

**Strahleninduzierte Apoptose:  
Mechanismen und Bedeutung  
für den klonogenen Zelltod**

**D i s s e r t a t i o n**

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

vorgelegt von

**Justine Rudner**

**2002**

**Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2002**

**Dekan: Prof. Dr. H. Probst**

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Budach**

**2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-J. Machulla**

## 1.1 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. M. Bamberg für die großzügige Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken und für die Möglichkeit, nationale und internationale Kongresse zu besuchen.

Herrn Prof. H.-J. Machulla danke ich für seine Bereitschaft, diese Arbeit vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie zu vertreten sowie für den interessanten Einblick in die Welt der Radiopharmazie.

Bei Prof. W. Budach sowie beim Herrn Dr. C. Belka bedanke ich mich herzlichst für die experimentelle Betreuung dieser Arbeit. Die inspirierende Gespräche und Anregungen trugen sehr zum Gelingen dieser Dissertation bei.

Weiterhin möchten ich Angelika Betsch, Verena Jendrossek und Thomas Bartsch für Hilfe bei der Korrektur meiner Doktorarbeit danken.

Meinen Kolleginnen Heidi Faltin, Patrizia Marini, Angelika Betsch, Elise Durand und Angeliki Anastasakis sowie Julian Wagner möchte ich für das angenehme Arbeitsklima danken.

Abschließend gilt mein Dank ganz besonders an meine Familie, die mich über die Jahre in allen Lebenslagen unterstützt haben.

*Der Mensch leidet an einer fatalen Spätzündung:  
Er begreift alles erst in der nächsten Generation.*

(Stanislaw Jerzy Lec, pol. Satiriker, 1909-1966)

**Teilergebnisse dieser Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:**

Belka C, Rudner J, Wesselborg S, Stepczynska A, Marini P, Lepple-Wienhues A, Faltin H, Bamberg M, Budach W, Schulze-Osthoff K. (2000). Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis. *Oncogene*, 19:1181-1190

Rudner J, Belka C, Marini P, Wagner RJ, Faltin H, Lepple-Wienhues A, Bamberg M, Budach W. (2000). Radiation sensitivity and apoptosis in human lymphoma cells. *Int J Radiat Biol*, 77:1-11

Rudner J, Lepple-Wienhues A, Budach W, Berschauer J, Friedrich B, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K, Belka C. (2001). Wild-type, mitochondrial and ER-restricted Bcl-2 inhibit DNA damage-induced apoptosis but neither affects death receptor-induced apoptosis. *J Cell Sci*, 114, 4161-72

---

<b>1</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>
<b>2</b>	<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>3</b>
2.1	EINHEITEN .....	3
2.2	AMINOSÄUREN .....	3
2.3	WEITERE ABKÜRZUNGEN .....	3
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>6</b>
3.1	APOPTOSE: ROLLE UND CHARAKTERISIERUNG .....	6
3.2	CASPASEN: DIE SCHLÜSSELENZYME.....	6
3.3	CASPASENSUBSTRATE.....	8
3.4	APOPTOTISCHE SIGNALWEGE .....	9
3.4.1	<i>Der mitochondriale Weg.....</i>	<i>10</i>
3.4.2	<i>Die Zelltodrezeptoren.....</i>	<i>11</i>
3.5	PHYSIOLOGISCHE ROLLE DER ZELLTODREZEPTOREN .....	13
3.5.1	<i>CD95/CD95L-System .....</i>	<i>13</i>
3.5.2	<i>TNF-System .....</i>	<i>13</i>
3.5.3	<i>Das DR3/TRAMP- und TRAIL-System .....</i>	<i>14</i>
3.6	INHIBITOREN DER APOPTOSE.....	15
3.6.1	<i>FLIP.....</i>	<i>15</i>
3.6.2	<i>Die Bcl-2-Proteinfamilie.....</i>	<i>16</i>
3.6.3	<i>IAPs.....</i>	<i>19</i>
3.7	FUNKTION DER MITOCHONDRIEN IN DER APOPTOSE.....	20
3.8	ZIELSETZUNG .....	22
<b>4</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>24</b>
4.1	REAGENZILIEN.....	24
4.2	PUFFER UND LÖSUNGEN .....	25
4.3	ZELLKULTUR .....	27
4.4	ANTIKÖRPER UND LIGANDEN .....	27
4.4.1	<i>Antikörper zur Westernblotanalyse .....</i>	<i>27</i>
4.4.2	<i>Antikörper zur Immunfluoreszenzanalyse.....</i>	<i>28</i>
4.4.3	<i>Antikörper und Liganden zur Stimulierung der Zellen:.....</i>	<i>28</i>
4.5	ZELLEN.....	28
4.6	BAKTERIEN .....	28
4.7	KITS .....	29
4.8	VERBRAUCHSMATERIAL.....	29
4.9	GERÄTE .....	29
<b>5</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>30</b>
5.1	ZELLKULTUR .....	30
5.1.1	<i>Kultivierung von Zellen .....</i>	<i>30</i>
5.1.2	<i>Einfrieren und Auftauen von Zellen.....</i>	<i>30</i>
5.1.3	<i>Zellzahlbestimmung.....</i>	<i>30</i>
5.2	TRANSFEKTION VON ZELLEN .....	31
5.3	DNA-VERMEHRUNG UND -AUFREINIGUNG .....	31
5.3.1	<i>Transformation von Bakterien.....</i>	<i>31</i>
5.3.2	<i>Aufreinigung von DNA .....</i>	<i>32</i>
5.3.3	<i>Bestimmung der DNA-Konzentration und Überprüfung der DNA-Reinheit.....</i>	<i>32</i>
5.4	STIMULIERUNG DER ZELLEN.....	33
5.5	BESTIMMUNG DER APOPTOSE, VIABILITÄT UND $\Delta\Psi_M$ .....	33
5.5.1	<i>Durchflußzytometrie/FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter).....</i>	<i>33</i>
5.5.2	<i>Hoechst-Färbung.....</i>	<i>35</i>
5.6	BESTIMMUNG DER RADIORESISTENZ.....	35
5.7	WESTERNBLOT .....	36
5.7.1	<i>Herstellung von Lysaten .....</i>	<i>36</i>
5.7.2	<i>Proteinbestimmung.....</i>	<i>36</i>
5.7.3	<i>Probenvorbereitung.....</i>	<i>36</i>
5.7.4	<i>SDS-PAGE.....</i>	<i>37</i>
5.7.5	<i>Detektion der Proteine.....</i>	<i>37</i>

