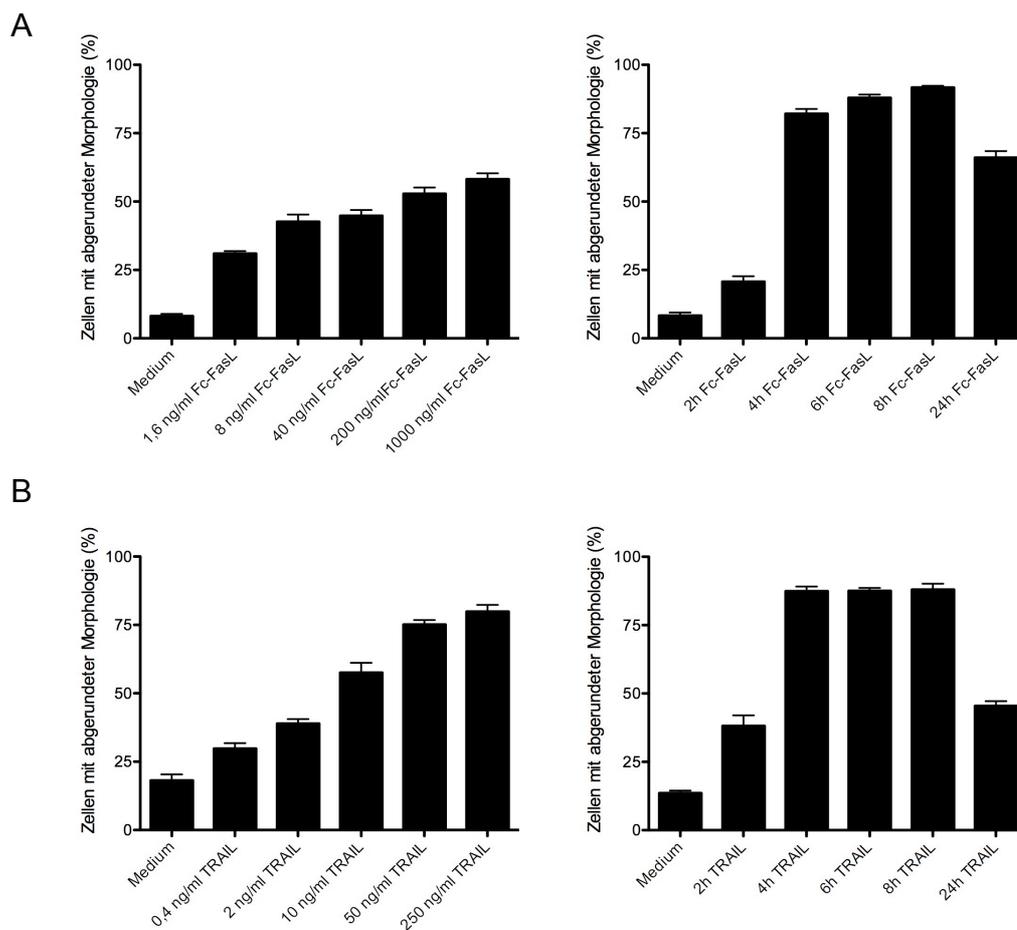


Abbildung 25: Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der FasL- und TRAIL-induzierten Morphologieänderung

HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden in 6-well Platten (5×10^5 pro Well) ausgesät und am nächsten Tag mit Fc-FasL (A) oder TRAIL (B) stimuliert. Die Stimulation der Konzentrationsreihen erfolgte mit den angegebenen Ligandenkonzentrationen über Nacht. Für die Stimulation der Zeitreihen wurden zu den angegebenen Zeiten 200 ng/ml Fc-FasL bzw. 50 ng/ml TRAIL eingesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die FasL- oder TRAIL-induzierte Änderung der Zellmorphologie transient ist, was anhand einer längeren Zeitreihe genauer untersucht (Abbildung 26) wurde. So zeigte sich 12 h nach FasL- oder TRAIL-Stimulation in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen deutlich die Abrundung der Zellen, während sich nach 48 h die amöboide Morphologie fast vollständig wieder zurückgebildet hatte.

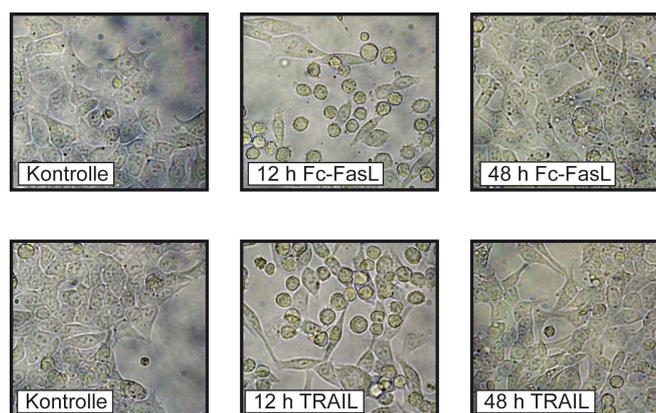


Abbildung 26: FasL und TRAIL induzieren transiente Änderungen der Zellmorphologie in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen

HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden in 6-well Platten ausgesät (5×10^5 pro Gruppe), für die angegebenen Zeitspannen mit 200 ng/ml Fc-FasL oder 50 ng/ml TRAIL stimuliert und mikroskopisch dokumentiert. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten. Vergrößerung 400x.

Der transiente Charakter der Änderung der Zellmorphologie kann durch Inaktivierung des Liganden oder durch zellintrinsische Mechanismen begründet sein. Um zu überprüfen, ob die Rückbildung der amöboiden Morphologie lediglich auf einen Aktivitätsverlust des zugegebenen Liganden mit steigender Inkubationsdauer beruht, wurden in einem Langzeitexperiment HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen für insgesamt 7 Tage in ständiger Anwesenheit von 50 ng/ml TRAIL kultiviert (Abbildung 27). Um zu verhindern, dass die Bioaktivität des Liganden im Laufe der Zeit abnimmt, wurde alle 24 h 50 ng/ml TRAIL frisch hinzugegeben. Es zeigte sich, dass sich bereits 3 h nach Stimulationsbeginn die Morphologie der Zellen von spindelförmig-ausgestreckt zu abgerundet-amöboid gewandelt hatte. Der Anteil der Zellen mit abgerundeter Morphologie nahm jedoch über die folgenden Tage stetig ab, trotz täglicher Zugabe von "frischem" TRAIL. Weiterhin überlebten die HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen diese Behandlung nicht nur, sondern proliferierten auch, sodass die Zellen an Tag 7 nahezu konfluent waren. Die initial beobachtete, TRAIL-induzierte Änderung der Zellmorphologie trat trotz wiederholter Zugabe des Liganden nicht mehr auf.

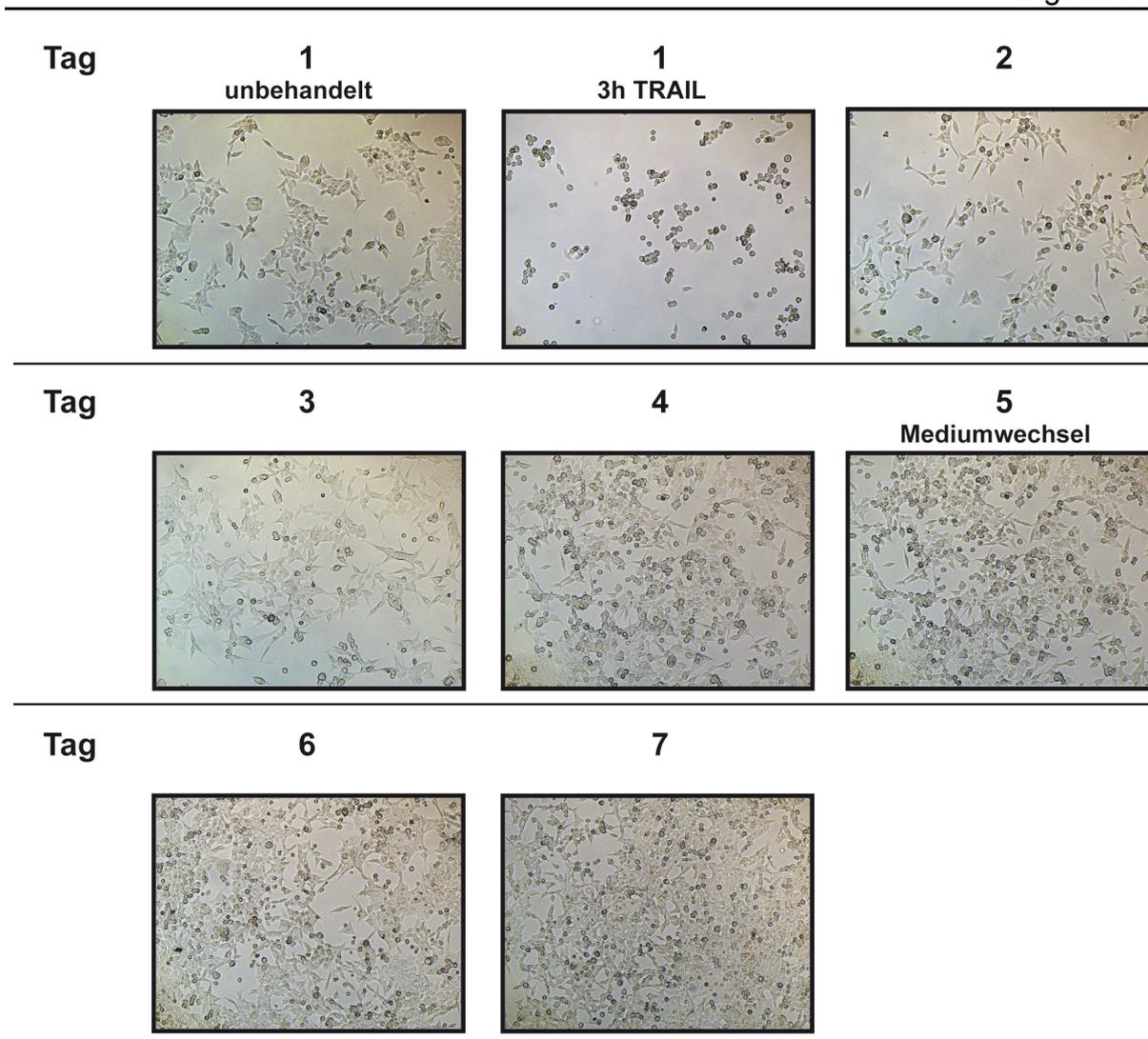


Abbildung 27: Langzeitinkubation der *PIK3CA*-mut protektierten HCT116 Zellen mit TRAIL

HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden in eine 10 cm Zellkulturschale ausgesät (1×10^6 Zellen) und am nächsten Tag mit 50 ng/ml TRAIL behandelt. Im weiteren Verlauf wurde über 7 Tage jeden Tag erneut 50 ng/ml TRAIL zugegeben und zum angegebenen Zeitpunkt das Medium gewechselt. Die Zellen wurden täglich unter dem Mikroskop fotografiert. Gezeigt sind repräsentative Bildausschnitte. Vergrößerung 100x.

Somit war der Grund für die transiente Morphologieänderung auf Seiten der HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen zu suchen. Eine Möglichkeit für die Rückbildung der abgerundeten, amöboiden Morphologie trotz Vorhandensein von bioaktiven Liganden könnte in der herabgesetzten Sensibilität der Zellen für den Liganden liegen, beispielsweise durch Verminderung der Oberflächenexpression von Fas oder der TRAIL-Todesrezeptoren. Um dies auszuschließen, wurden HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen zunächst 12 h mit FasL oder TRAIL stimuliert, was in beiden Fällen zu einer deutlichen Veränderung der Zellmorphologie von spindelförmig-länglich hin zu abgerundet-amöboid führte (Abbildung 28). Wurde anschließend keine weitere Stimulation durchgeführt und der Anteil an Zellen mit abgerundeter Morphologie nach 24 h erneut ausgezählt, war eine eindeutige Rückbildung der Veränderung zu

erkennen. Auch durch eine erneute Stimulation nach den ersten 12 h konnte die Änderung der Zellmorphologie nicht bis zum Endpunkt 24 h aufrecht erhalten werden. Dabei war es unerheblich, ob bei den zwei Stimulationen der gleiche Ligand zum Einsatz kam, oder der Ligand bei der zweiten Stimulation gewechselt wurde (beispielsweise von FasL auf TRAIL).

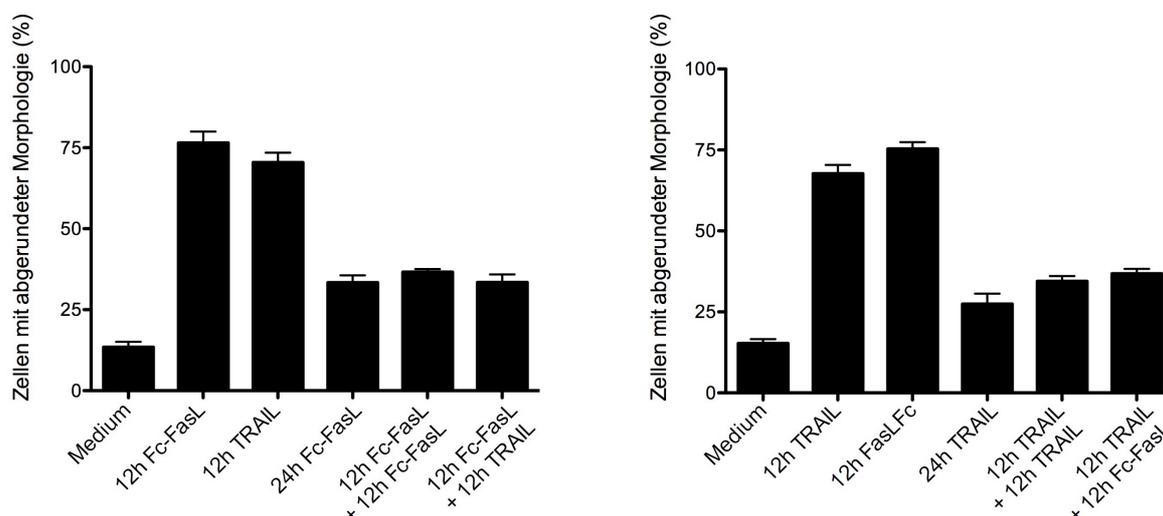


Abbildung 28: Die FasL-/TRAIL-induzierte Morphologieänderung der HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen ist transient

HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen (5×10^5 pro Gruppe) wurden in 6-Well Platten ausgesät und am nächsten Tag mit 200 ng/ml Fc-FasL oder 50 ng/ml TRAIL für 12 h behandelt. Anschließend wurden die Gruppen mikroskopiert, bzw. bei den angegebenen Gruppen erneut Fc-FasL oder TRAIL für weitere 12 h zugegeben. Die abgerundeten Zellen wurden mikroskopisch ausgezählt. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

Dieser Befund spricht gegen eine verminderte Oberflächenexpression von Fas oder TRAILR1/R2 oder andere receptorspezifische Desensitivierungsmechanismen

Zusammenfassend konnte so gezeigt werden, dass die durch FasL- oder TRAIL-induzierte Änderung der Zellmorphologie in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen nicht auf nekrotischen Zelltod zurückzuführen ist, sondern durch Reorganisation des Aktinzytoskeletts zustande kommt. Die Morphologieänderung war von der Konzentration des eingesetzten Liganden abhängig und trat transient auf, wobei ein Aktivitätsverlust des Liganden sowie receptorspezifische Desensitivierungsmechanismen als Ursache ausgeschlossen werden konnten.

4.4 FasL- und TRAIL-induzierte Änderungen der Morphologie von HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen sind Caspase-8 vermittelt

Die bisherigen Ergebnisse zeigten eine von Fas oder den TRAIL-Todesrezeptoren ausgehende, nicht-apoptotische Signaltransduktion. In verschiedenen Studien konnten Caspasen als wichtige Mediatoren für die Aktivierung dieser Signalwege identifiziert werden (Lamkanfi et al., 2007; Siegmund et al., 2007; Wajant et al., 2003). Daher wurde auch die Todesliganden-induzierte Änderung der Zellmorphologie in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen auf die Beteiligung von Caspasen untersucht (Abbildung 29). Vorinkubation mit dem Pan-Caspaseinhibitor zVAD-fmk blockierte nach FasL- oder TRAIL-Zugabe die amöboide Abrundung der Zellen vollständig, was sich sowohl in der Durchlichtmikroskopie (Abbildung 29A) als auch durch Auszählen der Zellen deutlich zeigte (Abbildung 29B). Aus diesen Experimenten ließ sich ableiten, dass die Aktivität von Caspasen Grundvoraussetzung für die Änderung der Zellmorphologie nach TRAIL- oder FasL-Stimulation in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen war.

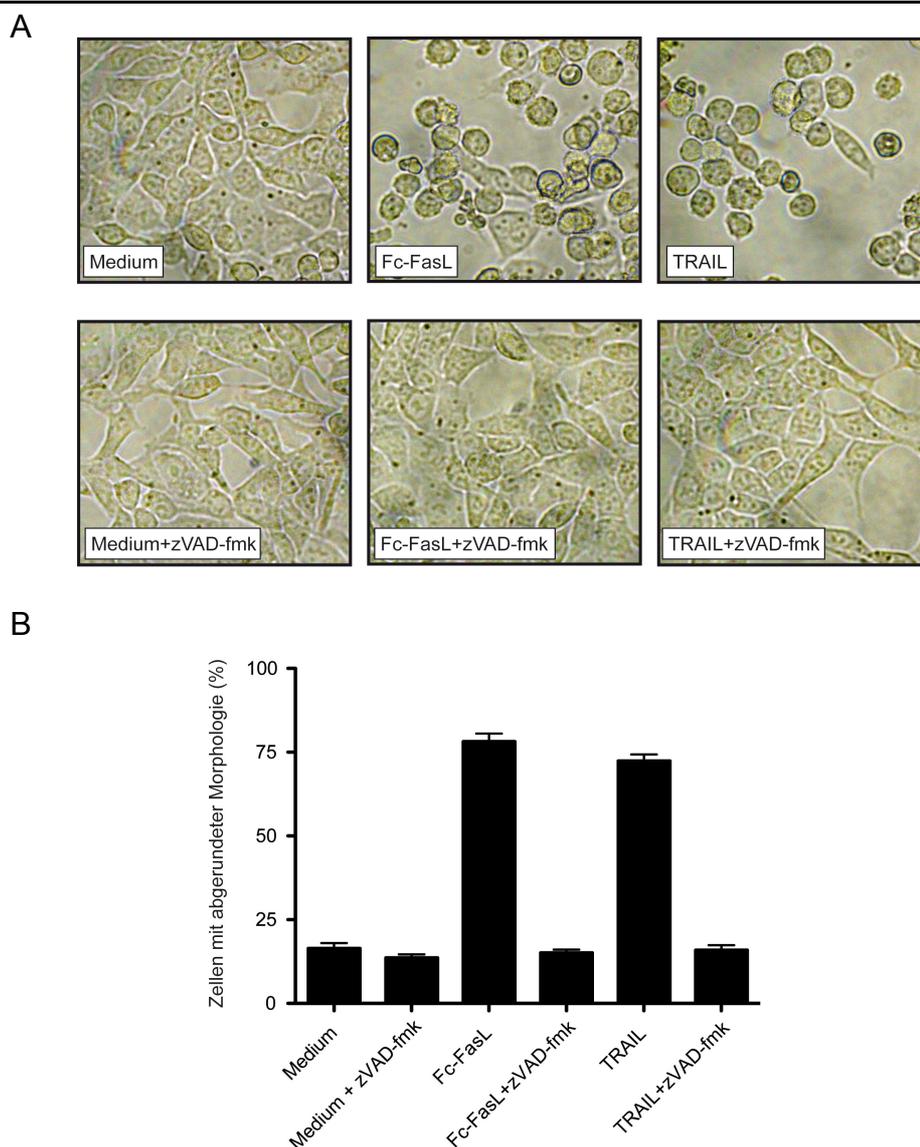


Abbildung 29: Caspaseinhibition mit zVAD verhindert die FasL-/TRAIL-induzierte Abrundung von HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen

HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden in 6-well Platten ausgesät (5×10^5 pro Gruppe) und, falls angegeben, mit $100 \mu\text{M}$ zVAD-fmk 1 h vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 200 ng/ml Fc-FasL oder 50 ng/ml TRAIL über Nacht. Die abgerundeten Zellen wurden mikroskopisch dokumentiert (A) und ausgezählt (B). Gezeigt sind repräsentative Bilder (A) bzw. die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten (B). Vergrößerung 400x.