---

5.8	GELSHIFT-ANALYSE .....	38
5.8.1	Markierung der Oligonukleotide .....	39
5.8.2	Probenvorbereitung .....	39
5.8.3	Auftrennung der Oligonukleotid/Protein-Komplexe im Gel .....	40
5.9	FLUORESZENZMIKROSKOPIE .....	40
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>42</b>
6.1	APOPTOSE IN JURKAT-ZELLEN .....	42
6.2	INHIBITION DER APOPTOSE DURCH BCL-2 UND BCL-X <sub>L</sub> .....	44
6.3	INHIBITION DER CASPASENAKTIVIERUNG DURCH BCL-2 UND BCL-X <sub>L</sub> .....	47
6.4	CASPASE-8: AKTIVATOR ODER EFFEKTOR? .....	48
6.5	ROLLE DER PT-PORE IN DER APOPTOSE .....	49
6.6	APOPTOSEREGULIERUNG IN VERSCHIEDENEN SUBZELLULÄREN KOMPARTIMENTEN .....	51
6.6.1	Subzelluläre Bcl-2-Expression .....	51
6.6.2	Kontrolle der Apoptose nach ionisierender Strahlung .....	54
6.6.3	Kontrolle der Apoptose nach Stimulierung der Zelltodrezeptoren .....	56
6.6.4	Rolle von Caspase-12 in strahleninduzierter Apoptose .....	58
6.7	EINFLUSS VON BCL-2 AUF DAS LANGZEITÜBERLEBEN UND DIE STRAHLENSENSITIVITÄT .....	59
<b>7</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>62</b>
7.1	CASPASE-8 UND BID: ESSENTIELLE PROMOTOREN DER STRAHLENINDUZierten APOPTOSE? ..	62
7.1.1	Zwei Wege in die Apoptose .....	62
7.1.2	Caspase-8: eine Initiatorcaspase? .....	62
7.1.3	Rolle von Bid .....	63
7.1.4	Kontrolle der strahleninduzierten Apoptose auf mitochondrialer Ebene .....	64
7.1.5	Der mitochondriale Weg nach CD95-Stimulierung .....	64
7.2	DIE NOTWENDIGKEIT DER PT-PORE .....	66
7.3	BEDEUTUNG DER SUBZELLULÄREN BCL-2-LOKALISATION .....	67
7.3.1	Bcl-2 in unterschiedlicher subzellulärer Lokalisierung .....	67
7.3.2	Endoplasmatisch-mitochondriale Interaktionen .....	69
7.3.3	Verschiedene Möglichkeiten der Bcl-2-Aktion .....	71
7.4	MODELL DER APOPTOSEINDUKTION .....	73
7.5	BCL-2-VERMITTELTE RADIORESISTENZ .....	75
<b>8</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>81</b>
<b>10</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>83</b>

## 2 ABKÜRZUNGEN

### 2.1 Einheiten

°C	Grad Celsius
g	Erdbeschleunigung
Gy	Gray
kD	Kilodalton
min	Minuten
MV	Megavolt
µF	Mikrofarad
U	Einheiten (units)
V	Volt

### 2.2 Aminosäuren

A	Alanin
D	Aspartat
E	Glutamat
H	Histidin
L	Leucin
N	Asparagin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan

### 2.3 Weitere Abkürzungen

AA	Acrylamid
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AIF	Apoptosis Inducing Factor
ANT	Adenin Nucleotid Transporter
AP	Alkalische Phosphatase
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
APS	Amoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-x <sub>L</sub> /Bcl-2-associated Death Promoter
Bak	Bcl-2 Antagonist/Killer

---

Bax	Bcl-2-associated X Protein
Bcl-2	B-cell Lymphoma Gene 2
Bcl-x <sub>L</sub>	Lange Splicevariante des Bcl-x-Gens
Bcl-x <sub>S</sub>	Kurze Splicevariante des Bcl-x-Gens
BH1-4	Bcl-2 Homology Domäne 1-4
Bid	BH-3 Interacting Domäne Death Agonist
Bik	Bcl-2 Interacting Killer
BIR	Baculovirus IAP Repeats
BisAA	Bisacrylamid
Blk	Bik-like Killer Protein
Bod	Bcl-2-related Ovarian Death Gene (auch Bim genannt)
Bok	Bcl-2 related Ovarian Killer
BSA	Rinderserumalbumin
CAD	Caspase Activated DNase
CARD	Caspase Recruitment Domäne
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
CD95L, bzw. FasL	CD95 Ligand, bzw. Fas Ligand
Ced	Caenorhabditis elegans death gene
CsA	Cyclosporin A
dATP	Deoxy-Adenosintriphosphat
DcR1 bzw. DcR2	Decoy Receptor 1 bzw. 2
DD	Death Domäne
DED	Death Effector Domäne
DFF45	DNA Fragmentation Factor 45 (auch ICAD genannt)
DIABLO	Direct IAP Binding Protein with Low pI
DISC	Death Inducing Signalling Complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DP5	Neuronal Death Protein 5 (auch Hrk genannt)
DR	Death Receptor (z.B. DR3, DR4, DR5, DR6)
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGL-1	Egg-laying Defective Gene 1
EGTA	Etylenglycol-bis-(β-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FADD	Fas-associated Protein with Death Domäne
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FSC	Forward Scatter
FLAME-1	FADD-like anti-apoptotic Molecule (auch FLIP oder I-FLICE genannt)
FLICE	FADD like ICE

---

FLIP	FLICE-inhibitory Protein (auch I-FLICE oder FLAME-1 genannt)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
Hrk	A Product of Harakiri (auch DP5 genannt)
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
ICAD	Inhibitor of CAD (auch DFF45 genannt)
ICE	Interleukin-1 $\beta$ -converting Enzyme
I-FLICE	Inhibitor of FLICE (auch FLIP genannt)
Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia Gene 1
MIHA	Mammalian IAP Homolog A
MRIT	Mach-Related Inducer of Toxicity (auch FLIP genannt)
NAIP	Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein
Nbk	Natural Born Killer (auch Bik genannt)
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
NF- $\kappa$ B	Nuklear Faktor $\kappa$ B, Transkriptionsfaktor
p53AIP1	p53-regulated Apoptosis-Inducing Protein 1
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly-(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat Buffered Saline
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonsäurefluorid
Poly-dIdC	Poly-deoxy-inosinic-deoxy-cytidylic acid
PT-Pore	Permeability Transition Pore
Puma	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS	Natriumdodecylsulfat/Laurylsulfat
SERCA	Smooth Endoplasmic Reticulum-associated Calcium ATPase
SF	Surviving Fraction (Überlebensfraktion)
Smac	Second Mitochondria-derived Activator of Caspase
SSC	Sideward Scatter
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMRE	Tetramethylrhodamin-ethylester-perchlorat
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	TNF Receptor-associated Protein with Death Domaine
TRAIL	TNF-related Apoptosis Inducing Ligand
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
WGD50	Well Growth Dose 50
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
zVAD-FMK	Benzyloxy-valine-alanine-aspartate-O-methyl-fluoromethylketone

### 3 EINLEITUNG

#### 3.1 Apoptose: Rolle und Charakterisierung

Die Eliminierung von Zellen ist ein wichtiger Prozess während der embryonalen Entwicklung sowie für die Erhaltung der Gewebshomöostase und der Immuntoleranz. Dieser physiologische Prozess, der als programmierter Zelltod oder Apoptose bezeichnet wird, muss deshalb sehr genau kontrolliert werden. Eine Deregulation des Zelltods kann zur Entstehung verschiedener Erkrankungen führen. Unter anderem kann Apoptoseresistenz zur Bildung von Neoplasmen und Autoimmunerkrankungen führen, wohingegen zu viel Apoptose bei neurodegenerativen Erkrankungen, AIDS sowie bei anderen viralen und bakteriellen Infektionen beobachtet werden kann.

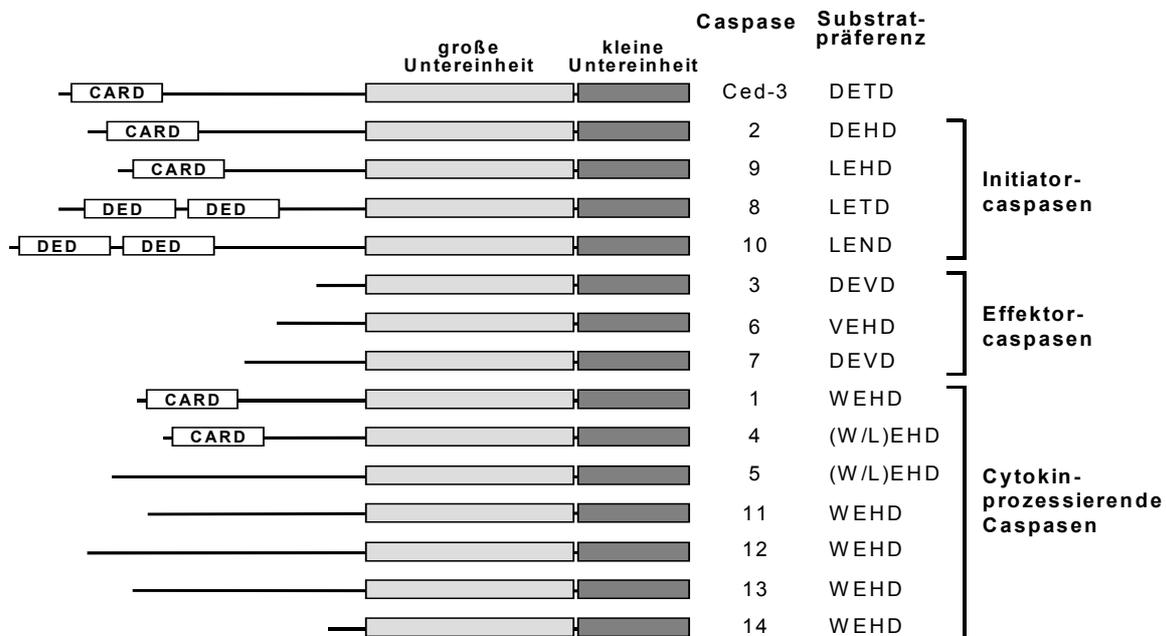
Bereits zu Beginn der 70-er Jahre wurde eine Form des Zelltods beschrieben, die sich deutlich von der Nekrose unterscheidet (Kerr, 1971; Kerr, 1972). Für diesen zunächst als „schrumpfende Nekrose“ benannten Vorgang wurde 1972 die Bezeichnung „Apoptose“ eingeführt (Kerr *et al.*, 1972).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen dieser morphologischen Änderungen zeigten, dass es nach der Apoptoseinduktion zur Zellschrumpfung, Chromatinkondensation und Bildung sogenannter apoptotischer Bläschen an der brodelnden Membranoberfläche kommt (Wyllie *et al.*, 1980). Weiterhin konnten molekulare Änderungen in apoptotischen Zellen nachgewiesen werden, die die internukleosomale DNA-Fragmentierung (Wyllie *et al.*, 1984) und die Umverteilung von Phosphatidylserin von der intrazellulären zur extrazellulären Seite der Plasmamembran einschließen (Fadok & Henson, 1998). Unlängst wurde außerdem die Schwellung von Mitochondrien beschrieben, die zum Platzen der äußeren Mitochondrienmembran unter Freisetzung von apoptotischen Proteinen aus dem mitochondrialen Intermembranraum führt (Vander Heiden *et al.*, 1997).

#### 3.2 Caspasen: die Schlüsselenzyme

Wichtige Rädchen in der apoptotischen Maschinerie sind Caspasen, **C**ystein-**P**roteasen, die ihre Protein-Substrate spezifisch und sehr effizient an der Carboxy-seite eines **A**spartats schneiden. Als erste Cystein-Protease, die essentiell für die

Eliminierung somatischer Zellen während der Entwicklung des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* ist, wurde das Protein Ced-3 beschrieben (Ellis & Horvitz, 1986). 1993 wurde schließlich ICE (Interleukin-1 $\beta$ -converting Enzyme) als erste humanes Ced-3-Homolog identifiziert und später Caspase-1 genannt (Miura *et al.*, 1993; Yuan *et al.*, 1993). Bis dato sind 14 mammale Caspasen kloniert worden, zehn humane und vier weitere murine, die grob nach ihrer Funktion in Cytokin-prozessierende Caspasen der ICE-Familie (Caspase-1, -4, -5, -11) und apoptotische Caspasen der Ced-3-Familie zusammengefasst werden (Alnemri *et al.*, 1996; Strasser *et al.*, 2000). Die in apoptotische Prozesse involvierten Caspasen werden weiterhin in Initiatorcaspasen mit längerer Prodomäne (Caspase-2, -9, -8, -10) und Effektorcaspasen mit einer sehr kurzen Prodomäne (Caspase-3, -6, -7) unterteilt. Die Caspasen -12 bis -14 weisen eine Homologie zu den Cytokin-prozessierenden Caspasen auf, ihre Funktion wurde bisher aber nicht genauer untersucht. Jedoch scheint Caspase-12 in apoptotische Prozesse involviert zu sein, die durch endoplasmatischen Stress hervorgerufen werden (Nakagawa *et al.*, 2000). Weiterhin unterscheiden sich die Caspasen in ihrer Präferenz gegenüber einem Tetrapeptid, das sie als Substrat erkennen (Margolin *et al.*, 1997; Nicholson & Thornberry, 1997) (siehe Abbildung 1). Diese Cystein-Proteasen werden in inaktiver Proform als Zymogen mit sehr geringer,