Die bisherigen in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Caspaseaktivierung in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen hatten nach FasL- oder TRAIL-Stimulation lediglich eine Aktivierung von Caspase-8 gezeigt (Abbildung 12). Da sich wiederum die Änderung der Zellmorphologie von Caspaseaktivität abhängig waren (Abbildung 29), deutete dies auf eine Rolle von Caspase-8 hin. Daher lag es nahe, die Abhängigkeit der Todesliganden-induzierten Änderung der Zellmorphologie von Caspase-8 zu untersuchen. Hierfür wurde die Caspase-8 Expression in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen durch RNA-Interferenz erniedrigt (Abbildung 30), so dass 48 h nach Transfektion entsprechender siRNA-Oligonukleotide auf Proteinebene die

Caspase-8 Proform nur noch in Spuren nachzuweisen war (Abbildung 30A). Während FasL oder TRAIL bei mit Kontroll-siRNA transfizierten HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen, die eine normale Caspase-8 Expression zeigten, eine Abrundung induzierten, war dieser Effekt bei mit Caspase-8 siRNA transfizierten Zellen praktisch nicht mehr nachweisbar (Abbildung 30B).

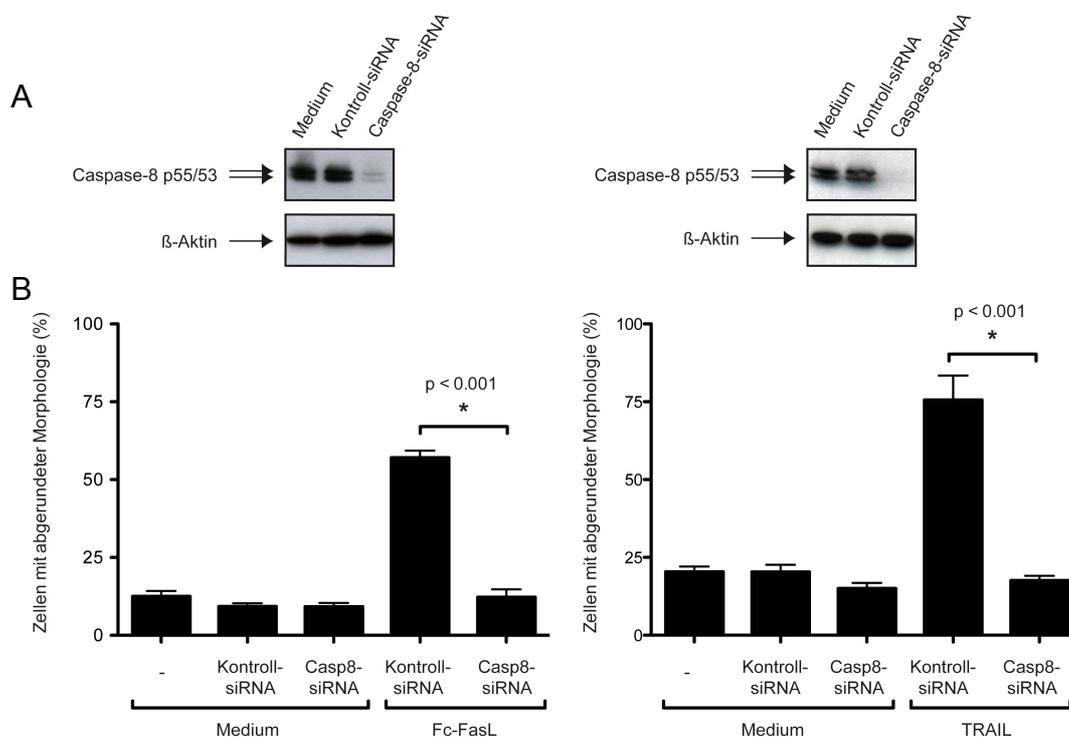


Abbildung 30: FasL- und TRAIL-vermittelte Änderungen der Zellmorphologie sind Caspase-8 abhängig

HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden in 6-Well Platten ausgesät ($2,5 \times 10^5$ pro Well), am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit 200 pmol Caspase-8 siRNA. Die Effektivität der RNA-Interferenz wurde durch Detektion von Caspase-8 mittels Western Blot 48 h nach Transfektion kontrolliert (A). Anschließend erfolgte die Stimulation über Nacht mit 200 ng/ml Fc-FasL bzw. 50 ng/ml TRAIL, am folgenden Tag wurden die Zellen mit abgerundeter Morphologie mikroskopisch ausgezählt (B). Gezeigt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

Die Hypothese, dass Caspase-8 an der Morphologieänderung der HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen nach Todesrezeptor Stimulation beteiligt ist, ließ sich damit durch die siRNA Experimente klar bestätigen. In vorhergehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von Caspase-8 auch für Fas-vermittelte Aktivierung des $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweges entscheidend ist, wobei die enzymatische Aktivität des Moleküls hierbei keine Rolle zu spielen scheint (Imamura et al., 2004; Kreuz et al., 2004). Darum wurden in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen die Auswirkungen des Caspase-8 Knockdowns auch auf die $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung untersucht (Abbildung 31). Caspase-8 siRNA Behandlung führte wiederum zu einer

deutlichen Reduktion der Caspase-8 Expression (Abbildung 31A) und damit einhergehend kam es auch zu einer Beeinträchtigung der FasL- oder TRAIL-induzierten NF κ B-Aktivierung. Dies wurde sowohl am erniedrigten Expressionsniveau des NF κ B-Zielgens IL8 in Caspase-8 Knockdown Zellen deutlich (Abbildung 31B), als auch an der verminderten Degradation von I κ B α mit einhergehender verminderter I κ B α -Phosphorylierung (Abbildung 31C). Die Inhibition der Caspaseaktivierung mit zVAD-fmk hatte, wie bereits in Abbildung 18 und Abbildung 19 gezeigt, keine Abschwächung des NF κ B-Signals nach Stimulation zur Folge.

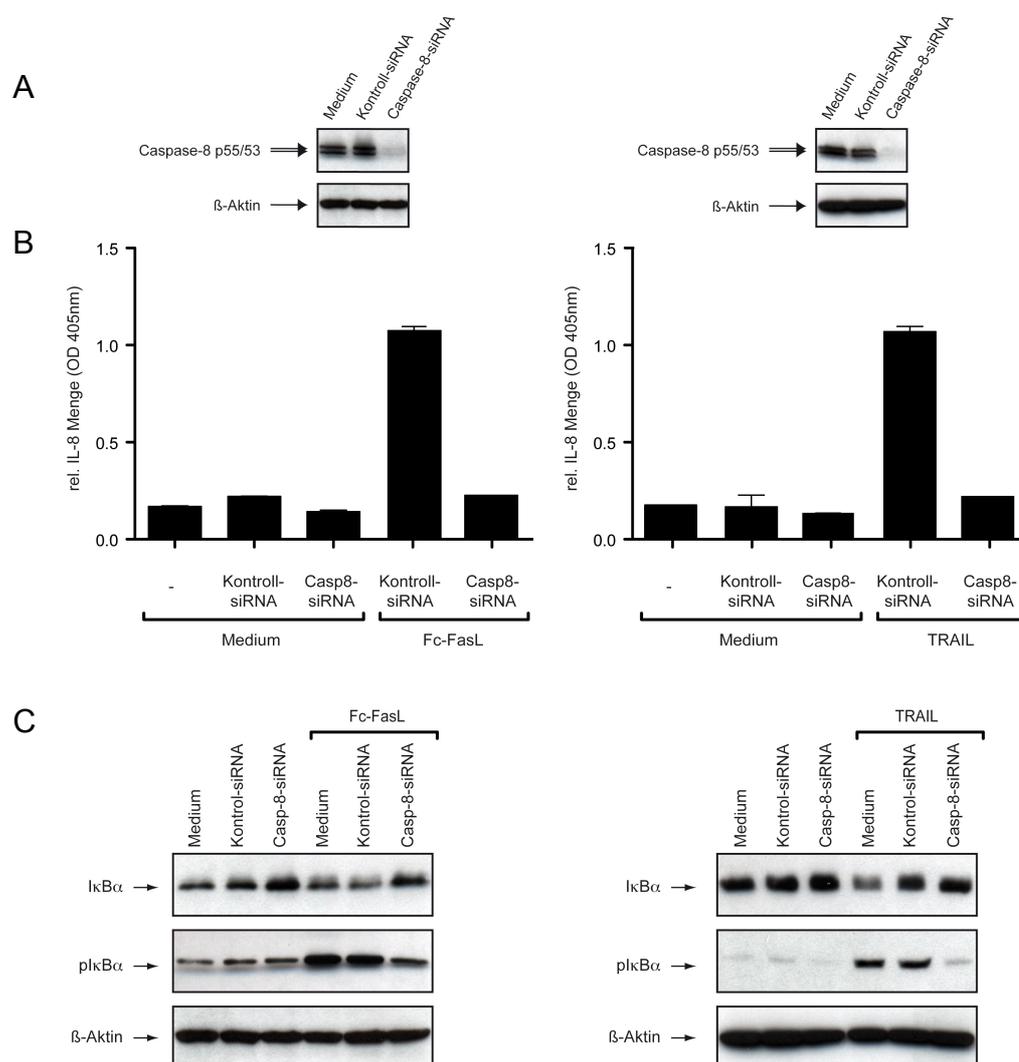


Abbildung 31: Caspase-8 Knockdown inhibiert die FasL- und TRAIL-induzierte NF κ B-Aktivierung

HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden in 6-Well Platten ausgesät ($2,5 \times 10^5$ pro Gruppe) und am nächsten Tag mit 200 pmol Caspase-8 siRNA transfiziert. Die Effektivität der RNA-Interferenz wurde durch Detektion von Caspase-8 im Western Blot 48 h nach Transfektion kontrolliert (A). Vor Stimulation wurde das Medium gewechselt, anschließend wurden die Zellen für 6 h mit 200 ng/ml Fc-FasL oder 50 ng/ml TRAIL behandelt. Die relative IL8-Menge aus dem Überstand wurde mittels ELISA bestimmt (Dreifachwerte) (B), die verbliebenen Zellen lysiert und im Western Blot auf die Expression der angegebenen Proteine hin untersucht (C).

Somit war Caspase-8 auch in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen an der Fas- und TRAIL-Todesrezeptor-vermittelten Aktivierung des NF κ B-Signalweges beteiligt. In Überstimmung mit früheren Studien war die katalytische Aktivität des Enzyms hierfür nicht wichtig.

Zusammengefasst waren beide FasL-/TRAIL-induzierte Prozesse, die Aktivierung des NF κ B-Signalweges und die Änderungen der Zellmorphologie, Caspase-8 abhängig. Zusätzlich zur Anwesenheit von Caspase-8 war letzterer Prozess auch von deren enzymatischer Aktivität abhängig. Neben dem hier beschriebenen Übergang zu einer amöboid-abgerundeten Zellform findet sich in der existierenden Literatur bislang kein weiteres Beispiel für einen nicht apoptotischen Effekt von Todesrezeptoren, der von enzymatisch aktiver Caspase-8 vermittelt wird.

4.5 Die FasL-/TRAIL-induzierte Morphologie ist abhängig von Caspase-8 vermittelter ROCK-1-Spaltung

Bereits in der lasermikroskopischen Darstellung des Aktinzytoskeletts deutete sich an, dass die durch FasL- und TRAIL-induzierte amöboide Änderung der Zellmorphologie in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen (Abbildung 22) auf einer Reorganisation des Zytoskeletts beruht. Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass diese Reorganisation abhängig von enzymatisch aktiver Caspase-8 ist (Abbildung 29, Abbildung 30). So wird die Reorganisation des Aktinzytoskeletts offenbar über ein der Caspase-8 nachgeschaltetes Proteinen vermittelt. Die Rho-GTPase-Familie kontrolliert über die Aktivierung von Effektorproteinen vielfältige Umbauvorgänge des Aktinzytoskeletts (Narumiya et al., 2009; Papakonstanti und Stournaras, 2008), unter anderem über die Aktivierung von ROCK-1. In einer vorhergehenden Studie konnte die Aktivierung von ROCK-1 mit der Ausbildung einer amöboiden Zellmorphologie in Verbindung gebracht werden (Sahai und Marshall, 2003). Weiterhin war ROCK-1 bereits als Caspase-3 Substrat identifiziert worden (Coleman et al., 2001; Sebbagh et al., 2001). Aus diesem Grund wurde nun untersucht, ob ROCK-1 auch an der Todesliganden-induzierten Reorganisation des Aktinzytoskeletts in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen beteiligt war. Nach Stimulation mit FasL wurden Aufnahmen des Aktinzytoskeletts in An- oder Abwesenheit des pharmakologischen ROCK-Inhibitors Y27632 gemacht (Abbildung 32).

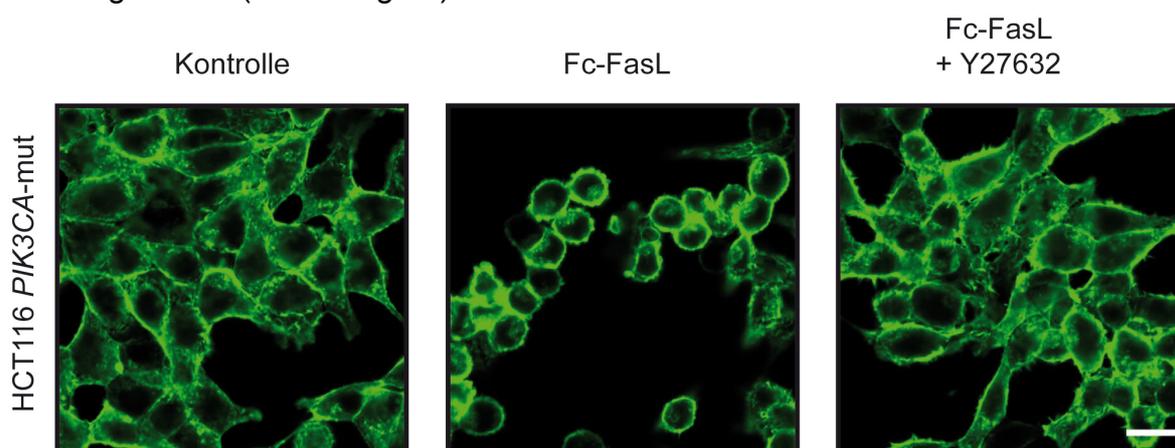


Abbildung 32: ROCK-abhängige Reorganisation des Aktinzytoskeletts nach Fc-FasL-Stimulation in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen

HCT116 *PIK3CA*-mut wurden tags zuvor auf Deckgläschen ausgesät (4×10^4 Zellen pro Gruppe) und mit 200 ng/ml Fc-FasL für 4 h stimuliert. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und das Aktinzytoskelett mit AlexaFluor®488-markiertem Phalloidin dargestellt. Die Zugabe von Y27632 (20 μ M) erfolgte 1 h vor Stimulationsbeginn. Färbung und lasermikroskopische Aufnahmen wurden von Volker Spindler, Lehrstuhl für Anatomie III, Universität Würzburg, durchgeführt. Der eingebrachte Maßstab entspricht einer Länge von 20 μ m. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Dabei zeigte sich, dass die Morphologieänderung der Zellen durch ROCK-Inhibition mittels Y27632 blockiert werden konnte. Der Befund bestätigte sich auch durch die Auszählung der Zellen mit amöboid-abgerundeter Morphologie unter dem Mikroskop. (Abbildung 33).

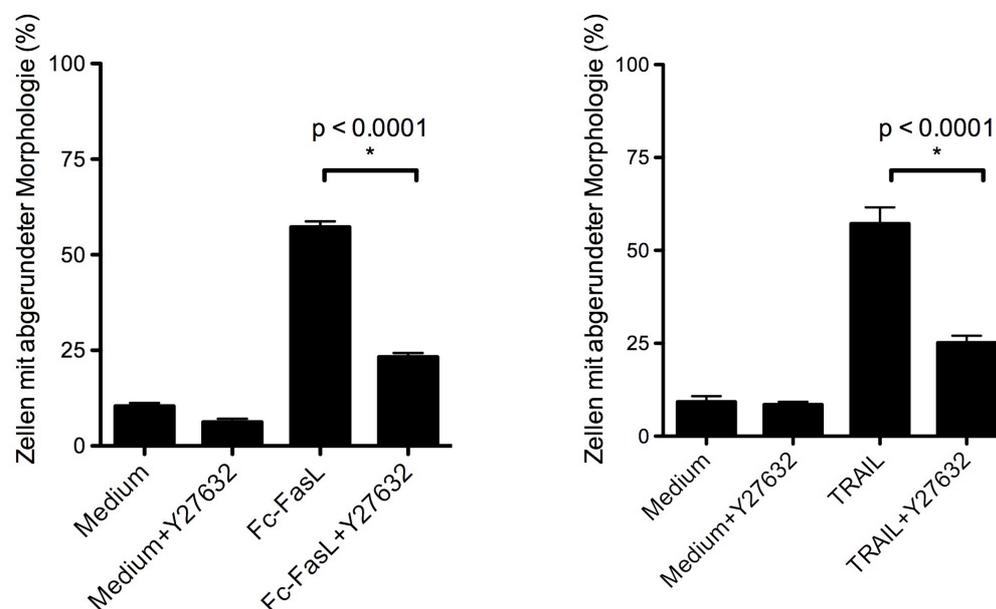


Abbildung 33: ROCK-Inhibition verhindert Zellmorphologieänderung nach FasL- oder TRAIL-Stimulation in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen

HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden in 6-Well Platten ausgesät ($2,5 \times 10^5$ pro Gruppe), am nächsten Tag mit dem ROCK-Inhibitor Y27632 (10 μ M) 2 h inkubiert und anschließend mit 200 ng/ml Fc-FasL oder 50 ng/ml TRAIL über Nacht stimuliert. Die abgerundeten Zellen wurden unter dem Mikroskop gezählt. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

Weiterhin konnte die wichtige Rolle von ROCK-1 (Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1) für die Änderung der Zellmorphologie durch RNA-Interferenz belegt werden (Abbildung 34). In HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen zeigte sich 48 h nach Transfektion ROCK-1-spezifischer siRNA-Oligonukleotide eine massiv verminderte ROCK-1-Expression im Western Blot (Abbildung 34A). Nach Stimulation mit FasL oder TRAIL wiesen die mit ROCK-1-spezifischer siRNA transfizierten Zellen im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine statistisch signifikante Reduktion der Zellen mit amöboid-abgerundeter Morphologie (Abbildung 34B) auf.

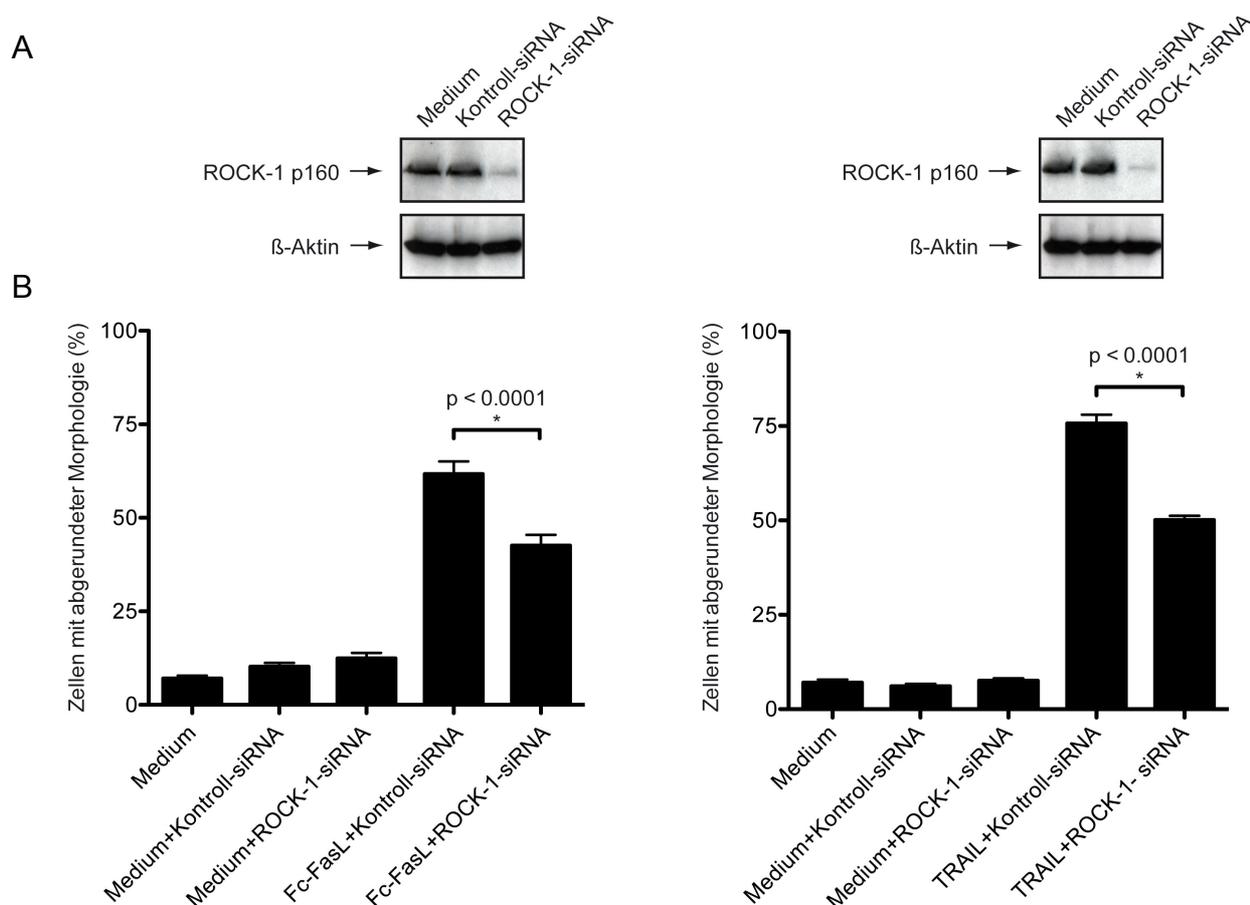


Abbildung 34: ROCK-1-Knockdown vermindert in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen die Morphologieänderung nach FasL- oder TRAIL-Stimulation

HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden in 6-Well Platten ausgesät ($2,5 \times 10^5$ pro Gruppe) und am nächsten Tag mit 200 pmol ROCK-1-siRNA. Die Effektivität der RNA-Interferenz wurde durch Detektion von ROCK-1 im Western Blot 48 h nach Transfektion kontrolliert (A). Anschließend wurden die Zellen über Nacht mit 200 ng/ml Fc-FasL oder 50 ng/ml TRAIL behandelt. Die Zellen mit abgerundeter Morphologie wurden mikroskopisch ausgezählt (B). Gezeigt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass ROCK-1 für die FasL-/TRAIL-induzierte Reorganisation des Aktinzytoskeletts und den damit verbundenen Morphologieänderungen eine wesentliche Rolle spielt.