**Abbildung 1: Struktureller Vergleich der Procaspasen und der Caspasensubstratspezifität.** Es sind die humanen Caspasen -1 bis -10, die murinen Caspasen -11 bis -14 sowie das *C.elegans*-Homolog Ced-3 gezeigt. Mehrere Caspasen besitzen eine längere Prodomäne: Ced-3 und die Caspasen-2, -9, -1, -4 besitzen eine CARD (Caspase Recruitment Domäne)-Domäne, Caspasen-8 und -10 eine DED (Death Effector Domäne)-Domäne. (nach Strasser *et al.*, 2000)

aber detektierbarer intrinsischer Aktivität synthetisiert (Thornberry & Lazebnik, 1998). Die Procaspase besteht aus einem einzelnen Polypeptidstrang mit einer N-terminalen Prodomäne, einer intermediären großen und einer C-terminalen kleinen Untereinheit. Während der Aktivierung wird dieser Peptidstrang zunächst zwischen der kleinen und der großen Untereinheit proteolytisch gespalten, bevor die Prodomäne entfernt wird (Nicholson *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 1994). Wie in der Röntgenstrukturanalyse der Caspasen-1, -3 und -8 bereits gezeigt wurde, besteht die aktive Caspase aus einem Heterotetramer aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten mit zwei voneinander unabhängigen katalytischen Zentren (Blanchard *et al.*, 1999; Mittl *et al.*, 1997; Rotonda *et al.*, 1996; Watt *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 1994). Die Aktivierung der Initiatorcaspasen erfolgt in der Regel autokatalytisch: nach einem apoptotischen Stimulus werden hierbei große Proteinkomplexe gebildet, in die die Procaspase rekrutiert wird. Für ihre Rekrutierung ist die Prodomäne wichtig, über die die Protease mit verwandten Domänen sogenannter Adapterproteine, die als Brücke zwischen den Rezeptoren und den Caspasen fungieren, eine homophile Wechselwirkung eingeht (Li *et al.*, 1997; Muzio *et al.*, 1996). Durch die räumliche Nähe dieser Proteasen kommt es zur gegenseitigen Spaltung (Muzio *et al.*, 1998). Die Effektorcaspasen werden in der Regel in einer Kaskade durch Initiatorcaspasen aktiviert (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996; Hirata *et al.*, 1998; Muzio *et al.*, 1997). In einer positiven Feedback-Schleife kann die Caspasenprozessierung und -aktivierung weiter beschleunigt werden.

### 3.3 Caspasensubstrate

Die Identifizierung der Caspasensubstrate ist von zentraler Bedeutung für das Verständnis des programmierten Zelltods. Um einen effizienten Ablauf des apoptotischen Programms zu garantieren, muss die Zelle zusätzlich daran gehindert werden, sich weiter zu replizieren und ihre DNA zu reparieren. Eine vollständige Degradierung der Zelle und ihre Markierung ist notwendig für ihre schnelle Beseitigung durch Phagozyten und Makrophagen. Hierfür ist die Auflösung des Zytoskeletts und Bildung von vesikulären Zellfragmenten sowie die Phosphatidylserinexternalisation von essentieller Wichtigkeit (Stroh & Schulze-Osthoff, 1998).

Bisher wurden über 60 Proteine beschrieben, die im apoptotischen Verlauf von Caspasen proteolytisch gespalten werden, die Konsequenzen der Spaltung bleiben jedoch meist im Dunkeln. Während einige Substrate durch Spaltung funktionell inakti-

viert werden, können andere, oft durch die Entfernung einer inhibitorischen Domäne aktiviert werden (Stroh & Schulze-Osthoff, 1998). Die Proteolyse der meisten Substrate erfolgt durch Effektorcaspasen (Cohen, 1997; Cryns & Yuan, 1998), doch die Spaltung des pro-apoptotischen Moleküls Bid durch Caspase-8/FLICE zeigt, dass auch Initiatorcaspasen auf diese Weise apoptotische Prozesse regulieren können (Li *et al.*, 1998b; Luo *et al.*, 1998).

Als eines der ersten Caspasensubstrate wurde das DNA-Reparaturenzym PARP, die Poly-(ADP-ribose)-Polymerase, identifiziert, welche von Caspase-3 geschnitten wird (Tewari *et al.*, 1995). Die Bedeutung der PARP-Spaltung für die Apoptoseregulation ist jedoch unklar, da PARP<sup>-/-</sup>-Mäuse keinen veränderten Phänotyp aufweisen, der auf eine wesentliche Rolle in apoptotischen Prozessen hinweist (Wang *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu ist die Caspasen-vermittelte Aktivierung der DNase CAD (**Caspase-activated DNase**) für die internukleosomale DNA-Fragmentierung von großer Wichtigkeit. In intakten Zellen liegt die DNase zytosolisch an ihrem Inhibitor ICAD/DFF45 gebunden vor. Nach einem apoptotischen Stimulus erlaubt die Inhibitorspaltung und -inaktivierung durch Caspase-3 eine Translokation der DNase in den Nukleus, wo sie die DNA degradiert (Sakahira *et al.*, 1998).

### 3.4 Apoptotische Signalwege

Der apoptotische Verlauf kann in drei Phasen gegliedert werden: In der Initiationsphase erhält die Zelle ein Signal, das zur Aktivierung des Todesprogramms führen kann, aber nicht muß. In der Entscheidungsphase überschreiten die Zellen einen Punkt, ab dem das apoptotische Programm nicht mehr zu stoppen ist. In dieser Phase werden die verschiedenen Signale der pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Faktoren abgewogen, die über das Überleben oder den Tod der Zelle entscheiden. Wird der Entscheidungspunkt überschritten, von dem an die Zellen zum Sterben bestimmt sind, so werden Caspasen aktiviert, die schließlich in der Degradationsphase die Auflösung der zellulären Strukturen herbeiführen (Slee *et al.*, 1999a).

Zwei Wege führen in die Apoptose: über die Stimulierung der Zelltodrezeptoren mit ihren physiologischen Liganden (exogener Stimulus) oder nach einem endogenen Stimulus über den mitochondrialen Weg. Ersterer spielt eine große Rolle bei der Eliminierung autoreaktiver sowie aktivierter Lymphozyten (Nagata, 1998; Takahashi *et al.*, 1994), über letzteren wird Apoptose nach verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Stimuli kontrolliert, u.a. nach Entzug von Wachstumsfaktoren,

Hypoxie, Hitzeschock, Exposition gegenüber ionisierender Strahlung und verschiedenen zytotoxischen Substanzen (Kluck *et al.*, 1997).

3.4.1 Der mitochondriale Weg

Zur Aufklärung des phylogenetisch älteren mitochondrialen Wegs trugen zahlreiche genetische Studien an *C. elegans* bei. Während seiner Embryonalentwicklung legt der Fadenwurm 1090 somatische Zellen an, von denen exakt 131 wieder deletiert werden (Ellis & Horvitz, 1986). In Mutationsstudien wurden schließlich mehrere als Ced (*C. elegans* Death gene) bezeichnete Gene identifiziert, die die Apoptose in *C. elegans* steuern. Überexpression oder aktivierende Mutanten von Ced-3 und Ced-4 sowie der funktionelle Verlust von Ced-9 führen zur Beseitigung der besagten 131 Zellen (Hengartner *et al.*, 1992). Weitere Interaktionsstudien zeigten, dass die Rekrutierung und Aktivierung der Cystein-Protease Ced-3 durch Ced-4 essentiell für die apoptotische Deletion ist (Chinnaiyan *et al.*, 1997a). Das mitochondrial lokalisierte anti-apoptotische Protein Ced-9 verhindert durch Bindung an Ced-4 die Interaktion von Ced-4 mit Ced-3 (Chinnaiyan *et al.*, 1997b; Spector *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997a). Ein weiteres Protein Egl-1 (**E**gg-laying Defective Gene 1) reguliert die Apoptose in *C. elegans*, indem es seinerseits mit Ced-9 interagiert, wodurch Ced-4 frei für die Ced-3-Bindung wird (Conradt & Horvitz, 1998).

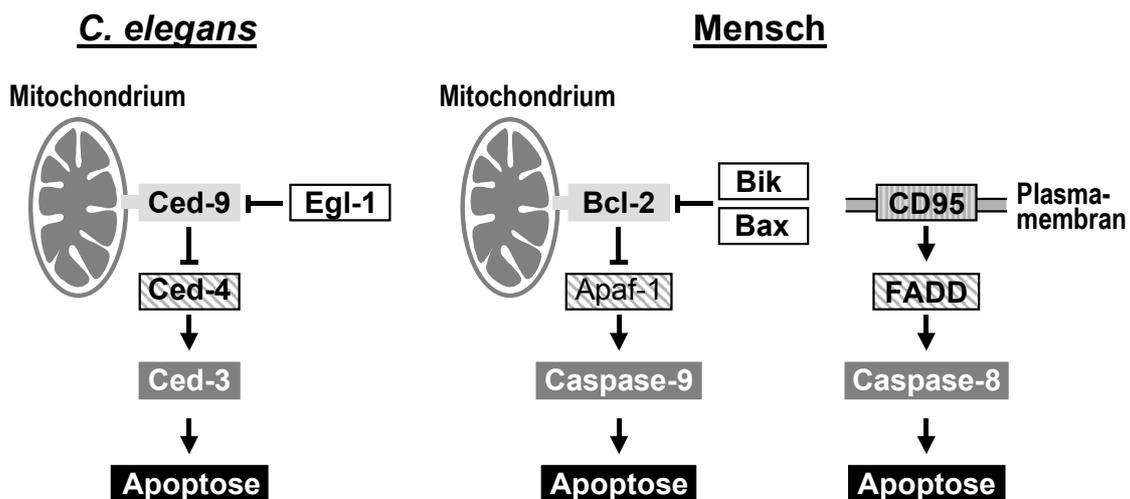


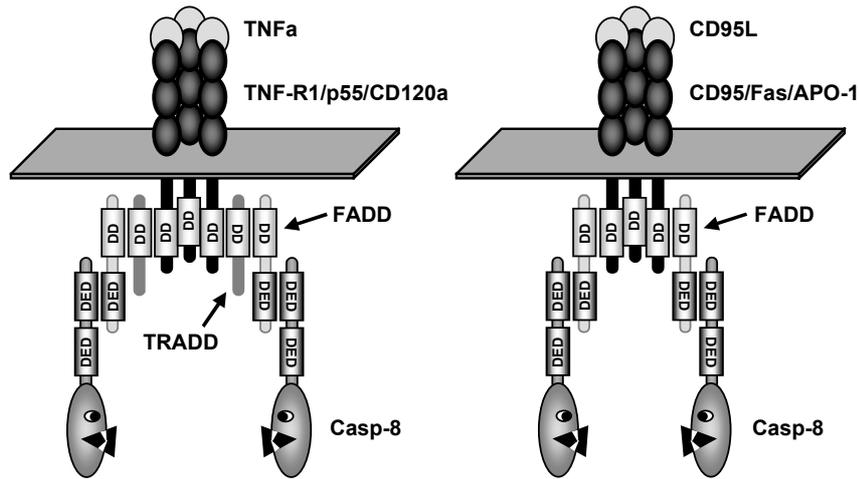
Abbildung 2: Apoptotische Signaltranswege in *C.elegans* und im Menschen.

In *C.elegans* wird Apoptose immer über den mitochondrialen Weg induziert. Im Menschen ist der mitochondriale Weg beibehalten worden. Außerdem können Caspasen im Menschen nach Stimulierung von CD95/Fas/APO-1 oder anderen Zelltodrezeptoren direkt am Rezeptorkomplex aktiviert werden. Die Procaspase-8 wird zum Rezeptorkomplex über das Adaptermolekül FADD rekrutiert, wo sie anschließend aktiviert wird (nach Adams & Cory, 1998).

Auf der Suche nach homologen Proteinen in höher entwickelten Organismen wurden große Molekülfamilien identifiziert, die das Verständnis der Caspasenaktivierung weiter erschweren. Nach Übertragung dieses Funktionsplans auf den Menschen ergibt sich folgendes Bild: nach einer mitochondrialen Schädigung kommt es zur Freisetzung apoptotischer Proteine, wie z.B. Cytochrom c, aus dem Intermembranraum ins Zytosol. Cytochrom c und dATP binden an Apaf-1, das humane Ced-4-Homolog, und induzieren eine Konformationsänderung dieses Adapterproteins, die zur Demaskierung der CARD-Domäne (**C**aspase **R**ecruitment **D**omaine) führt. Die zu Ced-3 homologe Procaspase-9, die ebenfalls eine CARD-Domäne besitzt, bindet über diese an die CARD-Domäne von Apaf-1 (Li *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1997). Nach Aktivierung von Caspase-9 am oligomeren Initiationskomplex, auch Apoptosom genannt, kann diese weitere Caspasen in der Kaskade aktivieren (Slee *et al.*, 1999b). Die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie (Ced-9-Homologe) sind in der Lage, den mitochondrialen Schaden sowie die daraus resultierende Cytochrom c-Freisetzung und Caspasenaktivierung über zum Teil noch unverstandene Wege zu verhindern (Hengartner & Horvitz, 1994; Kluck *et al.*, 1997).