Nachdem die Beteiligung von ROCK-1 an der Ausbildung einer amöboid-abgerundeten Zellmorphologie belegt werden konnte, sollte die Frage der Aktivierung des Proteins untersucht werden. Im Gegensatz zu früheren Studien, in welchen die Aktivierung von ROCK-1 auf die Spaltung durch Caspase-3 während der Apoptose zurückgeführt wurde (Coleman et al., 2001; Sebbagh et al., 2001), war dieser Mechanismus in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen aus zwei Gründen unwahrscheinlich: Zum Ersten zeigen diese Zellen eine hohe Apoptoseresistenz gegenüber FasL und TRAIL, und zum Zweiten kam es zu keiner vollständigen Aktivierung von Caspase-3, die Prozessierung stoppte am inaktiven p19-Fragment.

Die einzig effektiv aktive Caspase in FasL-/TRAIL-stimulierten HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen ist Caspase-8 (vgl. Abbildung 12). Daher wurde die Aminosäuresequenz von ROCK-1 mit dem Programm GrabCas auf das Vorliegen von Caspase-8 Schnittstellen untersucht. Alle vorhergesagten Schnittstellen für die Caspasen 1 - 9 in ROCK-1 finden sich im Anhang unter Punkt 9.5. Bei der Analyse fiel auf, dass die zuvor beschriebene Schnittstelle für Caspase-3, DETD↓G (1113), welche zur Aktivierung von ROCK-1 führt, auch mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit durch Caspase-8 gespalten werden kann (Abbildung 35). Dabei erzielte das in ROCK-1 enthaltene Motiv DETD↓G (1113) ähnlich hohe Punktwerte für eine Caspase-8 Spaltung wie das bekannte Caspase-8 Substrat cFLIP. Die Analyse zeigte auch die bereits bekannte Spaltung dieses Motivs durch Caspase-3 an. Der Wert für die Caspase-3-vermittelte Proteolyse lag ähnlich hoch wie bei dem bekannten Caspase-3 Substrat DFFA (DNA fragmentation factor A).

	Schnittstelle	GrabCas Punktwert	
		Caspase-3	Caspase-8
ROCK-1	DETD↓G (1113)	37.8	70.3
Caspase-8 Substrat: cFLIP	LEVD↓G (376)	0	79.2
Caspase-3 Substrat: DFFA	DAVT↓D (224)	35.69	2.50

Abbildung 35: DETD↓G (1113) Spaltung in ROCK-1 kann Caspase-3 oder Caspase-8 vermittelt sein

Die Aminosäuresequenz von ROCK-1 wurde im FASTA Format in das Programm GraBCas geladen und die möglichen Caspase-Schnittstellen in der Sequenz analysiert. Dargestellt sind die Werte der Caspasen-3 und -8 für die Prozessierung an der aktivierenden Schnittstelle DETD↓G (1113). Zum Vergleich und zur Spezifitätskontrolle wurden auch die mit GraBCas ermittelten Punktwerte für das Caspase-3 Substrat DFFA und das Caspase-8 Substrat cFLIP angegeben.

In der Annahme, dass ROCK-1 auch durch Caspase-8 gespalten werden kann, wurden HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen mit FasL oder TRAIL stimuliert und die induzierte ROCK-1-Spaltung im Western Blot analysiert (Abbildung 36). In den beiden isogenen Zelllinien wurde ROCK-1 mit vergleichbarer Effizienz gespalten, obwohl bezüglich der Aktivität von Effektorcaspasen deutliche Unterschiede bestehen (Abbildung 12). Daraus ließ sich folgern, dass die ROCK-1-Spaltung sowohl von der Aktivierung von Effektorcaspasen wie der Caspase-3, als auch vom Ablaufen der Apoptose unabhängig war, da beides in den *PIK3CA*-mut Zellen nicht stattfand. Nach Inhibition jeglicher Caspaseaktivität mit zVAD-fmk konnte kein ROCK-1-Spaltprodukt mehr detektiert werden, was auf eine Rolle von Caspase-8 für die ROCK-1-Aktivierung hinwies.

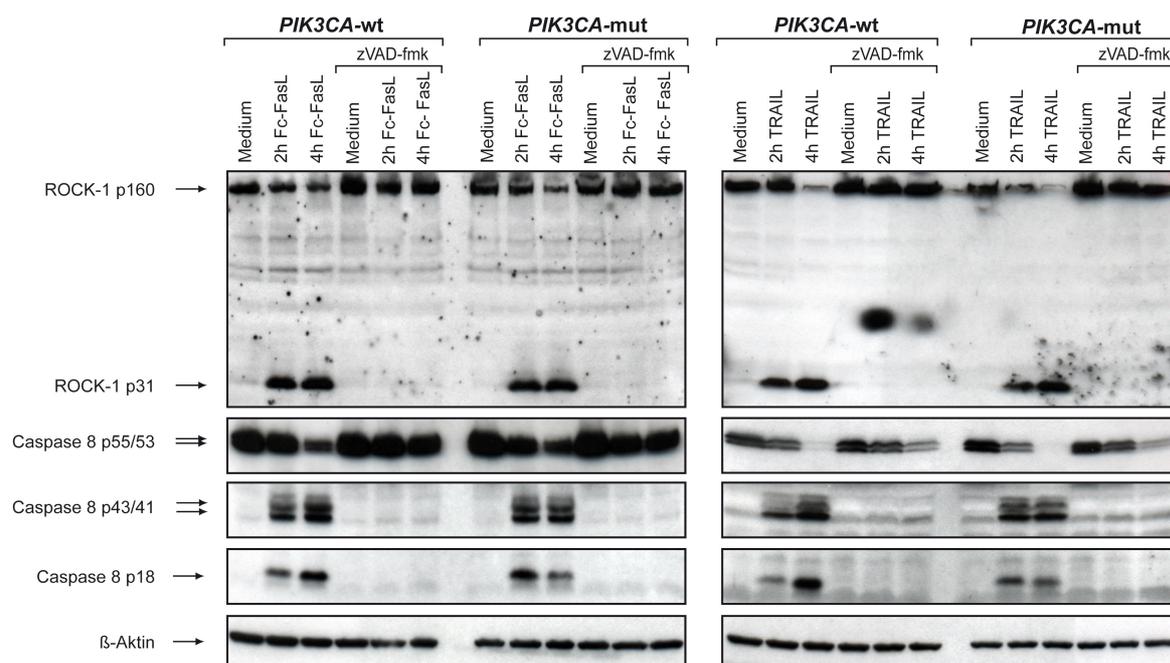


Abbildung 36: ROCK-1-Spaltung in HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen ist unabhängig von Effektorcaspasen und Apoptose

HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen (1.5×10^6 Zellen pro Gruppe) wurden auf 6 cm Schalen ausgesät und am nächsten Tag mit 200 ng/ml Fc-FasL oder 50 ng/ml TRAIL stimuliert. Falls angegeben, wurde 1 h vor Stimulationsbeginn zVAD-fmk (100 μ M) zugegeben. Nach 2 h bzw. 4 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und im Western Blot auf die angegebenen Proteine analysiert.

Sollte die Spaltung von ROCK-1 in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen primär durch Caspase-8 erfolgen, so sollte die spezifische Blockade der Caspase-3 Aktivität mit einem pharmakologischen Inhibitor keinen Effekt auf die Todesrezeptor-induzierte ROCK-1-Spaltung haben. Daher wurden HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen vor der Behandlung mit FasL oder TRAIL mit einem Caspase-3 spezifischen pharmakologischen Inhibitor inkubiert (Abbildung 37). Nach Stimulation zeigte sich in beiden Zelllinien noch immer Spaltung von ROCK-1. Die Prozessierung von Caspase-3 war in den HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen jedoch durch den Inhibitor auf dem Niveau des inaktiven p19-Fragments blockiert. Aktive Caspase-8 allein ist somit in HCT116 Zellen ausreichend, um die Spaltung und damit die Aktivierung von ROCK-1 zu erreichen.

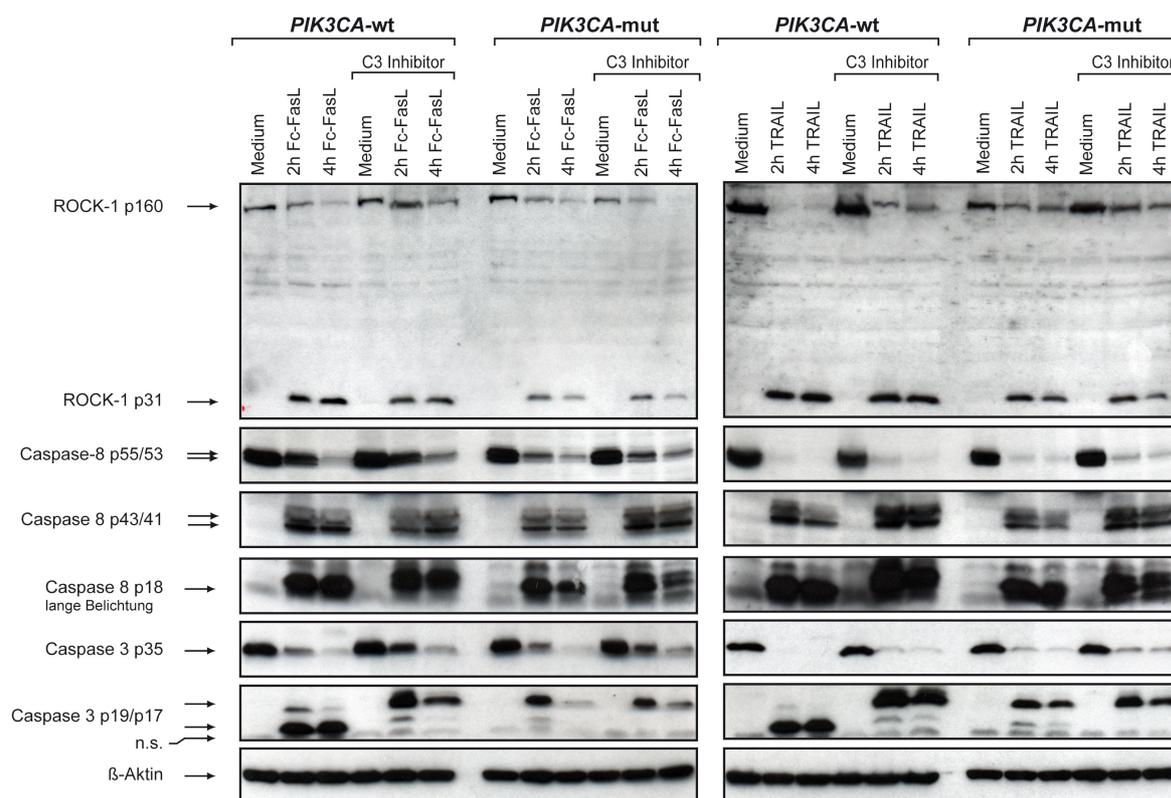


Abbildung 37: Die FasL-/TRAIL-induzierte ROCK-1-Spaltung ist in HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen Caspase-3 unabhängig

HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurden in 6 cm Schalen ausgesät (1.5×10^6 pro Gruppe) und am nächsten Tag mit 200 ng/ml Fc-FasL oder 50 ng/ml TRAIL behandelt. Der Einsatz von Caspase-3 Inhibitor (20 μ M) erfolgte in den angegebenen Gruppen 1 h vor Stimulationsbeginn. 2 h bzw. 4 h nach Stimulationsbeginn wurden die Zellen geerntet, lysiert und auf die angegebenen Proteine im Western Blot untersucht.

Durch Vorinkubation mit dem Caspase-3 spezifischen Inhibitor konnte auch das Überleben der HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen nach Behandlung mit FasL oder TRAIL deutlich gesteigert werden (Abbildung 38).

Die unter Caspase-3 Inhibition noch immer vorhandene ROCK-1-Aktivierung nach FasL- oder TRAIL-Behandlung in HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen wurde auch auf Ebene der Zellmorphologieänderung deutlich. Ein Großteil der HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen nahm auch in Gegenwart des Caspase-3 Inhibitors ligandeninduziert eine amöboid-abgerundete Morphologie an (Abbildung 39A). Interessant war die Beobachtung des Effekts der Caspase-3 Inhibition in HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen (Abbildung 39B). Diese Zellen waren dadurch partiell vor FasL-/TRAIL-induzierter Apoptose geschützt (Abbildung 38), und unter diesen Bedingungen konnte auch in *PIK3CA*-wt Zellen eine durch FasL oder TRAIL hervorgerufene Änderung der Zellmorphologie beobachtet werden.

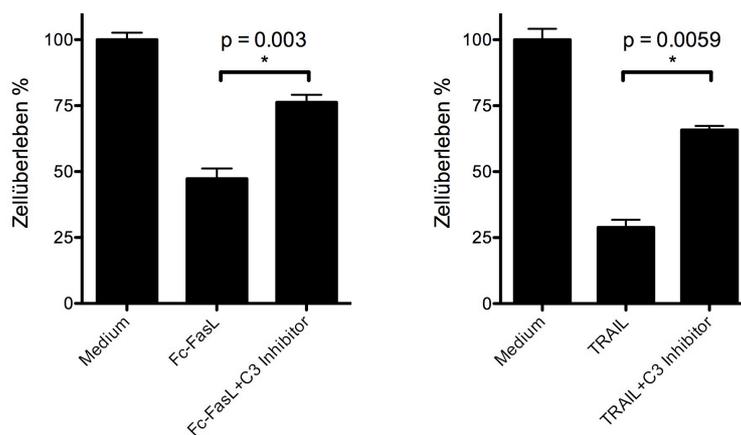


Abbildung 38: Partielle Protektion von HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen vor FasL- bzw. TRAIL-induzierter Apoptose durch Caspase-3 Inhibition

HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen wurden in 96-Well Platten ausgesät (2×10^4 Zellen pro Well) und am nächsten Tag mit 200 ng/ml Fc-FasL oder 50 ng/ml TRAIL (Dreifachwerte) über Nacht behandelt. Bei den angegebenen Gruppen wurde Caspase-3 Inhibitor (100 μ M) 1 h vor Stimulationsbeginn zugegeben. Die Zellvitalität wurde am nächsten Tag mittels MTT-Färbung bestimmt.

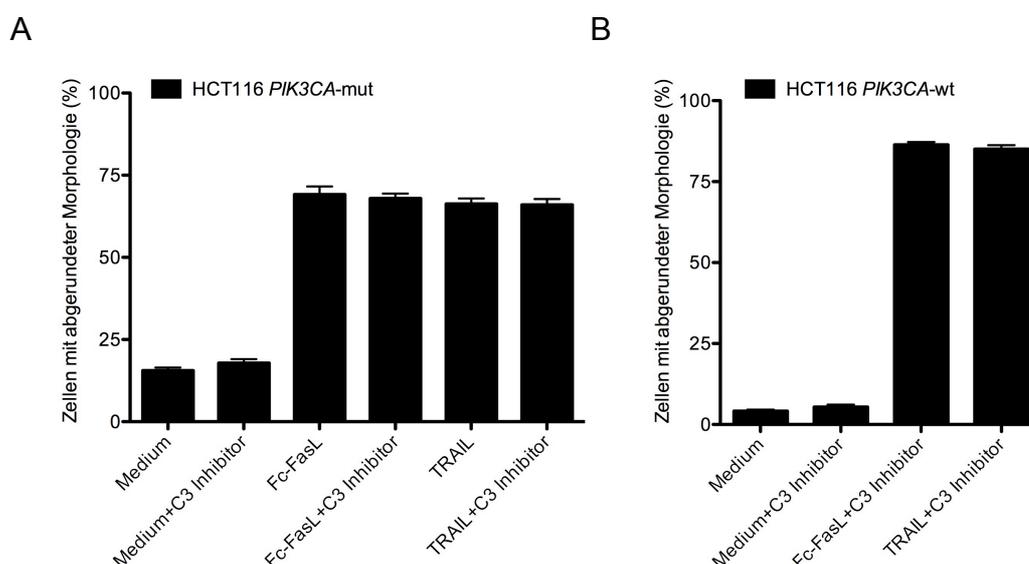


Abbildung 39: Caspase-3 Inhibition hat keine Auswirkung auf die Änderung der Zellmorphologie nach FasL- oder TRAIL-Behandlung in HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen

HCT116 *PIK3CA*-wt und *PIK3CA*-mut Zellen wurden in 6-Well Platten ausgesät (5×10^5 Zellen pro Gruppe) und am nächsten Tag mit 200 ng/ml Fc-FasL bzw. 50 ng/ml TRAIL über Nacht behandelt. Caspase-3 Inhibitor wurde bei den angegebenen Gruppen 1 h vor Stimulationsbeginn 20 μ M zugegeben. Die abgerundeten Zellen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt.

Zusammengenommen konnte so die bioinformatisch vorhergesagte, aktivierende Caspase-8 Spaltung von ROCK-1 durch den Einsatz eines Caspase-3 spezifischen Inhibitors bestätigt werden.

Letztlich setzt die Spaltung von ROCK-1 durch Caspase-8 eine zumindest vorübergehende Interaktion der beiden Proteine voraus. Daher wurde diese Interaktion in Immunpräzipitationsexperimenten mit HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen nach Stimulation mit TRAIL untersucht (Abbildung 40). Nach zwei- und vierstündiger Behandlung mit TRAIL konnte neben ROCK-1 p160 auch das Spaltprodukt p31 präzipitiert werden, sowie assoziierte Caspase-8 (p43/41). Eine Assoziation von Caspase-3 mit ROCK-1 ließ sich in der Immunpräzipitation nicht nachweisen, in den korrespondierenden Zelllysaten fand sich erneut die Prozessierung der Caspase-3 bis zum p19-Fragment.

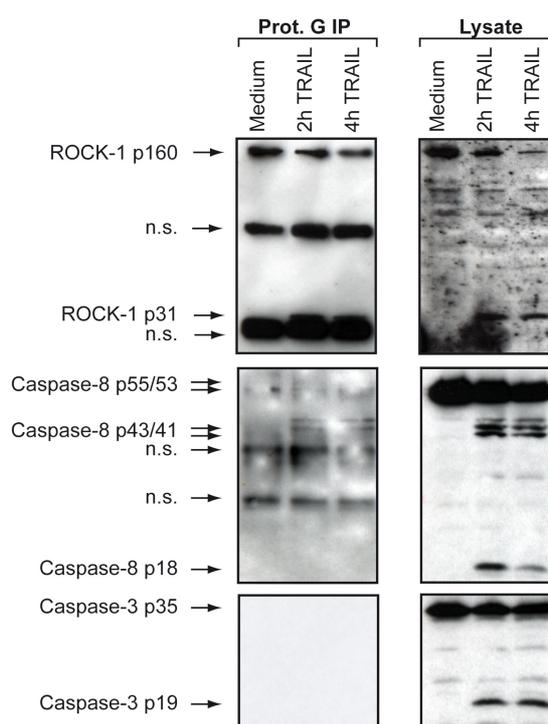


Abbildung 40: Koimmunpräzipitation von ROCK-1 und Caspase-8 in TRAIL-stimulierten HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen

Eine konfluente 175 cm² Flasche HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen pro Gruppe wurde für 2 h bzw. 4 h mit 100 ng/ml TRAIL stimuliert oder blieb als Kontrolle unbehandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert. Verbliebene Membranbestandteile wurden durch sequentielle Zentrifugationsschritte abgetrennt und ein Aliquot jedes Lysats für die Analyse abgezweigt. Zum verbliebenen Rest jeder Gruppe wurde 5 µg ROCK-1-spezifischer Antikörper pipettiert und 1 h bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden 50 µL Protein-G gekoppelte Agarose zugegeben, über Nacht bei 4°C inkubiert und am folgenden Tag von den Beads eluiert.