### 3.4.2 Die Zelltodrezeptoren

Die Zelltodrezeptoren gehören zur Familie der TNF-Rezeptoren. Diese Zelloberflächenrezeptoren besitzen alle zwei bis sechs extrazelluläre Cystein-reiche Domänen, über die sie ihre Liganden binden (Smith *et al.*, 1994). Je nach Zelltyp und Abhängigkeit von co-stimulierenden Signalen können über diese Proteine Signale übermittelt werden, die zur Proliferation und Differenzierung führen oder über das Überleben und den Tod der Zelle entscheiden (Ashkenazi & Dixit, 1998; Smith *et al.*, 1994; Wallach *et al.*, 1998). Weiterhin besitzen die Zelltodrezeptoren eine intrazelluläre Domäne (DD, **D**eath **D**omaine), die essentiell für die Übertragung apoptotischer Signale ist (Itoh & Nagata, 1993; Tartaglia *et al.*, 1993). Die Gruppe der humanen Zelltodrezeptoren umfasst die Rezeptoren CD95/Fas/APO-1 (Itoh *et al.*, 1991; Oehm *et al.*, 1992), p55TNF-R1 (Boone *et al.*, 2000; Brockhaus *et al.*, 1990), DR3/APO-3/WSL-1/TRAMP/LARD (Bodmer *et al.*, 1997; Chinnaiyan *et al.*, 1996; Kitson *et al.*, 1996; Marsters *et al.*, 1996; Screatton *et al.*, 1997), DR4/TRAIL-R1/APO-2 und DR5/TRAIL-R2/KILLER (Chaudhary *et al.*, 1997; Degli-Esposti *et al.*, 1997b; MacFarlane *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 1997; Walczak *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997b), DR6 (Pan *et al.*, 1998a) sowie den Neurotrophinrezeptor p75<sup>NTFR</sup> (Liepinsh *et al.*,



**Abbildung 3: Initiation der Apoptose am Rezeptorkomplex.** Durch Bindung des Liganden wird eine Rezeptortrimerisierung bzw. -oligomerisierung induziert. An den TNF-R1-Komplex wird FADD über TRADD rekrutiert, nach Stimulierung mit CD95L bindet FADD direkt an den Rezeptorkomplex. An FADD kann anschließend Procaspase-8 binden. Durch die räumliche Nähe kommt es zur autokatalytischen Aktivierung der Caspase.

1997). Die Liganden aller Zelltodrezeptoren mit Ausnahme derjenigen, die an  $p75^{NTRF}$  binden, gehören aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft zu der TNF-Superfamilie (Ashkenazi & Dixit, 1998; Schulze-Osthoff *et al.*, 1998). Sie werden als membranverankerte Trimere synthetisiert, können aber auch durch Metalloproteasen in die lösliche Form überführt werden (McGeehan *et al.*, 1994; Mohler *et al.*, 1994). Die Bindung der Ligandentrimere an ihren entsprechenden Rezeptor führt wiederum zu Rezeptortrimerisierung oder -oligomerisierung, die die anschließende Rekrutierung des Adaptermoleküls FADD/MORT-1 (**F**as-**a**ssociated Protein with **D**eath **D**omaine) erlaubt (Chinnaiyan *et al.*, 1995). FADD besitzt neben einer C-terminalen DD-Domäne, über die es mit dem Rezeptorkomplex in Wechselwirkung treten kann, außerdem eine N-terminale DED-Domäne (**D**eath **E**ffector **D**omaine), über die es Procaspasen-8 und -10 binden kann, die zwei DED-Domänen im Tandem besitzen (Medema *et al.*, 1997; Vincenz & Dixit, 1997). Die Aktivierung dieser Initiatorcaspase erfolgt autokatalytisch an dem signalübertragenden Rezeptorkomplex, welcher als DISC (**D**eath **I**nducing **S**ignalling **C**omplex) bezeichnet wird. Wie in Interaktionsstudien nachgewiesen werden konnte, bindet FADD nach entsprechender Stimulierung CD95 direkt, wohingegen die Rekrutierung zu TNF-R1 und DR3/TRAMP über das DD-Protein TRADD (**T**NF **R**eceptor-**a**ssociated Protein with **D**eath **D**omaine) erfolgt (Chinnaiyan *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1996; Kischkel *et al.*, 1995). Obwohl sequentiell keine große Übereinstimmung vorhanden ist, weisen DEDs, CARDS und DDs einen ähnlichen strukturellen Aufbau aus amphiphatischen anti-

parallelen  $\alpha$ -Helices auf, der eine homophile Interaktion mit ähnlichen Domänen anderer Proteine ermöglicht (Eberstadt *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1999). Diese homophilen Wechselwirkungen spielen eine große Rolle in der Regulierung apoptotischer Prozesse, in deren Verlauf große Proteinkomplexe gebildet werden, zu denen Caspasen rekrutiert und dort auch aktiviert werden (Muzio *et al.*, 1998).

### 3.5 Physiologische Rolle der Zelltodrezeptoren

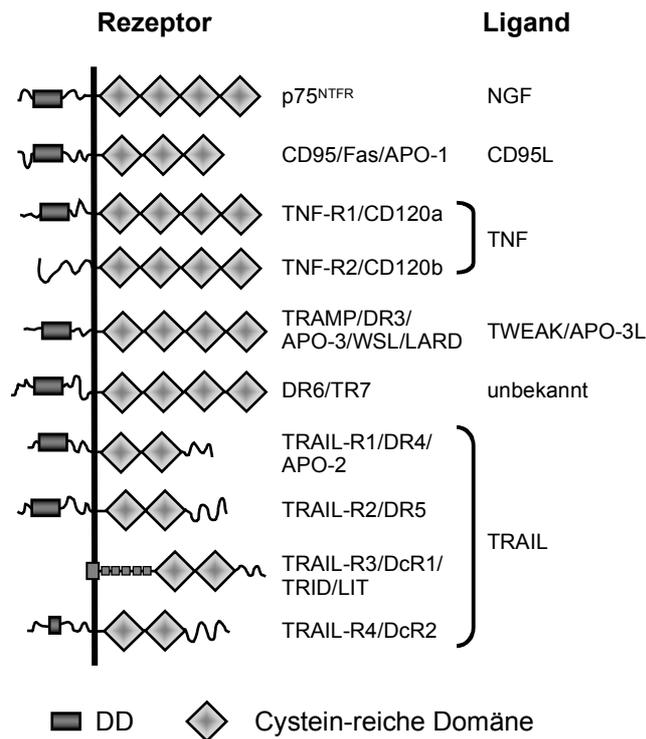
Die physiologische Rolle ist für die verschiedenen Zelltodrezeptoren und ihre Liganden bisher unzureichend geklärt. Viele dieser Rezeptoren und ihre Liganden werden auf lymphoiden Zellen exprimiert.

#### 3.5.1 CD95/CD95L-System

Die Aufgabe des CD95/CD95L-System ist u.a. die Beseitigung peripher aktivierter T-Zellen am Ende der Immunantwort sowie das Abtöten virusinfizierter und entarteter Zellen durch zytotoxische T-Zellen (Nagata & Golstein, 1995). Die Aktivierung des Zelltodrezeptors CD95, welcher auf Hepatozyten exprimiert wird, führt möglicherweise auch zum akuten Leberversagen während der Hepatitis B-Infektion (Kondo *et al.*, 1997). Durch die Beseitigung inflammatorischer Zellen an immunprivilegierten Stellen, z.B. am Auge, wird außerdem eine durch Entzündung hervorgerufene eventuelle Gewebsschädigung verhindert (Griffith *et al.*, 1995). Mäuse und Patienten mit defektivem CD95/CD95L-System weisen aufgrund der Akkumulation peripherer Lymphozyten vergrößerte Lymphknoten sowie eine B-Zell-Hyperaktivität auf, die in einer Produktion von Autoantikörpern resultieren kann. Im Laufe ihres Lebens entwickeln diese Mäuse und Patienten außerdem dem systematischen Lupus erythematodes ähnliche Autoimmunsyndrome (Takahashi *et al.*, 1994; Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992).