Zusammengenommen zeigten diese Ergebnisse, dass die nach TRAIL oder FasL auftretende Änderung der Zellmorphologie in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen neben Caspase-8 Aktivität auch die Spaltung und Aktivierung von ROCK-1 erfordert. Zusätzlich zur bereits in der Literatur beschriebenen Spaltung durch Caspase-3, konnte in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen die Caspase-8 vermittelte ROCK-1-Spaltung bioinformatisch und biochemisch nachgewiesen werden.

4.6 cFLIP_S verhindert FasL- und TRAIL-vermittelte Änderung der Zellmorphologie

Todesrezeptor-vermittelte Apoptose ist ein wesentlicher Mechanismus, um das Wachstum und die Ausbreitung transformierter Zellen zu unterbinden. Eine häufig beobachtete Gegenregulation in Tumorzellen ist die verstärkte Expression der antiapoptotischen cFLIP-Proteine, welche die rezeptorassoziierte Aktivierung von Caspase-8 verhindern (Golks et al., 2005; Krueger et al., 2001). In den bisherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die durch FasL- oder TRAIL-induzierte Änderung der Zellmorphologie von aktiver Caspase-8 abhängig ist. Daher wurden auch die Auswirkungen der cFLIP_S Überexpression in *PIK3CA*-mut Zellen untersucht. Wie zu erwarten, zeigten die cFLIP_S exprimierenden *PIK3CA*-mut Zellen im Gegensatz zur Vektorkontrolle eine blockierte Caspase-8 Aktivierung nach Todesrezeptorstimulation (Abbildung 41A). Verglichen mit der Ausgangszelllinie HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen zeigten die mit Leervektor (pEGZ) oder FLIP_S (pEGZ-FLIP_S) transfizierte Zellen eine vergleichbare Resistenz gegenüber FasL- oder TRAIL-induzierter Apoptose (Abbildung 41B).

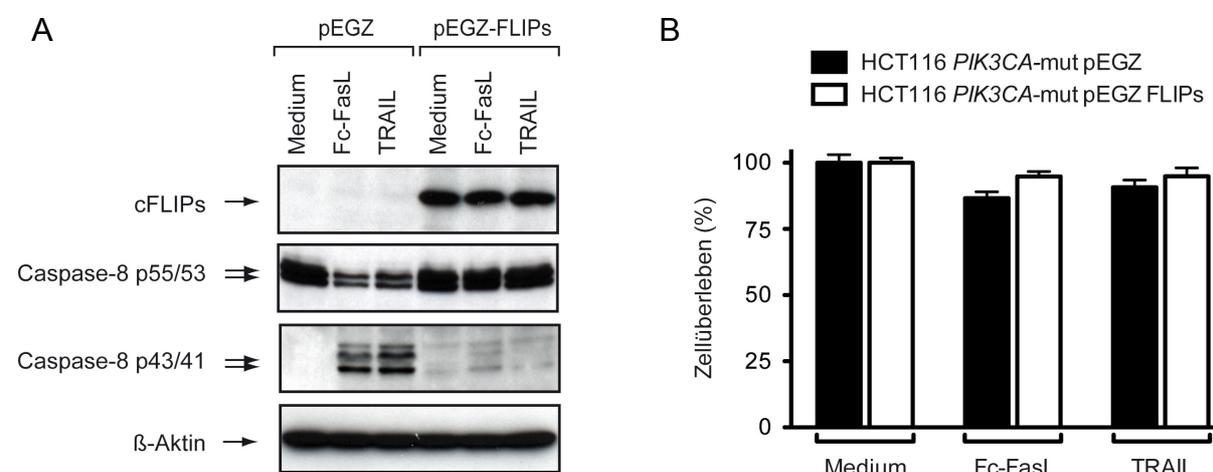


Abbildung 41: Todesrezeptor-induzierte Caspase-8 Aktivierung der HCT116 *PIK3CA*-mut pEGZ und HCT116 *PIK3CA*-mut pEGZ-FLIP_S Zellen

(A) 1.5×10^6 Zellen wurden in 6 cm Schalen ausgesät und am nächsten Tag mit 200 ng/ml Fc-FasL oder 50 ng/ml TRAIL für 4 h stimuliert, anschließend lysiert und im Western Blot auf die angegebenen Proteine analysiert. (B) 2×10^4 Zellen pro Gruppe wurden in 96-Well Platten ausgesät und über Nacht mit 1000 ng/ml Fc-FasL oder 1000 ng/ml TRAIL behandelt (Dreifachwerte). Die Zellvitalität wurde am nächsten Tag mittels MTT-Färbung bestimmt.

In Übereinstimmung mit der Annahme, dass die Todesliganden-induzierte Änderung der Zellmorphologie von der enzymatischen Aktivität der Caspase-8 abhängig ist, blieb in cFLIP_S überexprimierenden HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen eine

Morphologieänderung nach FasL- oder TRAIL-Stimulation nahezu vollständig aus (Abbildung 42).

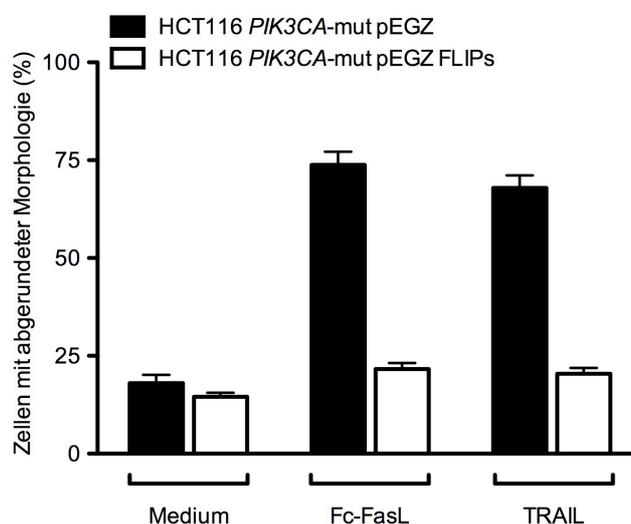


Abbildung 42: Überexpression von cFLIP_S verhindert Änderung der Zellmorphologie

HCT116 *PIK3CA*-mut pEGZ und *PIK3CA*-mut pEGZ-FLIPs Zellen wurden in 6-Well Platten ausgesät (5×10^5 pro Gruppe) und am nächsten Tag mit 200 ng/ml Fc-FasL oder 50 ng/ml TRAIL über Nacht behandelt. Die Zellen mit abgerundeter Morphologie wurden mikroskopisch ausgezählt, dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

In vorhergehenden Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass cFLIP-Proteine auch die TRAIL- und FasL-induzierte Aktivierung des NF κ B-Signalweges hemmen (Kreuz et al., 2004; Siegmund et al., 2005; Wajant et al., 2000). Deshalb wurde dies auch in den cFLIP_S exprimierenden HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen untersucht (Abbildung 43). Nach Behandlung mit FasL oder TRAIL zeigten HCT116 *PIK3CA*-mut-vec Zellen wie erwartet auf Proteinebene erhöhte Spiegel des NF κ B-kontrollierten Zielgens IL8. Dieser Anstieg fehlte bei cFLIP_S überexprimierenden Zellen.

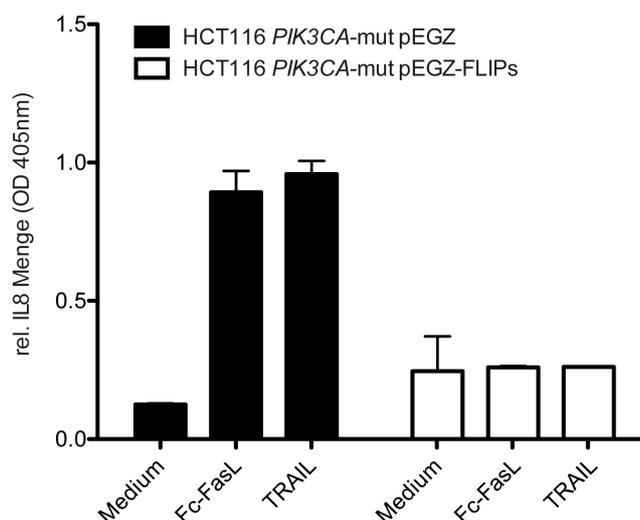


Abbildung 43: Überexpression von cFLIP_s inhibiert Aktivierung des NFκB-Signalweges

HCT116 *PIK3CA*-mut pEGZ und HCT116 *PIK3CA*-mut pEGZ-FLIPs Zellen wurden auf 6 cm Platten (1.5×10^6 Zellen) ausgesät und am nächsten Tag mit 200 ng/ml Fc-FasL bzw. 50 ng/ml TRAIL über Nacht behandelt (Dreifachwerte). Aus den Überständen wurde die relative IL8-Menge mittels ELISA bestimmt.

Insgesamt ging aus den Experimenten mit cFLIP_s überexprimierenden HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen erneut die Abhängigkeit der FasL- oder TRAIL-induzierten Zellmorphologieänderung von aktiver Caspase-8 hervor. Weiterhin deuten die hier über cFLIP_s generierten Daten darauf hin, cFLIP auch antitumorale Effekte, z.B. durch Inhibition des proinflammatorischen NFκB-Signalweges nach FasL- oder TRAIL-Stimulation haben kann.

5 Diskussion

5.1 FasL- und TRAIL-Signaltransduktion in apoptose-resistenten HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen

Die Signaltransduktion der Todesrezeptoren Fas, TRAILR1 und TRAILR2 im Kolonkarzinom wurde bislang hauptsächlich vor dem Hintergrund der Apoptoseinduktion in Tumorzellen untersucht. So zielte eine große Anzahl von Studien darauf ab, die Resistenzmechanismen der Tumorzellen gegenüber der FasL- oder TRAIL-induzierten Apoptose zu charakterisieren, beziehungsweise diese pharmakologisch zu umgehen.

FasL und TRAIL können neben proapoptotischen Effekten aber auch nicht-apoptotische Signalwege mit potentiell protumoralem Charakter aktivieren (Peter et al., 2007; Wajant, 2006). Hierbei sind vor allem die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges als auch die Aktivierung von ERK zu nennen. Das Anschalten dieser und weiterer nicht-apoptotischer FasL- oder TRAIL-induzierter Signalwege ist besonders in Zellen relevant, die nach Stimulation mit diesen Liganden nicht in Apoptose gehen. Allerdings wurden die meisten Studien zur nicht-apoptotischen Signaltransduktion von Todesrezeptoren in Zellsystemen durchgeführt, die durch den Einsatz pharmakologischer Inhibitoren oder die ektope Überexpression antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 oder Bcl-XL gegen Apoptose geschützt wurden. Das Zusammenspiel nicht-apoptotischer, FasL- oder TRAIL-induzierter Signalwege mit anderen an der onkogenen Transformation beteiligten Signalwegen wurde bislang kaum untersucht.

In dieser Arbeit wurde die Kooperation des onkogenen PI3K/Akt-Signalweges mit Fas und den TRAIL-Todesrezeptoren untersucht. Experimente mit isogenen HCT116 Zelllinien, welche über ein einzelnes *PIK3CA*-Wildtypallel oder ein einzelnes mutiertes Allel verfügen, erlaubten erstmals die Auswirkungen einer aktivierenden *PIK3CA*-Mutation eindeutig zu definieren. So zeigen HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen eine erhöhte Proliferation, unabhängig von Wachstumsfaktoren und Resistenz gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose (Guo et al., 2007; Samuels et al., 2005). In der Studie von Guo et al. konnte die Apoptoseresistenz der HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen nach Entzug von Wachstumsfaktoren mit einer massiv reduzierten Bax-Expression in Verbindung gebracht werden. Diese Befunde fügen sich insofern gut in die Ergebnisse dieser Arbeit ein, als dass zwischen den HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen kein Unterschied in der Rekrutierung und Aktivierung der Caspase-8 durch Fas oder die TRAIL-Todesrezeptoren festgestellt werden

konnte (Abbildung 10, Abbildung 12). Somit sprechen diese Befunde, in Übereinstimmung mit der Studie von Guo et al., für einen Resistenzmechanismus der erst nach der Todesrezeptor-assoziierten Caspase-8 Aktivierung wirkt. Die Resistenz gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose konnte durch Inhibition des Proteasoms mit Bortezomib in zahlreichen hämatologischen und soliden Neoplasien durchbrochen werden (Russo et al., 2007). Auch in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen kam es nach Vorbehandlung mit Bortezomib zur Resensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose (Abbildung 15), und zwar ohne dass es zu einer Reexpression von Bax kam (Abbildung 16). Dieser Aspekt ist interessant, da Bax-defiziente HCT116 eine deutliche Apoptoseresistenz zeigten (Abbildung 13), was eine wichtige Rolle proapoptotischer mitochondrialer Faktoren beim Todesrezeptor-induzierten apoptotischen Zelltod in HCT116 Zellen belegt. Somit sind sie formal zu den Typ-II Zellen zu rechnen. Die HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen hingegen zeigten trotz massiv reduzierter Bax-Expression nach Behandlung mit dem Proteasomeninhibitor Bortezomib eine deutliche Sensitivierung gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose (Abbildung 15), was gegen eine entscheidende Rolle der Mitochondrien in diesem Szenario spricht. Bortezomib-sensitivierete HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen verhalten sich also als Typ-I Zellen. In der Literatur findet sich hierzu ein ähnlich gelagerter Bericht (Ndozangue-Touriguine et al., 2008). Der Zelltod der TRAIL-sensitiven Kolonkarzinomzelllinie SW480 folgte in dieser Arbeit dem Schema von Typ-II Zellen, während die isogene Zelllinie SW620 resistent gegenüber TRAIL war und nach Resensitivierung mit Bortezomib einen von mitochondrialer Verstärkung unabhängigen Typ-I Weg des Zelltods unterlag. Während Caspase-8 vollständig aktiviert wurde, stoppte in den SW620 Zellen die Prozessierung der Caspase-3 wie in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen auf Ebene des inaktiven p19-Fragments. Der Resistenzmechanismus der SW620 Zellen konnte auf zwei Ebenen lokalisiert werden. Trotz der fehlenden Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem Mitochondrium aufgrund der Überexpression des antiapoptotischen Proteins XIAP kam es zur Konversion in einen Typ-I Apoptoseweg. Die blockierte Freisetzung proapoptotischer mitochondrialer Faktoren fand sich durch die verminderte Bax Expression auch in den HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen. Die Resensitivierung durch Bortezomib bei ausbleibender Bax-Expression könnte so, ähnlich wie bei den SW480/SW620 Zelllinien, auf eine Konversion zu Typ-I Zellen hinweisen.

Dem PI3K/Akt-System wurden neben der blockierten Freisetzung proapoptotischer mitochondrialer Faktoren noch weitere Mechanismen der Resistenzentwicklung gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose zugeschrieben. In unterschiedlichen Zellsystemen konnte die PI3K/Akt-abhängige Resistenz auf Modulation der lateralen Rezeptormobilität in der Plasmamembran zurückgeführt werden (Varadhachary et al.,

2001). Weiterhin konnte auch ein Zusammenhang zwischen PI3K/Akt-Aktivierung und verstärkter Expression des antiapoptotischen, Caspase-8 inhibierenden Proteins cFLIP hergestellt werden (Panka et al., 2001; Suhara et al., 2001). In Zusammenschau mit den hier erhobenen Befunden wird deutlich, dass das PI3K/Akt-System mit ganz unterschiedlichen, zelltypabhängigen Mechanismen gegen Todesrezeptor-vermittelte Apoptose protektiv wirken kann. Abbildung 44 gibt einen vereinfachten Überblick über ausgewählte Mechanismen.

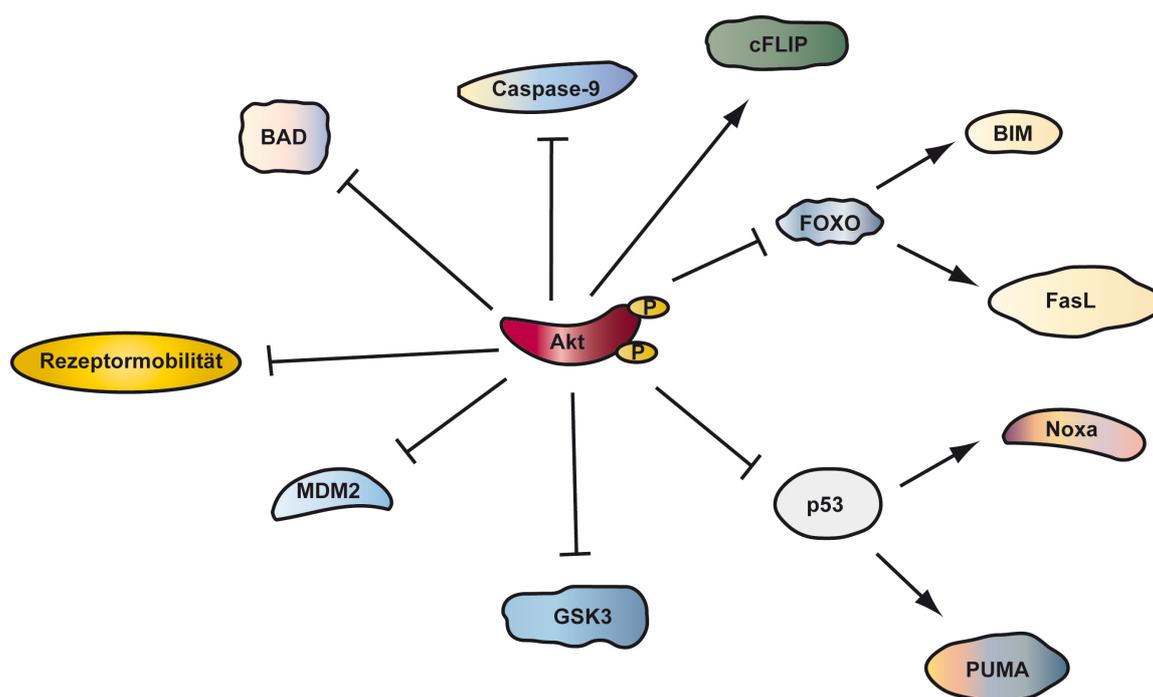


Abbildung 44: Akt kann durch unterschiedliche Mechanismen antiapoptotisch wirken

Schematische Darstellung unterschiedlicher Ansatzpunkte für die Akt-vermittelte Apoptoseresistenz. Eine weiterführende Darstellung findet sich in (Manning und Cantley, 2007).

Durch die Plastizität des PI3K/Akt-Systems kann es auf verschiedenen Ebenen zur Einrichtung antiapoptotischer Schutzmechanismen kommen. Je nach Lage und Art der Protektion interferiert das PI3K/Akt-System dabei nicht nur mit der Apoptoseinduktion, sondern auch in unterschiedlicher Weise mit nicht-apoptotischen Fas- oder TRAIL-Rezeptor-assoziierten Signalwegen. Tatsächlich zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Expression von cFLIP_s, neben der bekannten antiapoptotischen Funktion auch die FasL- und TRAIL-vermittelte Aktivierung von NF κ B blockiert (Abbildung 41). Somit kommt es abhängig vom Mechanismus, mit welchem das PI3K/Akt-System antiapoptotisch wirksam wird, auch zu Beeinflussungen weiterer Todesrezeptor-assoziiierter Signalwege. PI3K/Akt erwies sich so in dieser Arbeit in der Lage, nicht nur das Überleben der Tumorzelle durch Verhinderung der FasL- oder TRAIL-induzierten Apoptose unabhängig von FLIP zu

gewährleisten, sondern führt auch indirekt durch die nun protumoral wirkenden Todesrezeptoren zur Bildung eines tumorfördernden Mikromilieus zu (Abbildung 45).