#### 3.5.2 TNF-System

TNF (tumor necrosis factor) wurde ursprünglich aufgrund seiner Eigenschaft, in transplantierten Tumoren hämorrhagische Nekrosen auszulösen, identifiziert (Carswell *et al.*, 1975). In einigen Zellarten kann TNF $\alpha$  über TNF-R1 Apoptose initiieren. Die Apoptoseinduktion durch TNF $\alpha$  ist jedoch komplex, da in vielen Zellsyste-



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zelltodrezeptoren.**

Diese Subgruppe der TNF-Rezeptorfamilie besitzt extrazellulär mindestens zwei Cystein-reiche Domänen, intrazellulär eine DD (Death Domäne), die wichtig für die Apoptoseinduktion ist. TNF bindet sowohl an den Zelltodrezeptor TNF-R1 als auch an den Rezeptor TNF-R2. TRAIL kann an vier Rezeptoren binden. Über TRAIL-R1 und -2, die beide eine funktionelle DD besitzen, kann Apoptose initiiert werden. TRAIL-R3/DcR1 ist Glykosylphosphatidylinositol-verankert, TRAIL-R4/DcR2 besitzen lediglich eine trunkierte DD. Da diese beiden Rezeptoren wie auch TNF-R2 keine funktionelle DD besitzen, kann über sie kein programmierter Zelltod eingeleitet werden (nach Schulze-Osthoff *et al.*, 1998).

men eine gleichzeitige Unterdrückung der Genexpression notwendig ist. Hauptsächlich wird TNF jedoch nach einer Infektion von aktivierten Makrophagen und T-Zellen gebildet. In diesen wird über Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 die Neusynthese inflammatorischer immunmodulatorischer Proteine angeregt (Fiers *et al.*, 1995; Tartaglia & Goeddel, 1992). Das Verständnis der TNF-Signale wird dadurch erschwert, dass der Faktor nicht nur an den Zelltodrezeptor TNF-R1, sondern auch an den Rezeptor TNF-R2, der keine DD-Domäne enthält, binden kann. TNF<sup>-/-</sup>-Mäuse sind resistent gegenüber Lipopolysaccharid/Galactosamin vermittelter Toxizität und intrazellulären Pathogenen (Marino *et al.*, 1997; Pasparakis *et al.*, 1996). Außerdem zeigen diese Mäuse ebenso wie TNF-R1<sup>-/-</sup>-Mäuse Defekte in der Organogenese des lymphozytären Systems (Pasparakis *et al.*, 1997). TNF-R2 scheint dagegen in durch Lipopolysaccharid induzierte Leukostase ebenso wie in die Pathogenese cerebraler Malaria involviert zu sein (Garcia *et al.*, 1995).

### 3.5.3 Das DR3/TRAMP- und TRAIL-System

Relativ wenig ist über die weiteren Rezeptorsysteme bekannt. DR-3/TRAMP, der auf Thymozyten und Lymphozyten exprimiert ist, scheint eine Rolle in der Lymphozytenreifung zu spielen (Bodmer *et al.*, 1997; Chinnaiyan *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu kann TRAIL (TNF-related Apoptosis Inducing Ligand) in vielen Geweben nachge-

wiesen werden. Durch Bindung an die DD-Rezeptoren TRAIL-R1 und -R2 kann der Ligand apoptotische Prozesse sowie eine durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B kontrollierte Genexpression induzieren (Schneider *et al.*, 1997). Weiterhin interagiert TRAIL mit den Rezeptoren DcR1/TRAIL-R5 und DcR2/TRAIL-R4, von denen beide keine funktionelle DD-Domäne besitzen (Degli-Esposti *et al.*, 1997a; Degli-Esposti *et al.*, 1997b; Mongkolsapaya *et al.*, 1998). Überexpression von den letztgenannten Rezeptoren schützt die Zellen nach TRAIL-Behandlung vor dem Zelltod. Es konnte in Mäusen und Affen gezeigt werden, dass TRAIL spezifisch und ohne größere Nebenwirkungen viele Tumore abtöten kann. Im Gegensatz zu CD95L verursacht der Ligand TRAIL keine Toxizität nach Verabreichung in therapeutischer Konzentration, was ihn zu einem potentiellen Kandidaten für die Krebsbehandlung macht (Lawrence *et al.*, 2001; Nagata, 2000).

### 3.6 Inhibitoren der Apoptose

Die Regulation der apoptotischen Signale erfolgt auf verschiedenen Ebenen. Zum einen kann eine Erhöhung der Expressionsdichte von Zelltodrezeptoren die Sensitivität der Zelle gegenüber Liganden-induzierter Apoptose beeinflussen. DD-defiziente Rezeptoren, z.B. DcR1/TRAIL-R4 und DcR2/TRAIL-R5 im TRAIL-System, wirken in diesem Fall antagonistisch zu den Rezeptoren mit einer funktionelle DD-Domäne durch konkurrierende Bindung des Liganden. Zum anderen kann intrazellulär die Rekrutierung der Initiatorcaspasen zum Rezeptorsignalkomplex durch FLIP (**FLICE**-inhibitory **P**rotein) gehemmt werden (Thome *et al.*, 1997). Die Entscheidung über die Exekution der Apoptose nach endogenen Stimuli, z.B. nach Wachstumsfaktorentzug, DNA-Schädigung und vielen Formen des zellulären Stress', erfolgt auf der mitochondrialen Ebene und wird durch die Proteine der Bcl-2-Familie kontrolliert (Green, 1998). Desweiteren können bereits prozessierte Caspasen durch intrazelluläre Inhibitoren der Apoptose, den sogenannten IAPs (Inhibitors of **A**poptosis **P**roteins), gehemmt werden (Yang & Li, 2000).

#### 3.6.1 FLIP

Im Jahr 1997 wurde ein virales Protein beschrieben, das lediglich aus zwei DEDs besteht und effektiv Apoptose nach Stimulierung der Zelltodrezeptoren blockiert (Bertin *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1997; Thome *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden,

dass dieses Protein die Rekrutierung von Procaspase-8/FLICE zum Rezeptorsignalkomplex inhibiert, und wurde deshalb vFLIP (**FLICE-inhibitory Protein**) genannt.