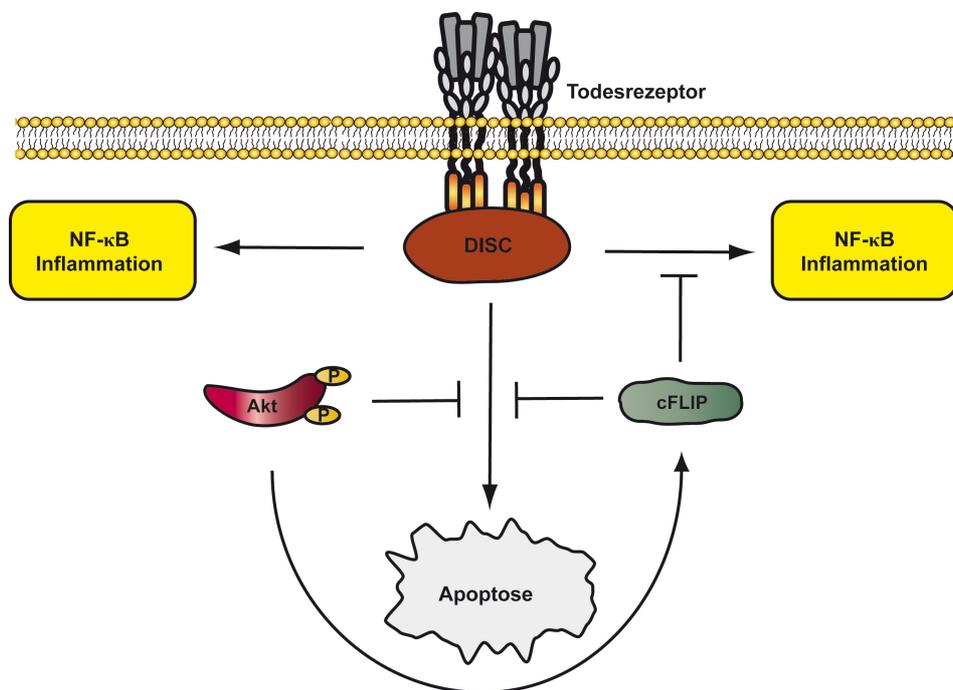


Abbildung 45: Akt kann neben Vermittlung von Apoptoseresistenz auch die Aktivierung von Todesrezeptor-assoziierten Signalwegen modulieren

Abhängig vom Mechanismus, mit dem Akt Apoptoseresistenz verleiht, kann es zusätzlich zu Todesrezeptor-initiierten, protumoralen Signalen wie Inflammation kommen. Im dargestellten Fall ist die Wirkung von cFLIP antitumoral.

5.2 Todesrezeptoren, Caspase-8 und Zellmigration

In neueren Studien finden sich vermehrt Hinweise auf eine Rolle von Todesrezeptoren bei Invasion und Metastasierung von Tumorzellen. Für Fas konnte diese beispielsweise für Glioblastomzellen nachgewiesen werden (Kleber et al., 2008). In dieser Studie kam es nach Fas-Aktivierung zur Assoziation mit Kinasen der Src-Familie sowie der regulatorischen p85-Untereinheit der PI3K. Hierüber kam es zu Aktivierung von Akt, welche wiederum GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) phosphorylierte und damit inaktivierte. β -Catenin translozierte daraufhin in den Nukleus, wo es die Transkription von Matrix-Metalloproteasen induzierte. Insgesamt betrachtet führte so die Fas-induzierte Akt-Aktivierung über GSK3 β und β -Catenin zu erhöhter Invasivität der Glioblastomzellen. Interessanterweise konnte die Fas-vermittelte PI3K-Aktivierung und Zellmigration in Glioblastomzellen nicht durch die Inhibition der Caspaseaktivität mit zVAD-fmk verhindert werden. Auch fand sich keine vermehrte Assoziation von Fas mit FADD oder Procaspase-8.

TRAIL kann die Zellmigration ebenfalls fördern, entsprechende Beobachtungen wurden bislang in apoptoseresistenten Tumorzellen und Muskelzellen des Gefäßsystems beschrieben (Ishimura et al., 2006; Secchiero et al., 2004; Trauzold et al., 2006). Viele cholangiozelluläre Karzinome sind beispielsweise gegen TRAIL-vermittelte Apoptose resistent und zeigen sogar eine erhöhte TRAIL-Expression (Ishimura et al., 2006). In der zitierten Studie konnte weiterhin in drei humanen cholangiozellulären Karzinomzelllinien eine NF κ B-abhängige, invasions- und migrationsfördernde Wirkung von TRAIL beobachtet werden. Somit finden sich in der existierenden Literatur bereits Hinweise auf eine erhöhte Invasivität und Migration von Tumorzellen nach Todesrezeptorstimulation.

Weiterhin finden sich Berichte in der Literatur die eine Rolle von Caspase-8 für die Zellmigration belegen, die interessanterweise unabhängig von deren Assoziation mit Todesrezeptoren ist. So wurde in NB7 Neuroblastomzellen mit überaktiven Src-Kinasen oder nach EGF (epidermal growth factor)-Stimulation die Phosphorylierung von Caspase-8 an Tyrosin 380, was die Bindung der regulatorischen p85-Untereinheit der PI3K ermöglicht, beobachtet. Nachfolgend wurde der PI3K-Effektor Rac (Ras-related C3 botulinum toxin substrate) aktiviert, der eine ausschlaggebende Rolle bei der Zellmigration spielt (Senft et al., 2007; Torres et al., 2008). In diesem Modell der Zellmigration war die enzymatische Aktivität von Caspase-8 nicht erforderlich. Im selben Zellsystem konnte weiterhin eine nicht-enzymatische Funktion von Caspase-8 in Src-abhängiger Zelladhäsion und ERK-Aktivierung gezeigt werden, wobei die Relevanz für die p85/Rac-vermittelte Zellmigration noch unklar ist (Finlay und Vuori, 2007). Daneben wurde auch die Rekrutierung von Caspase-8 in fokale Adhäsionskomplexe bei NB7 Zellen beobachtet. Über vermehrte Spaltung des Zytoskelettproteins Talin durch Calpain kommt es hier zur gesteigerten Zellmigration. Wiederum ist hier die enzymatische Aktivität der Caspase-8 oder Apoptoseinduktion entbehrlich (Barbero et al., 2009; Helfer et al., 2006). Die Rolle von Caspase-8 in der Zellmigration ist somit gut dokumentiert. Caspase-8 kann unabhängig von der Assoziation mit Todesrezeptoren die Zellmigration fördern. Die katalytische Aktivität des Enzyms wird in allen bisherigen Studien hierfür nicht als Voraussetzung beschrieben.

In dieser Arbeit wurde eine FasL- oder TRAIL-induzierte Änderung der Zellmorphologie hin zu einer abgerundet-amöboiden Form beobachtet, welche eindeutig von der katalytischen Aktivität von Caspase-8 abhängig ist (Abbildungen 29-31). Interessanterweise wurde in den letzten Jahren das Annehmen einer amöboide Zellform durch adhärente Zellen mit einer speziellen Form der Zellmigration in Verbindung gebracht. Im Unterschied zu dem klassischen,

mesenchymalen Typ der Zellmigration, bei der es zu perizellulärer Proteolyse und Rac-vermittelter Reorganisation des Aktinzytoskeletts kommt, ist die Zellmigration vom amöboiden Typ abhängig von ROCK-1 (Sahai und Marshall, 2003; Wolf et al., 2003). Neben Caspase-8 war die in dieser Arbeit gefundene Änderung der Zellmorphologie auch von ROCK-1 abhängig (Abbildungen 32-34). Die Konstellation dieser Befunde eröffnet die Möglichkeit einer Todesrezeptor-induzierten, von enzymatisch-aktiver Caspase-8 abhängigen, amöboiden Zellmigration.

Eine aktivierende Spaltung von ROCK-1 durch Effektorcaspasen im Zuge der Apoptose wurde bereits in früheren Studien nachgewiesen (Coleman et al., 2001; Sebbagh et al., 2001). HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen zeigen jedoch nach FasL- oder TRAIL-Stimulation keine vollständige Prozessierung von Caspase-3, der Prozess stoppt stattdessen auf einer IAP-inhibierten intermediären Stufe, die durch das Fragment p19 gekennzeichnet ist. Die einzige in unseren Untersuchungen vollständig aktivierte Caspase in diesem Zellsystem war daher Caspase-8 (Abbildung 12). In Übereinstimmung mit der Hypothese, dass Fas und die TRAIL-Todesrezeptoren den Übergang hin zu einer amöboid-abgerundeten Zellmorphologie über eine Caspase-8 vermittelte Aktivierung von ROCK-1 induzieren, zeigte sich, dass durch Inhibition von Caspase-3 keine signifikante Verminderung der amöboiden Zellformen gefunden wurde (Abbildung 39). Darüber hinaus waren keine Unterschiede in der FasL- oder TRAIL-induzierten Prozessierung von ROCK-1 in HCT116 *PIK3CA*-wt und HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen zu finden (Abbildung 36), welche zwar beide eine ähnliche Aktivierung von Caspase-8 zeigen, jedoch deutlich unterschiedliche Aktivität von Effektorcaspasen aufweisen. Die Voraussetzung für die amöboide Zellmigration, die aktivierende Spaltung von ROCK-1, sind somit in nicht-apoptotischen TRAIL-/FasL-stimulierten HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen erfüllt.

Hypothetisch ergibt sich so, neben der bereits in der Literatur beschriebenen, Rac-vermittelten und von Caspaseaktivität unabhängigen invasionsfördernden Wirkung der Todesrezeptoren, ein weiterer Mechanismus: am DISC aktivierte Caspase-8 spaltet und aktiviert ROCK-1, was den amöboiden Typ der Zellmigration ermöglicht. Abhängig von Zelltyp, Situation und Angriffspunkt des Resistenzmechanismus gegen Apoptose, können so zwei unterschiedliche Typen der Zellmigration, der mesenchymale und der amöboide Typ, in Gang gesetzt werden. Kürzlich wurde über eine reziproke Regulation dieser beiden Migrationstypen in der Literatur berichtet (Sanz-Moreno et al., 2008). Aktives Rac inhibiert die Phosphorylierung von MLC2 (myosin light chain 2), was einen wichtigen, in der Kaskade unterhalb von ROCK-1 gelegenen, Schritt in der amöboiden Migration darstellt. ROCK-1 seinerseits inhibiert Rac und damit die mesenchymale Zellmigration über die Stimulation von ARHGAP22 (Rho GTPase activating protein 22) (Sanz-Moreno et al., 2008). Angesichts dieser

gegenseitigen Regulation der amöboiden und mesenchymalen Zellmigration kommt dem Mechanismus, der die Zellen vor Fas- oder TRAIL-Todesrezeptor-vermittelter Apoptose schützt, möglicherweise eine Schlüsselrolle zu. So könnte die Aktivierung von Fas oder TRAILR1/TRAILR2 in Zellen die durch Inhibition der Caspase-8 Aktivierung protektiert sind zu einem mesenchymalen Typ der Zellmigration führen, während es bei Schutzmechanismen unterhalb der Caspase-8 Aktivierung zu einem ROCK-1-abhängigen, amöboiden Typ der Zellmigration kommen könnte. Die in dieser Arbeit verwendeten HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen zeigten nach Todesrezeptorstimulation noch immer die Ausbildung eines DISC sowie die Aktivierung von Caspase-8 (Abbildung 10). Der Schutzmechanismus gegen Apoptose lag somit unterhalb dieser initialen Ergebnisse, wodurch auch die ligandeninduzierte, amöboide Änderung der Zellmorphologie erklärt werden könnte. Passend hierzu konnte in dieser Arbeit weiter gezeigt werden, dass durch die ektopre Überexpression von cFLIP_S nicht nur die Caspase-8 Aktivierung in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen inhibiert war (Abbildung 41), sondern auch das Auftreten amöboid-abgerundeter Zellformen nach FasL- oder TRAIL-Behandlung (Abbildung 42). Potentiell ist FLIP somit in der Lage, den amöboiden, Caspase-8 abhängigen Typ der Zellmigration zu verhindern. In Tumorzellen, die Resistenz gegenüber Todesrezeptor-induzierter Apoptose bei erhaltener Caspase-8 Aktivierung zeigen und so die Voraussetzungen für amöboide Migration erfüllen, ist der Effekt von FLIP antitumoral. Bislang wurden wegen der antiapoptotischen Wirkung von FLIP mehrheitlich protumorale Effekte des Moleküls beschrieben.

Der Effekt von TRAIL und FasL auf apoptoseresistente Zellen hinsichtlich der Zellmotilität wird möglicherweise noch über die Rac- und ROCK-1-unabhängige Aktivierung des NF κ B-Signalweges moduliert, da dieser eine Vielzahl für Zellmigration und -invasion relevante Gene kontrolliert (Anhang 9.4).

6 Zusammenfassung

Die Todesrezeptoren Fas, TRAILR1 und TRAILR2 werden seit einigen Jahren aufgrund ihrer Fähigkeit, Apoptose zu induzieren, als therapeutisch interessantes Ziel bei der Therapie maligner Tumoren angesehen. Gleichzeitig werden immer mehr Entitäten von Tumoren beschrieben, die eine Resistenz gegen die Todesrezeptor-induzierte Apoptose aufweisen. In dieser Konstellation können neben den blockierten proapoptotischen Signalen insbesondere auch Todesrezeptor-assoziierte, protumoral wirksame Signalwege sichtbar werden, die unter anderen Umständen durch die Apoptose maskiert werden.

In dieser Arbeit wurde die von FasL- und TRAIL-induzierte Signaltransduktion in einer apoptoseresistenten Variante der kolorektalen Karzinomzelllinie HCT116 untersucht. Eine aktivierende Mutation des *PIK3CA*-Gens protektiert diese Zellen aufgrund der konstitutiven Aktivierung des onkogenen PI3K/Akt-Signalweges gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose. Durch Vergleich isogener Zelllinien, welche für den *PIK3CA*-Locus funktionell haploid waren und entweder ein Wildtyp oder ein mutiertes Allel trugen, konnte die Signaltransduktion von Fas und der TRAIL-Todesrezeptoren in apoptoseresistenten Tumorzellen, sowie deren Zusammenspiel mit dem PI3K/Akt-Signalweg im Detail untersucht werden.

So wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass nach Stimulation der HCT116 *PIK3CA*-mut protektierten Zellen mit FasL oder TRAIL die initialen Schritte der Apoptoseinduktion durch Todesrezeptoren bis hin zur Bildung des DISC und der Aktivierung von Caspase-8 ungestört vonstatten gehen. Der durch die *PIK3CA*-Mutation induzierte Schutzmechanismus muss deshalb unterhalb dieser frühen apoptoseinduzierenden Ereignisse wirksam werden. Darüber hinaus zeigte sich, dass Todesliganden in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen den proinflammatorischen NF κ B-Signalweg aktivieren, wohingegen dieser Signalweg in HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen durch die ablaufende Apoptose inhibiert wurde.

Während HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen nach Stimulation von Fas oder den TRAIL-Todesrezeptoren morphologisch die klassischen Anzeichen des apoptotischen Zelltods zeigten, veränderten die HCT116 *PIK3CA*-mut protektierten Zellen ihre Morphologie von einer mesenchymal-länglichen hin zu einer amöboid-abgerundeten Form, die Zellen blieben jedoch vital. Die Änderung der Zellmorphologie konnte mit dem Vorhandensein enzymatisch aktiver Caspase-8 verknüpft werden, generiert durch den Todesrezeptor-assoziierten DISC. Caspase-8 vermittelte die Reorganisation des Aktinzytoskeletts durch Spaltung und der damit einhergehenden Aktivierung von ROCK-1. Blockade der Caspase-8 Aktivierung in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen durch pharmakologische Inhibitoren oder ektope Überexpression von cFLIP_S verhinderte entsprechend den FasL- oder TRAIL-induzierten Übergang zur

amöboid-abgerundeten Zellform. Funktionell zeigten die amöboid-abgerundeten HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen im Vergleich zu unstimulierten HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen eine erhöhte Invasivität, was anhand erhöhter Spiegel an Urokinase im Überstand nachgewiesen werden konnte.

Diese Arbeit beschreibt mit der Induktion einer amöboid-abgerundeten Zellmorphologie erstmals eine nicht-apoptotische Funktion von Caspase-8 im Kontext der Todesrezeptor-Signaltransduktion, die von der enzymatischen Aktivität abhängig ist. Weiterhin konnte ROCK-1 als Caspase-8 Substrat identifiziert werden. Ob durch die Aktivierung von ROCK-1 und die Reorganisation des Aktinzytoskeletts neben der Ausbildung einer amöboiden Zellmorphologie auch der amöboide Typ der Zellmigration in Gang gesetzt wird, müssen zukünftige Studien zeigen.

7 Summary

During the last years, the death receptors Fas, TRAILR1 and TRAILR2 emerged as promising therapeutic targets in cancer therapy. On the contrary, the number of tumor entities showing resistance against death receptor-induced apoptosis is still rising, thereby limiting the effectiveness of a therapeutic approach. Furthermore, under conditions where death receptor-induced apoptosis is blocked, cell death induction is not the only signal emanating from Fas and TRAIL death receptors. Non-apoptotic and even tumor-promoting signaling pathways may become apparent which are otherwise masked by ongoing apoptosis.

This study provides insight in FasL- and TRAIL-induced signaling in an apoptosis resistant variant of HCT116 colorectal cancer cells. An activating mutation in the *PIK3CA* gene protected these cells against death receptor-induced apoptosis by constitutive activation of the oncogenic PI3K/Akt pathway. Comparing isogenic cell lines either harboring a *PIK3CA* wild-type allele or an activating mutated allele allowed investigation of signal transduction events associated with Fas and TRAIL death receptors in apoptosis resistant cells as well as their interplay with the PI3K/Akt signaling pathway.

Upon stimulation with FasL or TRAIL, *PIK3CA*-mut protected HCT116 cells were still capable of initiating the first steps of apoptosis induction as was evident from DISC-formation and activating caspase-8. This indicated that the *PIK3CA*-mut-granted blocking of the apoptotic program must act downstream of these early events. Furthermore, the proinflammatory NF κ B pathway was turned on, as demonstrated by the phosphorylation of crucial signaling components and the enhanced expression of NF κ B controlled target genes. Activation of the NF κ B pathway, however, was masked in HCT116 *PIK3CA*-wt cells by ongoing apoptosis.

After stimulation of Fas or TRAIL death receptors, HCT116 *PIK3CA*-wt cells exhibited classical morphological apoptotic features. Interestingly, stimulation of HCT116 *PIK3CA*-mut cells induced transition to an amoeboid-like morphology without affecting the viability. The changes in cellular morphology were crucially dependent on enzymatically active caspase-8 generated at the DISC. Caspase-8 cleaved and thereby activated ROCK-1, a key player in reorganisation of the actin cytoskeleton. Interfering with caspase-8 activation by ectopic expression of cFLIP_S or pharmacological inhibitors abrogated the changes in cellular morphology. Additionally, HCT116 *PIK3CA*-mut cells showed upon FasL- or TRAIL-treatment increased invasiveness, demonstrated by elevated levels of urokinase in the supernatant of the cells.

To date, the FasL- or TRAIL-induced transition of HCT116 *PIK3CA*-mut cells to an amoeboid-like cellular morphology is the first clearly demonstrated non-apoptotic

function of caspase-8 in context of death receptor signaling, that is dependent on the enzymatic activity of the molecule. Furthermore, this study identifies ROCK-1 as a novel substrate of caspase-8. Further investigations will have to clarify the role of caspase-8 mediated activation of ROCK-1 and accompanied reorganization of the actin cytoskeleton with respect to the induction of the amoeboid-type of cell migration.

8 Literaturverzeichnis

1. Aderka, D. (1996). The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 231-240.
2. Agarwal, A., Das, K., Lerner, N., Sathe, S., Cicek, M., Casey, G., and Sizemore, N. (2005). The AKT/I kappa B kinase pathway promotes angiogenic/metastatic gene expression in colorectal cancer by activating nuclear factor-kappa B and beta-catenin. *Oncogene* 24, 1021-1031.
3. Algeciras-Schimnich, A., Shen, L., Barnhart, B.C., Murmann, A.E., Burkhardt, J.K., and Peter, M.E. (2002). Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* 22, 207-220.
4. Almasan, A., and Ashkenazi, A. (2003). Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 337-348.
5. Aoki, K., Kurooka, M., Chen, J.J., Petryniak, J., Nabel, E.G., and Nabel, G.J. (2001). Extracellular matrix interacts with soluble CD95L: retention and enhancement of cytotoxicity. *Nat Immunol* 2, 333-337.
6. Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2, 420-430.
7. Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
8. Bachelder, R.E., Wendt, M.A., Fujita, N., Tsuruo, T., and Mercurio, A.M. (2001). The cleavage of Akt/protein kinase B by death receptor signaling is an important event in detachment-induced apoptosis. *J Biol Chem* 276, 34702-34707.
9. Backes, C., Kuentzer, J., Lenhof, H.P., Comtesse, N., and Meese, E. (2005). GraBCas: a bioinformatics tool for score-based prediction of Caspase- and Granzyme B-cleavage sites in protein sequences. *Nucleic Acids Res* 33, W208-213.
10. Badorff, C., Ruetten, H., Mueller, S., Stahmer, M., Gehring, D., Jung, F., Ihling, C., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2002). Fas receptor signaling inhibits glycogen synthase kinase 3 beta and induces cardiac hypertrophy following pressure overload. *J Clin Invest* 109, 373-381.
11. Balkwill, F. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 9, 361-371.

12. Banner, D.W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H.J., Broger, C., Loetscher, H., and Lesslauer, W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73, 431-445.
13. Barbero, S., Mielgo, A., Torres, V., Teitz, T., Shields, D.J., Mikolon, D., Bogyo, M., Barila, D., Lahti, J.M., Schlaepfer, D., and Stupack, D.G. (2009). Caspase-8 association with the focal adhesion complex promotes tumor cell migration and metastasis. *Cancer Res* 69, 3755-3763.
14. Barnhart, B.C., Alappat, E.C., and Peter, M.E. (2003). The CD95 type I/type II model. *Semin.Immunol* 15, 185-193.
15. Beisner, D.R., Chu, I.H., Arechiga, A.F., Hedrick, S.M., and Walsh, C.M. (2003). The Requirements for Fas-Associated Death Domain Signaling in Mature T Cell Activation and Survival. *The Journal of Immunology* 171, 247-256.
16. Bennett, M.W., O'Connell, J., O'Sullivan, G.C., Brady, C., Roche, D., Collins, J.K., and Shanahan, F. (1998). The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *The Journal of Immunology* 160, 5669-5675.
17. Berghe, T.V., van Loo, G., Saelens, X., van Gurp, M., Brouckaert, G., Kalai, M., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2004). Differential Signaling to Apoptotic and Necrotic Cell Death by Fas-associated Death Domain Protein FADD. *Journal of Biological Chemistry* 279, 7925-7933.
18. Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R., and Salvesen, G.S. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 11, 529-541.
19. Bodmer, J.L., Meier, P., Tschopp, J., and Schneider, P. (2000). Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 275, 20632-20637.
20. Bodmer, J.L., Schneider, P., and Tschopp, J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem.Sci.* 27, 19-26.
21. Broker, L.E., Kruyt, F.A., and Giaccone, G. (2005). Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 11, 3155-3162.
22. Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.

-
23. Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406, 855-862.
 24. Chan, F.K. (2007). Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. *Cytokine* 37, 101-107.
 25. Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L., and Lenardo, M.J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288, 2351-2354.
 26. Chan, T.O., Rittenhouse, S.E., and Tsichlis, P.N. (1999). AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem* 68, 965-1014.
 27. Cheng, J., Liu, C., Koopman, W.J., and Mountz, J.D. (1995). Characterization of human Fas gene. Exon/intron organization and promoter region. *The Journal of Immunology* 154, 1239-1245.
 28. Cheung, H.H., Plenchette, S., Kern, C.J., Mahoney, D.J., and Korneluk, R.G. (2008). The RING domain of cIAP1 mediates the degradation of RING-bearing inhibitor of apoptosis proteins by distinct pathways. *Mol Biol Cell* 19, 2729-2740.
 29. Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 18, 157-164.
 30. Choi, Y.E., Butterworth, M., Malladi, S., Duckett, C.S., Cohen, G.M., and Bratton, S.B. (2009). The E3 Ubiquitin Ligase cIAP1 Binds and Ubiquitinates Caspase-3 and -7 via Unique Mechanisms at Distinct Steps in Their Processing. *J Biol Chem* 284, 12772-12782.
 31. Cohen, P.L., and Eisenberg, R.A. (1991). Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu.Rev Immunol* 9, 243-269.
 32. Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., and Olson, M.F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 3, 339-345.
 33. Cretney, E., McQualter, J.L., Kayagaki, N., Yagita, H., Bernard, C.C., Grewal, I.S., Ashkenazi, A., and Smyth, M.J. (2005). TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Immunol Cell Biol* 83, 511-519.
 34. Croft, M. (2009). The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol* 9, 271-285.
-

-
35. Dan, H.C., Sun, M., Kaneko, S., Feldman, R.I., Nicosia, S.V., Wang, H.G., Tsang, B.K., and Cheng, J.Q. (2004). Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J Biol Chem* 279, 5405-5412.
 36. De Toni, E.N., Thieme, S.E., Herbst, A., Behrens, A., Stieber, P., Jung, A., Blum, H., Goke, B., and Kolligs, F.T. (2008). OPG is regulated by beta-catenin and mediates resistance to TRAIL-induced apoptosis in colon cancer. *Clin Cancer Res* 14, 4713-4718.
 37. Degli-Esposti, M.A., Dougall, W.C., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Smith, C.A., and Goodwin, R.G. (1997a). The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7, 813-820.
 38. Degli-Esposti, M.A., Smolak, P.J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C.P., DuBose, R.F., Goodwin, R.G., and Smith, C.A. (1997b). Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 186, 1165-1170.
 39. Degtarev, A., Hitomi, J., Germscheid, M., Ch'en, I.L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G.D., Yuan, C., Wagner, G., *et al.* (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* 4, 313-321.
 40. Ehrenschwender, M., and Wajant, H. (2009). The Role of FasL and Fas in Health and Disease. In *Therapeutic Targets of the TNF-superfamily* I.S. Grewal, ed. (Springer), pp. 64-93.
 41. Ehrhardt, H., Fulda, S., Schmid, I., Hiscott, J., Debatin, K.M., and Jeremias, I. (2003). TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB. *Oncogene* 22, 3842-3852.
 42. Ehrlich, S., Infante-Duarte, C., Seeger, B., and Zipp, F. (2003). Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes. *Cytokine* 24, 244-253.
 43. Eramo, A., Sargiacomo, M., Ricci-Vitiani, L., Todaro, M., Stassi, G., Messina, C.G., Parolini, I., Lotti, F., Sette, G., Peschle, C., and De Maria, R. (2004). CD95 death-inducing signaling complex formation and internalization occur in lipid rafts of type I and type II cells. *Eur.J Immunol* 34, 1930-1940.
 44. Fennell, D.A., Chacko, A., and Mutti, L. (2008). BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib. *Oncogene* 27, 1189-1197.
 45. Festjens, N., Vanden Berghe, T., Cornelis, S., and Vandenberghe, P. (2007). RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death Differ* 14, 400-410.
-

-
46. Finlay, D., and Vuori, K. (2007). Novel noncatalytic role for caspase-8 in promoting SRC-mediated adhesion and Erk signaling in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 67, 11704-11711.
 47. Franke, T.F. (2008). PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27, 6473-6488.
 48. Fu, Y.X., and Chaplin, D.D. (1999). Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol* 17, 399-433.
 49. Garton, K.J., Gough, P.J., and Raines, E.W. (2006). Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses. *J Leukoc Biol* 79, 1105-1116.
 50. Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P.H., and Lavrik, I.N. (2005). c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280, 14507-14513.
 51. Green, D.R., Droin, N., and Pinkoski, M. (2003). Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 193, 70-81.
 52. Gruss, H.J., and Dower, S.K. (1995). Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 85, 3378-3404.
 53. Guo, X.N., Rajput, A., Rose, R., Hauser, J., Beko, A., Kuropatwinski, K., LeVea, C., Hoffman, R.M., Brattain, M.G., and Wang, J. (2007). Mutant PIK3CA-bearing colon cancer cells display increased metastasis in an orthotopic model. *Cancer Res* 67, 5851-5858.
 54. Halaas, O., Vik, R., Ashkenazi, A., and Espevik, T. (2000). Lipopolysaccharide induces expression of APO2 ligand/TRAIL in human monocytes and macrophages. *Scand J Immunol* 51, 244-250.
 55. Helfer, B., Boswell, B.C., Finlay, D., Cipres, A., Vuori, K., Bong Kang, T., Wallach, D., Dorfleutner, A., Lahti, J.M., Flynn, D.C., and Frisch, S.M. (2006). Caspase-8 promotes cell motility and calpain activity under nonapoptotic conditions. *Cancer Res* 66, 4273-4278.
 56. Hinds, M.G., Norton, R.S., Vaux, D.L., and Day, C.L. (1999). Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nat Struct Biol* 6, 648-651.
 57. Hinz, S., Trauzold, A., Boenicke, L., Sandberg, C., Beckmann, S., Bayer, E., Walczak, H., Kalthoff, H., and Ungefroren, H. (2000). Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene* 19, 5477-5486.

-
58. Hirata, R., Chamberlain, J., Dong, R., and Russell, D.W. (2002). Targeted transgene insertion into human chromosomes by adeno-associated virus vectors. *Nat Biotechnol* 20, 735-738.
 59. Holcik, M., and Korneluk, R.G. (2001). XIAP, the guardian angel. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 550-556.
 60. Holler, N., Tardivel, A., Kovacsovics-Bankowski, M., Hertig, S., Gaide, O., Martinon, F., Tinel, A., Deperthes, D., Calderara, S., Schulthess, T., *et al.* (2003). Two Adjacent Trimeric Fas Ligands Are Required for Fas Signaling and Formation of a Death-Inducing Signaling Complex. *Molecular and Cellular Biology* 23, 1428-1440.
 61. Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B., and Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1, 489-495.
 62. Horak, P., Pils, D., Kaider, A., Pinter, A., Elandt, K., Sax, C., Zielinski, C.C., Horvat, R., Zeillinger, R., Reinthaller, A., and Krainer, M. (2005). Perturbation of the tumor necrosis factor--related apoptosis-inducing ligand cascade in ovarian cancer: overexpression of FLIPL and deregulation of the functional receptors DR4 and DR5. *Clin Cancer Res* 11, 8585-8591.
 63. Hornstein, M., Hoffmann, M.J., Alexa, A., Yamanaka, M., Muller, M., Jung, V., Rahnenfuhrer, J., and Schulz, W.A. (2008). Protein phosphatase and TRAIL receptor genes as new candidate tumor genes on chromosome 8p in prostate cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 5, 123-136.
 64. Hu, W.H., Johnson, H., and Shu, H.B. (2000). Activation of NF-kappaB by FADD, Casper, and caspase-8. *J Biol Chem* 275, 10838-10844.
 65. Hymowitz, S.G., O'Connell, M.P., Ultsch, M.H., Hurst, A., Totpal, K., Ashkenazi, A., de Vos, A.M., and Kelley, R.F. (2000). A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry* 39, 633-640.
 66. Imamura, R., Konaka, K., Matsumoto, N., Hasegawa, M., Fukui, M., Mukaida, N., Kinoshita, T., and Suda, T. (2004). Fas ligand induces cell-autonomous NF-kappaB activation and interleukin-8 production by a mechanism distinct from that of tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 279, 46415-46423.
 67. Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.

-
68. Ishimura, N., Isomoto, H., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (2006). Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, G129-136.
 69. Janssen, O., Qian, J., Linkermann, A., and Kabelitz, D. (2003). CD95 ligand--death factor and costimulatory molecule? *Cell Death Differ* 10, 1215-1225.
 70. Johnstone, R.W., Frew, A.J., and Smyth, M.J. (2008). The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer* 8, 782-798.
 71. Karakas, B., Bachman, K.E., and Park, B.H. (2006). Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *Br J Cancer* 94, 455-459.
 72. Kelley, S.K., and Ashkenazi, A. (2004). Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL. *Curr Opin Pharmacol* 4, 333-339.
 73. Kimberley, F.C., and Screaton, G.R. (2004). Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res* 14, 359-372.
 74. Kinoshita, T., Fujita, M., and Maeda, Y. (2008). Biosynthesis, remodelling and functions of mammalian GPI-anchored proteins: recent progress. *J Biochem* 144, 287-294.
 75. Kleber, S., Sancho-Martinez, I., Wiestler, B., Beisel, A., Gieffers, C., Hill, O., Thiemann, M., Mueller, W., Sykora, J., Kuhn, A., *et al.* (2008). Yes and PI3K bind CD95 to signal invasion of glioblastoma. *Cancer Cell* 13, 235-248.
 76. Kohli, M., Rago, C., Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (2004). Facile methods for generating human somatic cell gene knockouts using recombinant adeno-associated viruses. *Nucleic Acids Res* 32, e3.
 77. Kreuz, S., Siegmund, D., Rumpf, J.J., Samel, D., Leverkus, M., Janssen, O., Hacker, G., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Scheurich, P., and Wajant, H. (2004). NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *J Cell Biol* 166, 369-380.
 78. Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P.H., and Kirchhoff, S. (2001). Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 276, 20633-20640.
 79. LaCasse, E.C., Mahoney, D.J., Cheung, H.H., Plenchette, S., Baird, S., and Korneluk, R.G. (2008). IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 27, 6252-6275.

-
80. Lahm, A., Paradisi, A., Green, D.R., and Melino, G. (2003). Death fold domain interaction in apoptosis. *Cell Death Differ* 10, 10-12.
 81. Lamhamedi-Cherradi, S.E., Zheng, S.J., Maguschak, K.A., Peschon, J., and Chen, Y.H. (2003). Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice. *Nat Immunol* 4, 255-260.
 82. Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Berghe, T.V., and Vandenabeele, P. (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death.Differ.* 14, 44-55.
 83. Lawrence, D., Shahrokh, Z., Marsters, S., Achilles, K., Shih, D., Mounho, B., Hillan, K., Totpal, K., DeForge, L., Schow, P., *et al.* (2001). Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* 7, 383-385.
 84. LeBlanc, H.N., and Ashkenazi, A. (2003). Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 10, 66-75.
 85. Lee, K.H., Feig, C., Tchikov, V., Schickel, R., Hallas, C., Schutze, S., Peter, M.E., and Chan, A.C. (2006). The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J* 25, 1009-1023.
 86. Legembre, P., Daburon, S., Moreau, P., Moreau, J.F., and Taupin, J.L. (2006). Cutting Edge: Modulation of Fas-Mediated Apoptosis by Lipid Rafts in T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 176, 716-720.
 87. Lessene, G., Czabotar, P.E., and Colman, P.M. (2008). BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 7, 989-1000.
 88. Liu, F.T., Agrawal, S.G., Gribben, J.G., Ye, H., Du, M.Q., Newland, A.C., and Jia, L. (2008). Bortezomib blocks Bax degradation in malignant B cells during treatment with TRAIL. *Blood* 111, 2797-2805.
 89. Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
 90. Mackay, F., Woodcock, S.A., Lawton, P., Ambrose, C., Baetscher, M., Schneider, P., Tschopp, J., and Browning, J.L. (1999). Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med* 190, 1697-1710.
 91. Makhov, P., Golovine, K., Uzzo, R.G., Rothman, J., Crispen, P.L., Shaw, T., Scoll, B.J., and Kolenko, V.M. (2008). Zinc chelation induces rapid depletion of the X-linked inhibitor of apoptosis and sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 15, 1745-1751.

-
92. Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
 93. Martin, S.J. (2001). Dealing the CARDs between life and death. *Trends Cell Biol* 11, 188-189.
 94. Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D.W., Briand, C., and Grutter, M.G. (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 277, 45162-45171.
 95. Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181-190.
 96. Mitsiades, N., Yu, W.H., Poulaki, V., Tsokos, M., and Stamenkovic, I. (2001). Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Research* 61, 577-581.
 97. Mongkolsapaya, J., Cowper, A.E., Xu, X.N., Morris, G., McMichael, A.J., Bell, J.I., and Screaton, G.R. (1998). Lymphocyte inhibitor of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand): a new receptor protecting lymphocytes from the death ligand TRAIL. *J Immunol* 160, 3-6.
 98. Mongkolsapaya, J., Grimes, J.M., Chen, N., Xu, X.N., Stuart, D.I., Jones, E.Y., and Screaton, G.R. (1999). Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nat Struct Biol* 6, 1048-1053.
 99. Morel, J., Audo, R., Hahne, M., and Combe, B. (2005). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation through mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J Biol Chem* 280, 15709-15718.
 100. Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., *et al.* (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.
 101. Narumiya, S., Tanji, M., and Ishizaki, T. (2009). Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28, 65-76.
 102. Ndozangue-Touriguine, O., Sebbagh, M., Merino, D., Micheau, O., Bertoglio, J., and Breard, J. (2008). A mitochondrial block and expression of XIAP lead to resistance to TRAIL-induced apoptosis during progression to metastasis of a colon carcinoma. *Oncogene* 27, 6012-6022.

103. Newsom-Davis, T., Prieske, S., and Walczak, H. (2009). Is TRAIL the holy grail of cancer therapy? *Apoptosis* 14, 607-623.
104. Okada, K., Komuta, K., Hashimoto, S., Matsuzaki, S., Kanematsu, T., and Koji, T. (2000). Frequency of apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes induced by fas counterattack in human colorectal carcinoma and its correlation with prognosis. *Clinical Cancer Research* 6, 3560-3564.
105. Orlinick, J.R., Elkon, K.B., and Chao, M.V. (1997a). Separate Domains of the Human Fas Ligand Dictate Self-association and Receptor Binding. *Journal of Biological Chemistry* 272, 32221-32229.
106. Orlinick, J.R., Vaishnav, A., Elkon, K.B., and Chao, M.V. (1997b). Requirement of cysteine-rich repeats of the Fas receptor for binding by the Fas ligand. *J Biol Chem.* 272, 28889-28894.
107. Ottonello, L., Tortolina, G., Amelotti, M., and Dallegri, F. (1999). Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of Immunology* 162, 3601-3606.
108. Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A.M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., and Dixit, V.M. (1997). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276, 111-113.
109. Panka, D.J., Mano, T., Suhara, T., Walsh, K., and Mier, J.W. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. *J Biol Chem* 276, 6893-6896.
110. Papakonstanti, E.A., and Stournaras, C. (2008). Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 582, 2120-2127.
111. Peter, M.E., Budd, R.C., Desbarats, J., Hedrick, S.M., Hueber, A.O., Newell, M.K., Owen, L.B., Pope, R.M., Tschopp, J., Wajant, H., *et al.* (2007). The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell* 129, 447-450.
112. Pitti, R.M., Marsters, S.A., Ruppert, S., Donahue, C.J., Moore, A., and 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.
113. Russo, A., Fratto, M.E., Bazan, V., Schiro, V., Agnese, V., Cicero, G., Vincenzi, B., Tonini, G., and Santini, D. (2007). Targeting apoptosis in solid tumors: the role of bortezomib from preclinical to clinical evidence. *Expert Opin Ther Targets* 11, 1571-1586.
114. Sahai, E., and Marshall, C.J. (2003). Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 5, 711-719.

-
115. Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 96, 10964-10967.
 116. Salvesen, G.S., and Duckett, C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 401-410.
 117. Samel, D., Muller, D., Gerspach, J., Assouhou-Luty, C., Sass, G., Tiegs, G., Pfizenmaier, K., and Wajant, H. (2003). Generation of a FasL-based proapoptotic fusion protein devoid of systemic toxicity due to cell-surface antigen-restricted Activation. *J Biol Chem.* 278, 32077-32082.
 118. Samuels, Y., Diaz, Jr., Schmidt-Kittler, O., Cummins, J.M., DeLong, L., Cheong, I., Rago, C., Huso, D.L., Lengauer, C., Kinzler, K.W., *et al.* (2005). Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 7, 561-573.
 119. Samuels, Y., and Ericson, K. (2006). Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol* 18, 77-82.
 120. Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Sahai, E., and Marshall, C.J. (2008). Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 135, 510-523.
 121. Sato, K., Hida, S., Takayanagi, H., Yokochi, T., Kayagaki, N., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K., Tanaka, N., Taniguchi, T., and Ogasawara, K. (2001). Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur J Immunol* 31, 3138-3146.
 122. Schneider, P., Holler, N., Bodmer, J.L., Hahne, M., Frei, K., Fontana, A., and Tschopp, J. (1998). Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp.Med* 187, 1205-1213.
 123. Schutze, S., Tchikov, V., and Schneider-Brachert, W. (2008). Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* *advanced online publication*.
 124. Screaton, G.R., Mongkolsapaya, J., Xu, X.N., Cowper, A.E., McMichael, A.J., and Bell, J.I. (1997). TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr Biol* 7, 693-696.
 125. Sebbagh, M., Renvoize, C., Hamelin, J., Riche, N., Bertoglio, J., and Breard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 3, 346-352.

-
126. Secchiero, P., Gonelli, A., Carnevale, E., Milani, D., Pandolfi, A., Zella, D., and Zauli, G. (2003). TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways. *Circulation* 107, 2250-2256.
 127. Secchiero, P., Zerbinati, C., Rimondi, E., Corallini, F., Milani, D., Grill, V., Forti, G., Capitani, S., and Zauli, G. (2004). TRAIL promotes the survival, migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cell Mol Life Sci* 61, 1965-1974.
 128. Seino, K., Kayagaki, N., Okumura, K., and Yagita, H. (1997). Antitumor effect of locally produced CD95 ligand. *Nat Med* 3, 165-170.
 129. Senft, J., Helfer, B., and Frisch, S.M. (2007). Caspase-8 interacts with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase to regulate cell adhesion and motility. *Cancer Res* 67, 11505-11509.
 130. Sethi, G., Sung, B., and Aggarwal, B.B. (2008). TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci* 13, 5094-5107.
 131. Shudo, K., Kinoshita, K., Imamura, R., Fan, H., Hasumoto, K., Tanaka, M., Nagata, S., and Suda, T. (2001). The membrane-bound but not the soluble form of human Fas ligand is responsible for its inflammatory activity. *Eur.J Immunol* 31, 2504-2511.
 132. Siegel, R.M., Frederiksen, J.K., Zacharias, D.A., Chan, F.K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R.Y., and Lenardo, M.J. (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288, 2354-2357.
 133. Siegel, R.M., Muppidi, J.R., Sarker, M., Lobito, A., Jen, M., Martin, D., Straus, S.E., and Lenardo, M.J. (2004). SPOTS: signaling protein oligomeric transduction structures are early mediators of death receptor-induced apoptosis at the plasma membrane. *J Cell Biol* 167, 735-744.
 134. Siegmund, D., Klose, S., Zhou, D., Baumann, B., Roder, C., Kalthoff, H., Wajant, H., and Trauzold, A. (2007). Role of caspases in CD95L- and TRAIL-induced non-apoptotic signalling in pancreatic tumour cells. *Cell Signal*. .
 135. Siegmund, D., Wicovsky, A., Schmitz, I., Schulze-Osthoff, K., Kreuz, S., Leverkus, M., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., and Wajant, H. (2005). Death receptor-induced signaling pathways are differentially regulated by gamma interferon upstream of caspase 8 processing. *Mol Cell Biol* 25, 6363-6379.
 136. Silke, J., Kratina, T., Chu, D., Ekert, P.G., Day, C.L., Pakusch, M., Huang, D.C., and Vaux, D.L. (2005). Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16182-16187.
-

137. Smith, C.A., Farrah, T., and Goodwin, R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-962.
138. Starling, G.C., Bajorath, J., Emswiler, J., Ledbetter, J.A., Aruffo, A., and Kiener, P.A. (1997). Identification of amino acid residues important for ligand binding to Fas. *J Exp.Med* 185, 1487-1492.
139. Stennicke, H.R., Jurgensmeier, J.M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B.B., Yang, X., Zhou, Q., Ellerby, H.M., Ellerby, L.M., Bredesen, D., *et al.* (1998). Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem* 273, 27084-27090.
140. Stuart, P.M., Griffith, T.S., Usui, N., Pepose, J., Yu, X., and Ferguson, T.A. (1997). CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. *J Clin Invest* 99, 396-402.
141. Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., and Nagata, S. (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-1178.
142. Suhara, T., Mano, T., Oliveira, B.E., and Walsh, K. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling controls endothelial cell sensitivity to Fas-mediated apoptosis via regulation of FLICE-inhibitory protein (FLIP). *Circ Res* 89, 13-19.
143. Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., and 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 U S A* 98, 8662-8667.
144. Takahashi, T., Tanaka, M., Inazawa, J., Abe, T., Suda, T., and Nagata, S. (1994). Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int.Immunol* 6, 1567-1574.
145. Tanaka, M., Itai, T., Adachi, M., and Nagata, S. (1998). Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* 4, 31-36.
146. Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinl, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J.L., Schroter, M., *et al.* (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386, 517-521.
147. Toker, A., and Newton, A.C. (2000). Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* 103, 185-188.

148. Torres, V.A., Mielgo, A., Barila, D., Anderson, D.H., and Stupack, D. (2008). Caspase 8 promotes peripheral localization and activation of Rab5. *J Biol Chem* 283, 36280-36289.
149. Trauzold, A., Siegmund, D., Schniewind, B., Sipos, B., Egberts, J., Zorenkov, D., Emme, D., Roder, C., Kalthoff, H., and Wajant, H. (2006). TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 25, 7434-7439.
150. van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B., and Reutelingsperger, C.P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31, 1-9.
151. Varadhachary, A.S., Edidin, M., Hanlon, A.M., Peter, M.E., Krammer, P.H., and Salgame, P. (2001). Phosphatidylinositol 3'-Kinase Blocks CD95 Aggregation and Caspase-8 Cleavage at the Death-Inducing Signaling Complex by Modulating Lateral Diffusion of CD95. *The Journal of Immunology* 166, 6564-6569.
152. Varfolomeev, E., Maecker, H., Sharp, D., Lawrence, D., Renz, M., Vucic, D., and Ashkenazi, A. (2005). Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Biol Chem* 280, 40599-40608.
153. Varfolomeev, E., and Vucic, D. (2008). (Un)expected roles of c-IAPs in apoptotic and NFkappaB signaling pathways. *Cell Cycle* 7, 1511-1521.
154. Vaux, D.L., and Silke, J. (2003). Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 304, 499-504.
155. Voelkel-Johnson, C., King, D.L., and Norris, J.S. (2002). Resistance of prostate cancer cells to soluble TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L) can be overcome by doxorubicin or adenoviral delivery of full-length TRAIL. *Cancer Gene Ther* 9, 164-172.
156. Wajant, H. (2003). Programmed Cell Death: Chapter 5 Death receptors. *Essays Biochem.* 39, 53-71.
157. Wajant, H. (2004). TRAIL and NFkappaB signaling--a complex relationship. *Vitam Horm* 67, 101-132.
158. Wajant, H. (2006). CD95L/FasL and TRAIL in tumour surveillance and cancer therapy. *Cancer Treat.Res.* 130:141-65., 141-165.

159. Wajant, H., Haas, E., Schwenzler, R., Muhlenbeck, F., Kreuz, S., Schubert, G., Grell, M., Smith, C., and 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.
160. Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003). Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 53-66.
161. Walczak, H., Degli-Esposti, M.A., Johnson, R.S., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Timour, M.S., Gerhart, M.J., Schooley, K.A., Smith, C.A., *et al.* (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 16, 5386-5397.
162. Walczak, H., Miller, R.E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T.S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., *et al.* (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 5, 157-163.
163. Wallach, D., Engelmann, H., Nophar, Y., Aderka, D., Kemper, O., Hornik, V., Holtmann, H., and Brakebusch, C. (1991). Soluble and cell surface receptors for tumor necrosis factor. *Agents Actions Suppl* 35, 51-57.
164. Wang, L., Du, F., and Wang, X. (2008). TNF-[alpha] Induces Two Distinct Caspase-8 Activation Pathways. *Cell* 133, 693-703.
165. Waterhouse, N.J., Ricci, J.E., and Green, D.R. (2002). And all of a sudden it's over: mitochondrial outer-membrane permeabilization in apoptosis. *Biochimie* 84, 113-121.
166. Wenzel, J., Sanzenbacher, R., Ghadimi, M., Lewitzky, M., Zhou, Q., Kaplan, D.R., Kabelitz, D., Feller, S.M., and Janssen, O. (2001). Multiple interactions of the cytosolic polyproline region of the CD95 ligand: hints for the reverse signal transduction capacity of a death factor. *FEBS Lett.* 509, 255-262.
167. Wetzel, M., Li, L., Harms, K.M., Roitbak, T., Ventura, P.B., Rosenberg, G.A., Khokha, R., and Cunningham, L.A. (2007). Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 facilitates Fas-mediated neuronal cell death following mild ischemia. *Cell Death Differ* 15, 143-151.
168. Widmann, C., Gerwins, P., Johnson, N.L., Jarpe, M.B., and Johnson, G.L. (1998a). MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 18, 2416-2429.
169. Widmann, C., Gibson, S., and Johnson, G.L. (1998b). Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem* 273, 7141-7147.

-
170. Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A., and et al. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-682.
 171. Wilson, N.S., Dixit, V., and Ashkenazi, A. (2009). Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol* 10, 348-355.
 172. Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U.H., Deryugina, E.I., Strongin, A.Y., Brocker, E.B., and Friedl, P. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 160, 267-277.
 173. Yin, X.M. (2006). Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene* 369, 7-19.
 174. Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.
 175. Zauli, G., Sancilio, S., Cataldi, A., Sabatini, N., Bosco, D., and Di Pietro, R. (2005). PI-3K/Akt and NF-kappaB/IkappaBalpha pathways are activated in Jurkat T cells in response to TRAIL treatment. *J Cell Physiol* 202, 900-911.
 176. Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87, 619-628.
 177. Zhang, G. (2004). Tumor necrosis factor family ligand-receptor binding. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 14, 154-160.
 178. Zhang, J.H., and Xu, M. (2000). DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res* 10, 205-211.
 179. Zhang, L., Yu, J., Park, B.H., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (2000). Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* 290, 989-992.
 180. Zhao, L., and Vogt, P.K. (2008). Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* 27, 5486-5496.

9 Anhang

9.1 Hochregulierte Gengruppen in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen

Gengruppe	Gene	Beschreibung	Funktion
Zellmobilität	<i>JAG1</i> <i>LAMA2</i> <i>LAMB1</i>	Jagged 1 Laminin alpha 2 chain Laminin beta 1 chain	Ligand des Notch-Rezeptors Zellmigration, -kontakte, -organisation Zell-Matrix Kontakt, Basalmembran
Zellmigration	<i>JAG1</i> <i>IL8</i> <i>LAMA2</i> <i>LAMB1</i> <i>SPP1</i> <i>SCG2</i> <i>NRP1</i>	Jagged 1 Interleukin-8 Laminin alpha 2 chain Laminin beta 1 chain Secreted phosphoprotein 1 Sekretogranin 2 Neuropillin 1	Ligand des Notch-Rezeptors proinflammatorisches Chemokin Zellmigration, -kontakte, -organisation Zell-Matrix Kontakt, Basalmembran Zytokin, verstärkt IFN γ Produktion neuroendokrines Sekretionsprotein VEGF Korezeptor
Zellproliferation	<i>CDK6</i> <i>JAG1</i> <i>EDNRA</i> <i>FGF9</i> <i>CXCL1</i> <i>IL8</i> <i>LAMB1</i> <i>BCL2</i> <i>SPP1</i> <i>KLF10</i> <i>SCG2</i> <i>KLF11</i> <i>RERG</i> <i>NRP1</i>	Cyclin dependent kinase 6 Jagged 1 Endothelin receptor A Fibroblast growth factor 9 Chemokine ligand 1 Interleukin-8 Laminin beta 1 chain B-cell CLL/lymphoma 2 Secreted phosphoprotein 1 Kruppel-like factor 10 Sekretogranin 2 Kruppel-like factor 11 Ras-like estrogen regulated growth inhibitor Neuropillin 1	Zellzyklus G1 Phase, G1/S Übergang Ligand des Notch-Rezeptors G-Protein assoziiert, PI-Ca $^{2+}$ Signal mitogen, antiapoptotisch, Invasion mitogen, inflammatorisch proinflammatorisches Chemokin Zell-Matrix Kontakt, Basalmembran antiapoptotisch Zytokin, verstärkt IFN γ Produktion Transkriptionsrepressor neuroendokrines Sekretionsprotein Transkriptionsfaktor, proapoptotisch proliferationshemmend VEGF Korezeptor
Angiogenese	<i>JAG1</i> <i>IL8</i> <i>SCG2</i> <i>NRP1</i>	Jagged 1 Interleukin-8 Sekretogranin 2 Neuropillin 1	Ligand des Notch-Rezeptors proinflammatorisches Chemokin neuroendokrines Sekretionsprotein VEGF Korezeptor
Chemotaxis	<i>CXCL1</i> <i>CXCL2</i> <i>CXCL3</i> <i>IL8</i> <i>PTAFR</i> <i>SPP1</i> <i>SCG2</i>	Chemokine ligand 1 Chemokine ligand 2 Chemokine ligand 3 Interleukin-8 Platelet activating factor receptor Secreted phosphoprotein 1 Sekretogranin 2	mitogen, inflammatorisch Regulation der Hämatopoese inflammatorisch, chemotaktisch proinflammatorisches Chemokin G-Protein assoziiert, inflammatorisch Zytokin, verstärkt IFN γ Produktion neuroendokrines Sekretionsprotein
PI3K Regulation	<i>DAPP1</i> <i>PIK3R3</i>	Dual adaptor of phosphotyrosine an 3-phosphoinositides Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3	Umbau des Aktinzytoskeletts SH2-Domäne bindet und reguliert Tyrosinkinasen

9.2 Hochregulierte Gene in HCT116 *PIK3CA*-wt Zellen

Gennamen nach HUGO Gene Nomenclature Committee; alphabetisch sortiert:

<i>7A5</i>	<i>GALNT7</i>	<i>MEF2C</i>	<i>S100A10</i>
<i>AKR1C3</i>	<i>GBP2</i>	<i>MGAT5B</i>	<i>SCAP2</i>
<i>ALDH1A3</i>	<i>GGT1</i>	<i>MGLL</i>	<i>SDCBP2</i>
<i>ANKRD29</i>	<i>GGT2</i>	<i>MIA</i>	<i>SEMA3A</i>
<i>ANKRD43</i>	<i>GGTL4</i>	<i>MLSTD1</i>	<i>SEPP1</i>
<i>APC2</i>	<i>GGTLA4</i>	<i>MMP25</i>	<i>SHRM</i>
<i>AREG</i>	<i>GLIPR1</i>	<i>MMP7</i>	<i>SLAMF7</i>
<i>ARL14</i>	<i>GLIS3</i>	<i>MOSPD1</i>	<i>SLC12A2</i>
<i>ARSJ</i>	<i>GRAMD1C</i>	<i>MSRB3</i>	<i>SLC1A3</i>
<i>BACH2</i>	<i>GRAMD3</i>	<i>MSX2</i>	<i>SLC6A20</i>
<i>BCDO2</i>	<i>GULP1</i>	<i>MSX2P</i>	<i>SMAD6</i>
<i>BHLHB3</i>	<i>HOXA2</i>	<i>MYPN</i>	<i>SMAD7</i>
<i>BMF</i>	<i>HOXA3</i>	<i>NALP1</i>	<i>SQLE</i>
<i>BMI1</i>	<i>HOXA4</i>	<i>NALP5</i>	<i>SRPX2</i>
<i>BTBD11</i>	<i>HSPA2</i>	<i>NEDD4L</i>	<i>STARD13</i>
<i>CAMK1D</i>	<i>HSPD1</i>	<i>NOSTRIN</i>	<i>STX11</i>
<i>CAPN12</i>	<i>HTATIP2</i>	<i>NR2F1</i>	<i>SUHW1</i>
<i>CASP10</i>	<i>HYAL1</i>	<i>NTN4</i>	<i>SUNC1</i>
<i>CAV1</i>	<i>IGFBP6</i>	<i>OLFM1</i>	<i>SUSD2</i>
<i>CAV2</i>	<i>IL15</i>	<i>OLFML2A</i>	<i>SYTL2</i>
<i>CAV3</i>	<i>IL18</i>	<i>OPTN</i>	<i>SYTL5</i>
<i>CCL26</i>	<i>INHBB</i>	<i>OR51B2</i>	<i>TACSTD2</i>
<i>CDC42BPA</i>	<i>INPP4B</i>	<i>OSCAR</i>	<i>TCEA3</i>
<i>CHML</i>	<i>INSIG1</i>	<i>PDGFC</i>	<i>TCN1</i>
<i>CHST4</i>	<i>IRS2</i>	<i>PDLIM1</i>	<i>TES</i>
<i>CLIC3</i>	<i>ITGB8</i>	<i>PIP5K2A</i>	<i>TFAP2C</i>
<i>CLIC5</i>	<i>ITGBL1</i>	<i>PLEKHA7</i>	<i>TIAM2</i>
<i>COL12A1</i>	<i>KATNAL1</i>	<i>PLK2</i>	<i>TIMP2</i>
<i>CORO2A</i>	<i>KBTBD10</i>	<i>PLSCR4</i>	<i>TM4SF18</i>
<i>CRIP2</i>	<i>KM-HN-1</i>	<i>PLXND1</i>	<i>TMEM133</i>
<i>DACT1</i>	<i>KRT20</i>	<i>PON3</i>	<i>TMEM158</i>
<i>DKK1</i>	<i>KRT7</i>	<i>PPAP2B</i>	<i>TMEM2</i>
<i>DUSP26</i>	<i>KRTAP1-1</i>	<i>PPM1K</i>	<i>TMEM98</i>
<i>DUSP5</i>	<i>KRTAP3-1</i>	<i>PRKACB</i>	<i>TNFRSF6B</i>
<i>EID3</i>	<i>LAMA4</i>	<i>PRSS23</i>	<i>TNNC1</i>
<i>EMP1</i>	<i>LDHD</i>	<i>PTGS1</i>	<i>TTC30B</i>
<i>EPS8</i>	<i>LIPG</i>	<i>PTPRR</i>	<i>TTLL7</i>
<i>F3</i>	<i>LMO7</i>	<i>PVRL3</i>	<i>UACA</i>
<i>FAM122C</i>	<i>LOXL4</i>	<i>RABGAP1L</i>	<i>UNC13D</i>
<i>FAM46B</i>	<i>LYL1</i>	<i>RBPMS</i>	<i>UTRN</i>
<i>FN1</i>	<i>MAG1</i>	<i>RDHE2</i>	<i>VIL2</i>
<i>FOLR1</i>	<i>MAMDC2</i>	<i>REN</i>	<i>WNT6</i>
<i>FOLR3</i>	<i>MBNL2</i>	<i>RGC32</i>	<i>WNT7A</i>
<i>FOXA2</i>	<i>MCFD2</i>	<i>ROPN1L</i>	<i>ZBTB20</i>
<i>GALNT5</i>	<i>MDGA1</i>	<i>RUNX2</i>	<i>ZNF60</i>

9.3 Hochregulierte Gene in HCT116 *PIK3CA*-mut Zellen

Gennamen nach HUGO Gene Nomenclature Committee; alphabetisch sortiert:

<i>ACOX2</i>	<i>GNGT1</i>	<i>MEGF11</i>	<i>SCG2</i>
<i>ADAM19</i>	<i>GPR30</i>	<i>MITF</i>	<i>SEMA3D</i>
<i>AK3</i>	<i>GREB1</i>	<i>MLLT3</i>	<i>SERPINA3</i>
<i>ANKRD22</i>	<i>GUCA1B</i>	<i>MMP1</i>	<i>SERPINI1</i>
<i>APLN</i>	<i>HAS3</i>	<i>MOBK2B</i>	<i>SETX</i>
<i>APXL</i>	<i>HEY1</i>	<i>MST150</i>	<i>SGK</i>
<i>ASNS</i>	<i>HKDC1</i>	<i>MSX1</i>	<i>SLC16A14</i>
<i>BAMBI</i>	<i>HLF</i>	<i>MUM1L1</i>	<i>SLC7A11</i>
<i>BCL2</i>	<i>HOXD8</i>	<i>MYRIP</i>	<i>SLPI</i>
<i>C1QDC1</i>	<i>HSF2BP</i>	<i>NDUFC2</i>	<i>SNTB1</i>
<i>CA14</i>	<i>ICAM1</i>	<i>NEO1</i>	<i>SOX4</i>
<i>CALB2</i>	<i>IER3IP1</i>	<i>NETO2</i>	<i>SP5</i>
<i>CAPN6</i>	<i>IFI27</i>	<i>NFIB</i>	<i>SPON1</i>
<i>CDK6</i>	<i>IL17RB</i>	<i>NOV</i>	<i>SPP1</i>
<i>CITED4</i>	<i>IL8</i>	<i>NRP1</i>	<i>SULT1C1</i>
<i>CLEC2B</i>	<i>INPP5D</i>	<i>NUPR1</i>	<i>SVIL</i>
<i>CLGN</i>	<i>JAG1</i>	<i>ODZ3</i>	<i>TCAM1</i>
<i>COL4A6</i>	<i>KARCA1</i>	<i>OPN3</i>	<i>TCP10L</i>
<i>CTHRC1</i>	<i>KCNG1</i>	<i>PDE3B</i>	<i>TLL2</i>
<i>CXCL1</i>	<i>KCTD12</i>	<i>PELI2</i>	<i>TMTC1</i>
<i>CXCL2</i>	<i>KIF26B</i>	<i>PFTK1</i>	<i>TNS4</i>
<i>CXCL3</i>	<i>KLF10</i>	<i>PIGK</i>	<i>TRA2A</i>
<i>CYP2J2</i>	<i>KLF11</i>	<i>PIK3R3</i>	<i>TRIB2</i>
<i>DAPP1</i>	<i>KLK5</i>	<i>PKIB</i>	<i>TSC22D1</i>
<i>DDIT4L</i>	<i>KLK6</i>	<i>PLEKHG4</i>	<i>TSPAN7</i>
<i>DGAT2</i>	<i>KLK7</i>	<i>PNLIPRP2</i>	<i>TWIST1</i>
<i>DNER</i>	<i>KLRC1</i>	<i>PSAT1</i>	<i>UBD</i>
<i>DOCK4</i>	<i>KLRC2</i>	<i>PTAFR</i>	<i>UPP1</i>
<i>DPYSL3</i>	<i>KLRC3</i>	<i>PTP4A1</i>	<i>VIM</i>
<i>EDG2</i>	<i>KLRC4</i>	<i>RAB38</i>	<i>VSNL1</i>
<i>EDNRA</i>	<i>LAMA2</i>	<i>RASGRP1</i>	<i>WWC3</i>
<i>EHBP1</i>	<i>LAMB1</i>	<i>RASSF8</i>	<i>ZNF273</i>
<i>EHF</i>	<i>LCP1</i>	<i>REEP2</i>	<i>ZNF350</i>
<i>EVI1</i>	<i>LHFP</i>	<i>RERG</i>	<i>ZNF416</i>
<i>FGF19</i>	<i>LONRF2</i>	<i>RFPL1</i>	<i>ZNF419</i>
<i>FGF9</i>	<i>LONRF3</i>	<i>RFPL2</i>	<i>ZNF613</i>
<i>FRAS1</i>	<i>LRAT</i>	<i>RHOA</i>	<i>ZNF658</i>
<i>FZD1</i>	<i>LRIG1</i>	<i>RNF43</i>	<i>ZNF704</i>
<i>Gcom1</i>	<i>LY6K</i>	<i>ROR1</i>	<i>ZNF711</i>
<i>GJB2</i>	<i>MALT1</i>	<i>SAMD3</i>	<i>ZSWIM5</i>
<i>GLDC</i>	<i>MB</i>	<i>SATB1</i>	

9.4 FasL- und TRAIL-induzierte Zielgene in HCT116 PIK3CA-mut Zellen

Probennummer	Genbanknummer	Genname	relative Geninduktion			
			HCT116 PIK3CA-mut			
			Fc-FasL		TRAIL	
			Exp.1 (Cy5/Cy3)	Exp.2 (Cy3/Cy5)	Exp.1 (Cy5/Cy3)	Exp.2 (Cy3/Cy5)
A_23_P29237	NM_145641	APOL3	2.5	3.0	2.9	2.7
A_23_P380857	NM_030643	APOL4	2.0	3.2	2.2	2.6
A_23_P92161	NM_025047	ARL14	1.9	2.9	2.2	2.2
A_23_P34915	NM_001040619	ATF3	3.5	4.4	3.4	5.1
A_23_P98350	NM_001165	BIRC3	14.0	16.6	15.8	14.1
A_23_P101407	NM_000064	C3	2.0	4.5	2.2	4.6
A_23_P17065	NM_004591	CCL20	13.6	24.5	10.8	21.5
A_23_P338479	NM_014143	CD274	1.9	2.6	2.4	2.3
A_23_P70670	NM_004233	CD83	2.5	3.8	2.6	3.9
A_24_P360674	NM_078487	CDKN2B	2.0	2.4	2.4	2.4
A_23_P156687	NM_001710	CFB	3.3	3.1	4.0	2.6
A_23_P7144	NM_001511	CXCL1	11.9	31.4	9.2	25.4
A_23_P315364	NM_002089	CXCL2	6.8	17.0	5.3	17.3
A_24_P183150	NM_002090	CXCL3	6.6	12.5	5.3	12.1
A_23_P102000	NM_001008540	CXCR4	2.1	2.5	2.7	2.5
A_24_P48078	NM_015247	CYLD	2.6	2.7	2.7	2.8
A_23_P255444	NM_014395	DAPP1	2.4	2.8	2.9	2.9
A_23_P347040	NM_138287	DTX3L	2.2	2.3	2.3	2.4
A_23_P51856	NM_007207	DUSP10	2.6	2.7	2.7	3.1
A_23_P390528	NM_004420	DUSP8	2.1	2.3	2.1	3.0
A_23_P119478	NM_005755	EBI3	2.1	2.2	2.3	2.5
A_23_P214821	NM_001955	EDN1	2.8	3.8	3.1	3.9
A_23_P65068	NM_001008394	EID3	3.1	9.0	3.5	8.7
A_23_P127525	NM_005238	ETS1	2.6	3.6	2.5	3.4
A_23_P73220	NM_018351	FGD6	2.5	2.6	3.0	2.6
A_23_P78742	NM_001459	FLT3LG	1.9	2.4	2.0	2.9
A_23_P218555	NM_005253	FOSL2	1.9	2.0	2.1	2.1
A_32_P107372	NM_002053	GBP1	1.9	9.2	2.3	13.0
A_23_P214766	NM_006734	HIVEP2	2.0	2.6	2.2	2.4
A_23_P153320	NM_000201	ICAM1	2.5	7.7	3.0	7.6
A_23_P68155	NM_022168	IFIH1	2.2	3.1	2.4	3.7
A_24_P304071	NM_001547	IFIT2	2.3	2.2	3.1	2.1
A_23_P35412	NM_001549	IFIT3	2.0	5.2	2.1	4.9
A_23_P29036	NM_005534	IFNGR2	2.0	3.7	2.2	4.2
A_23_P887	NM_014002	IKBKE	2.0	5.0	2.2	3.8
A_23_P15146	NM_001012631	IL32	4.5	3.6	3.8	3.9
A_32_P87013	NM_000584	IL8	8.9	26.5	9.3	23.7
A_23_P122924	NM_002192	INHBA	2.4	2.4	2.8	2.3
A_23_P136478	NM_002199	IRF2	2.0	1.7	2.2	2.4
A_23_P201538	NM_002228	JUN	2.7	7.7	2.4	8.3
A_32_P24382	BC063625	KRTAP3-4	2.3	2.8	2.3	3.7
A_23_P107454	NM_031958	KRTAP3-1	3.5	2.8	3.9	3.4
A_23_P10936	NM_033060	KRTAP4-10	1.9	1.7	3.0	2.9
A_23_P328740	BC012317	LINCR	6.6	5.5	7.1	4.8
A_23_P50638	NM_052972	LRG1	1.8	3.6	2.5	3.8
A_23_P93348	NM_002341	LTB	11.5	15.4	12.4	13.0
A_23_P23947	NM_005204	MAP3K8	3.1	6.8	3.2	8.8
A_23_P52761	NM_002423	MMP7	3.4	5.9	5.1	5.9
A_24_P38363	NM_002467	MYC	1.6	3.1	2.1	2.7
A_24_P318160	NM_014903	NAV3	3.2	3.4	3.3	5.4
A_23_P202156	NM_001077493	NFKB2	2.1	2.9	2.4	3.1
A_23_P106002	NM_020529	NFKBIA	5.7	5.4	6.0	4.2
A_23_P1461	NM_001008211	OPTN	3.4	2.3	4.0	2.1
A_24_P339944	NM_002608	PDGFB	2.7	2.4	3.1	3.0
A_23_P50508	NM_003706	PLA2G4C	1.8	2.4	2.1	2.3
A_23_P55706	NM_006509	RELB	4.3	3.9	4.7	3.4
A_23_P335661	AB028976	SAMD4A	2.4	2.4	2.8	2.7
A_24_P373976	NM_002999	SDC4	2.2	5.7	2.6	6.2
A_23_P2920	NM_001085	SERPINA3	6.2	5.8	8.0	5.4
A_23_P141802	NM_001040147	SERPINB7	1.7	4.5	2.6	4.7
A_23_P153971	NM_152386	SGPP2	2.1	2.3	2.6	2.6
A_23_P156788	NM_003764	STX11	1.9	4.6	2.4	4.1
A_23_P59005	NM_000593	TAP1	2.0	2.0	2.2	2.3
A_23_P29922	NM_003265	TLR3	2.0	2.4	2.1	2.9
A_23_P421423	NM_006291	TNFAIP2	5.5	9.6	5.7	7.7
A_24_P157926	NM_006290	TNFAIP3	7.3	10.6	7.1	12.9
A_23_P19036	NM_006058	TNIP1	1.7	3.5	2.0	3.5
A_23_P37068	NM_145725	TRAF3	2.1	2.5	2.1	3.4
A_23_P81898	NM_006398	UBD	18.8	30.2	24.0	26.8
A_23_P255345	NM_004666	VNN1	9.2	16.4	15.7	14.9
A_23_P395582	NM_174900	ZFP42	8.9	5.1	13.9	6.1

9.5 Vorhergesagte Caspaseschnittstellen in ROCK-1

Caspase 1	GraBCas-Score	Caspase 6	GraBCas-Score
FEAD↓N (798)	8.92	LEID↓L (672)	19.69
FLTD↓R (319)	6.34	DETD↓G (1113)	12.90
LEID↓L (672)	5.70	TQLD↓L (893)	6.15
DETD↓G (1113)	3.16	LDVD↓L (747)	4.91
LDID↓K (1171)	2.13	TESD↓T (559)	4.75
LEED↓K (374)	2.07	LDID↓K (1171)	3.46
Caspase 2		Caspase 7	
DETD↓G (1113)	52.80	DETD↓G (1113)	44.80
DLSD↓S (1099)	11.66	DHLD↓K (1274)	3.29
LTKD↓I (951)	10.74	SQTD↓K (600)	2.22
LSSD↓I (362)	10.60	SDID↓T (364)	2.10
LEID↓L (672)	5.76		
EERD↓I (126)	6.40	Caspase 8	
TESD↓T (559)	3.12	LEID↓L (672)	72.00
ERRD↓R (616)	2.61	DETD↓G (1113)	70.39
LLRD↓P (20)	2.39	LEED↓K (374)	19.80
Caspase 3		LDVD↓L (747)	14.25
DETD↓G (1113)	37.80	LDID↓K (1171)	12.95
Caspase 4		DEQD↓K (1158)	7.60
LEID↓L (672)	50.45	FEAD↓N (798)	7.25
LEED↓K (374)	30.27	TESD↓T (559)	5.47
FEAD↓N (798)	16.32	EERD↓I (126)	3.22
LDID↓K (1171)	11.15	SQTD↓K (600)	3.11
DEQD↓K (1158)	4.40	SDID↓T (364)	2.69
DETD↓G (1113)	3.42	LVYD↓L (40)	2.07
FQDD↓R (146)	2.59	EITD↓K (933)	2.01
LDVD↓L (747)	2.23	Caspase 9	
TESD↓T (559)	2.12	LEID↓L (672)	18.70
Caspase 5		DETD↓G (1113)	5.63
LEED↓K (374)	32.30	LDID↓K (1171)	5.08
LEID↓L (672)	27.20	LDVD↓L (747)	4.16
FEAD↓N (798)	16.27	LEED↓K (374)	3.40
DETD↓G (1113)	4.16	FEAD↓N (798)	2.14
LDID↓K (1171)	3.37		
LDVD↓L (747)	3.37		

9.6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASK-1	Apoptosis Signal Regulating Kinase-1
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	Bcl-2 agonist/killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-W	Bcl-2 like-2
Bcl-XL	Bcl-2 like protein 1
Bfl-1	Bcl-2 regulated protein A1
BH3	Bcl-2 Homology domain 3
Bid	Bcl-2 homology domain 3-interacting domain death agonist
BIR	Baculovirus IAP Repeat
BRUCE	BIR containing Ubiquitin Conjugating Enzyme
CARD	Caspase Recruiting Domain
Caspase	Cysteine-dependent Aspartate-specific proteinase
cFLIP	cellular FLICE Inhibitory Protein
clAP	cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins
CRD	Cysteine Rich Domain
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DISC	Death Inducing Signaling Complex
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ELISA	Enzyme Linked immunosorbent Assay
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
FADD	Fas Associated Death Domain
Fas	FS7-associated surface antigen
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLICE	FADD-like ICE
h	Stunde
HRP	Horse Radish Peroxidase
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein

IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
ILP2	Inhibitor of apoptosis Like Protein 2
I κ B α	Inhibitor of NF κ B α
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
kDa	Kilodalton
M	Molarität
mA	Milliampere
MAP2K	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MAP3K	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCL-1	Myeloid Leukaemia Sequence-1
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NAIP	NLR family Apoptosis Inhibitory Protein
NF κ B	Nuclear Factor κ B
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
OPG	Osteoprotegerin
p38 MAPK	p38 Mitogen Activated Protein Kinase
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PARP-1	Poly-(ADP)-Ribose Polymerase-1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PH	Pleckstrin Homology
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositoltrisphosphat
PLAD	Pre-Ligand Assembly Domain
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
RANK	Receptor Activator of NF κ B
RANK-L	RANK-Ligand
RING	Really Interesting New Gene
RIP	Receptor Interacting Protein
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS	Natriumdodecylsulfat
Smac/ Diablo	second mitochondria-derived activator of apoptosis/ Direct IAP binding protein with low pI
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
tBid	trunceated Bid

TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
THD	TNF Homology Domain
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TRADD	TNF-Receptor Associated Death Domain
TRAF	TNF Receptor Associated Factor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAILR1; TRAILR2	TRAIL-Rezeptor 1; TRAIL-Rezeptor 2
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TWEAK	TNF-related Weak Inducer of Apoptosis
u.a.	unter anderem
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis protein
zVAD-fmk	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl-ke-ton

9.7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	: Die Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie	12
Abbildung 2:	Extrinsischer und intrinsischer Weg der Apoptose	15
Abbildung 3:	TRAIL-Signalwege	21
Abbildung 4:	Fas-Signalwege	26
Abbildung 5:	Der PI3K/Akt-Signalweg	28
Abbildung 6:	Toxizität von FasL und TRAIL auf HCT116 <i>PIK3CA</i> -wt und HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen	45
Abbildung 7:	<i>PIK3CA</i> -mut protektiert HCT116 Zellen gegen FasL- und TRAIL-vermittelte Apoptose	46
Abbildung 8:	Protektion der HCT116 <i>PIK3CA</i> -wt Zellen durch den Pan-Caspaseinhibitor zVAD-fmk	47
Abbildung 9:	Oberflächenexpression von Fas, TRAILR1 und TRAILR2	47
Abbildung 10:	Analyse des Fas Signalkomplexes	48
Abbildung 11:	Isolation Detergenz-resistenter Membranfraktionen mittels Dichtegradientenzentrifugation	50
Abbildung 12:	Caspaseprozessierung und Spaltung von Caspasesubstraten in HCT116 <i>PIK3CA</i> -wt und HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen	51
Abbildung 13:	Toxizität von FasL und TRAIL auf parentale und Bax-defiziente HCT116 Zellen	52
Abbildung 14:	Caspaseprozessierung und Spaltung von Caspasesubstraten in HCT116 parental und HCT116 Bax ^{-/-} Zellen	54
Abbildung 15:	Bortezomib sensitiviert HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen für TRAIL-induzierte Apoptose	55
Abbildung 16:	TRAIL und FasL induzieren Effektorcaspaseaktivität in Bortezomib-behandelten HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen unabhängig von Bax	56
Abbildung 17:	Expressionsanalyse verschiedener Gengruppen in HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen	57
Abbildung 18:	Proinflammatorischer Effekt von TRAIL und FasL in HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen	60
Abbildung 19:	FasL vermittelt IL8-Induktion in HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen	61
Abbildung 20:	Aktivierung des Akt-Signalweges in HCT116 <i>PIK3CA</i> -wt und <i>PIK3CA</i> -mut Zellen	62
Abbildung 21:	HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen produzieren uPA nach FasL- und TRAIL-Stimulation	62

Abbildung 22:	TRAIL und FasL induzieren eine amöboide Zellmorphologie in <i>PIK3CA</i> -mut protektierten HCT116 Zellen	63
Abbildung 23:	Amöboide Zellmorphologie der HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen ist nicht durch Nekrose bedingt.	64
Abbildung 24:	Ligandeninduzierte Reorganisation des Aktinzytoskeletts in HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen	65
Abbildung 25:	Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der FasL- und TRAIL-induzierten Morphologieänderung	66
Abbildung 26:	FasL und TRAIL induzieren transiente Änderungen der Zellmorphologie in HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen	67
Abbildung 27:	Langzeitinkubation der <i>PIK3CA</i> -mut protektierten HCT116 Zellen mit TRAIL	68
Abbildung 28:	Die FasL-/TRAIL-induzierte Morphologieänderung der HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen ist transient	69
Abbildung 29:	Caspaseinhibition mit zVAD verhindert die FasL-/TRAIL-induzierte Abrundung von HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen	71
Abbildung 30:	FasL- und TRAIL-vermittelte Änderungen der Zellmorphologie sind Caspase-8 abhängig	72
Abbildung 31:	Caspase-8 Knockdown inhibiert die FasL- und TRAIL-induzierte NF κ B-Aktivierung	73
Abbildung 32:	ROCK-abhängige Reorganisation des Aktinzytoskeletts nach Fc-FasL-Stimulation	75
Abbildung 33:	ROCK-Inhibition verhindert Zellmorphologieänderung nach FasL- oder TRAIL-Stimulation	76
Abbildung 34:	ROCK-1-Knockdown vermindert in HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen die Morphologieänderung nach FasL- oder TRAIL-Stimulation	77
Abbildung 35:	DETD \downarrow G (1113) Spaltung in ROCK-1 kann Caspase-3 oder Caspase-8 vermittelt sein	78
Abbildung 36:	ROCK-1-Spaltung in HCT116 <i>PIK3CA</i> -wt und HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen ist unabhängig von Effektorcaspasen und Apoptose	79
Abbildung 37:	Die FasL-/TRAIL-induzierte ROCK-1-Spaltung ist in HCT116 <i>PIK3CA</i> -wt und HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut Zellen Caspase-3 unabhängig	80
Abbildung 38:	Partielle Protektion von HCT116 <i>PIK3CA</i> -wt Zellen vor FasL- bzw. TRAIL-induzierter Apoptose durch Caspase-3 Inhibition	81
Abbildung 39:	Caspase-3 Inhibition hat keine Auswirkung auf die Änderung der Zellmorphologie nach FasL- oder TRAIL-Behandlung	81
Abbildung 40:	Koimmunpräzipitation von ROCK-1 und Caspase-8	82

Abbildung 41:	Todesrezeptor-induzierte Caspase-8 Aktivierung der HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut pEGZ und HCT116 <i>PIK3CA</i> -mut pEGZ-FLIP _S Zellen	83
Abbildung 42:	Überexpression von cFLIP _S verhindert Änderung der Zellmorphologie	84
Abbildung 43:	Überexpression von cFLIP _S inhibiert Aktivierung des NFκB-Signalweges	85
Abbildung 44:	Akt kann durch unterschiedliche Mechanismen antiapoptotisch wirken	88
Abbildung 45:	Akt kann neben Vermittlung von Apoptoseresistenz auch	89

9.8 Publikationen und Vorträge

Publikationen:

Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J, Winoto-Morbach S, Held-Feindt J, Heinrich M, Merkel O, Ehrenschwender M, Adam D, Mentlein R, Kabelitz D und Schütze S. (2004): **Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles.** *Immunity*. 21,415-428.

Ehrenschwender M und Wajant H. (2009): **The Role of FasL and Fas in Health and Disease.** *Adv Exp Med Biol*. 647,64-93.

Wicovsky A, Salzmann S, Roos C, Ehrenschwender M, Rosenthal T, Siegmund D, Henkler F, Gohlke F, Kneitz C und Wajant H. (2009): **TNF-like weak inducer of apoptosis inhibits proinflammatory TNF receptor-1 signaling.** *Cell Death Differ*. Jun 26. [Epub ahead of print].

Ehrenschwender M, Siegmund D, Wicovsky A, Kracht M, Dittrich-Breiholz O, Spindler V, Waschke J, Kalthoff H, Trauzold A und Wajant H. (2009): **Mutant PIK3CA licenses TRAIL and CD95L to induce proinflammatory signaling, invasion and caspase-8-mediated ROCK activation in colorectal cancer cells.** *Nat. Cell Biol.* *submitted*.

Vorträge:

"Frühe Mechanismen der Fas-Aktivierung" IZKF Projektleitertagung, Kloster Banz, 30.05.2008

"TWEAK shifts TNF-receptor 1 signaling from inflammation to cell death" 4th International Symposium of the Graduate School of Life Science, Würzburg, 27.03.2009.

"TWEAK regulates proinflammatory TNFR1 signaling" 12th International TNF Conference, Madrid, 28.04.2009

9.9 Lebenslauf

Persönliche Informationen

Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsort: Ansbach
Geburtsdatum: 21.01.1981

Schulbildung und Studium

Juni 2000: Abitur am Veit - Höser - Gymnasium Bogen
Oktober 2000: Immatrikulation an der Universität Regensburg im Fach Humanmedizin
September 2002: Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung
September 2003: Ablegen des 1. Staatsexamens
September 2005: Ablegen des 2. Staatsexamens
Oktober 2005 bis September 2006: Praktisches Jahr:
Pathologie: Luzern, Schweiz
Innere Medizin: St. John's, Kanada und Zürich, Schweiz
Chirurgie: Bozen, Italien
Oktober 2006: Ablegen des 3. Staatsexamens mit der Bewertung "sehr gut" (1,0), Abschluss des Studiums der Medizin an der Universität Regensburg mit der Gesamtnote "sehr gut".
März 2007: Promotion zum Dr. med. an der Universität Regensburg. Thema: „Charakterisierung des Internalisierungsmotivs des Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor 1“. Note "summa cum laude".
Oktober 2006 bis September 2009: Stipendiat im MD/PhD Programm des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung der Universität Würzburg. Naturwissenschaftliche Promotion unter Anleitung von Prof. Dr. Harald Wajant (Abteilung für Molekulare Innere Medizin).
ab Oktober 2009: Klinisch-internistisches Weiterbildungsjahr im Rahmen der Facharztweiterbildung Labormedizin in der Med. Klinik I (Prof. Dr. Ertl) am Universitätsklinikum Würzburg.