Kurz darauf wurde das zelluläre Homolog cFLIP, das auch Casper, I-FLICE, FLAME-1, CASH, CLARP oder MRIT genannt wird, von mehreren Gruppen kloniert (Goltsev *et al.*, 1997; Han *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1997; Inohara *et al.*, 1997b; Irmiler *et al.*, 1997; Shu *et al.*, 1997; Srinivasula *et al.*, 1997). cFLIP kann in zwei Splice-Varianten exprimiert werden: in der kurzen Form FLIP<sub>S</sub>, die wie vFLIP nur aus zwei DEDs besteht, und in der längeren Form FLIP<sub>L</sub>, die zusätzlich eine C-terminale Caspasen-ähnliche Domäne besitzt. Da im katalytischen Zentrum dieser Domäne das Cystein durch Tyrosin ersetzt ist, besitzt FLIP<sub>L</sub> keine proteolytische Aktivität. Bei beiden Formen konnte gezeigt werden, dass auch diese Caspasenaktivierung nach Rezeptorstimulierung hemmen.

Untersuchungen in aktivierten T-Zellen ergaben, dass cFLIP in der frühen Phase der T-Zellaktivierung stark exprimiert wird, in der späten Phase die Expression herunter reguliert wird. Diese Daten stimmen mit der Beobachtung überein, dass T-Zellen in der frühen Phase ihrer Aktivierung resistent, in der späten aber sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind (Peter *et al.*, 1997).

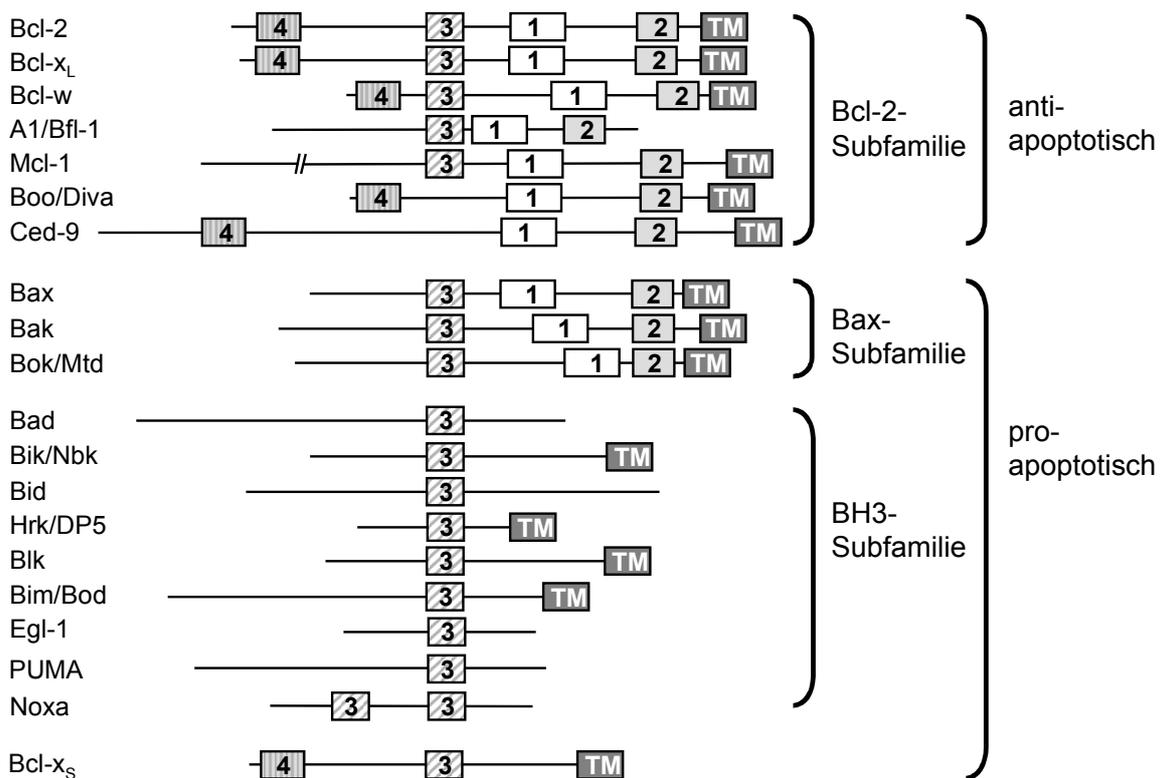
### 3.6.2 Die Bcl-2-Proteinfamilie

Bcl-2 wurde bei einer Analyse der chromosomalen t(14;18)-Translokation kloniert, in der die kodierende *bcl-2*-Sequenz von Chromosom 18 in die Nachbarschaft der IgH-Promotorenhancer-Region (E $\mu$ ) auf Chromosom 14 versetzt wurde (Bakhshi *et al.*, 1985; de Jong *et al.*, 1989; Tsujimoto *et al.*, 1985). Dies führt zu einer starken Überexpression des onkogenen Proteins, die in nahezu 80% der Patienten mit hämatologischen Erkrankungen nachgewiesen werden konnte (Lee *et al.*, 1987). In den darauf folgenden Jahren beobachteten mehrere Gruppen, dass Bcl-2-überexprimierenden Zellen hämatopoetischen Ursprungs nach Wachstumsfaktorentzug keine Apoptose einleiten, sondern in die G<sub>0</sub>-Phase eintreten (McDonnell *et al.*, 1990; Vaux *et al.*, 1988).

Bis heute wurde eine große Zahl weiterer zu Bcl-2 homologe Proteine beschrieben, von denen einige vor Apoptose schützen, andere dagegen den programmierten Zelltod auslösen (Adams & Cory, 1998; Strasser *et al.*, 2000). Die Mitglieder der stetig weiter wachsenden Familie werden folglich nach ihrer Funktion in anti- und proapoptotische Proteine eingeteilt. Zu den anti-apoptotischen Proteinen gehören neben

Bcl-2 auch Bcl-x<sub>L</sub> (Boise *et al.*, 1993), Bcl-w (Gibson *et al.*, 1996), A1/Bfl-1 (Choi *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1996), Mcl-1 (Kozopas *et al.*, 1993), Boo/Diva (Inohara *et al.*, 1998; Song *et al.*, 1999), das *C. elegans*-Protein Ced-9 (Hengartner *et al.*, 1992) sowie eine weitere Anzahl viraler Proteine, die mindestens drei der vier homologen Domänen (BH1-BH4 für **Bcl-2 Homology Domäne**) besitzen. Die pro-apoptotischen Proteine Bax (Oltvai *et al.*, 1993), Bak (Chittenden *et al.*, 1995; Farrow *et al.*, 1995; Kiefer *et al.*, 1995) und Bok/Mtd (Hsu *et al.*, 1997) besitzen die Domänen BH1 bis BH3, die potentesten Apoptoseinduktoren sind jedoch Proteine, die nur eine BH3-Domäne besitzen, u.a. Bid (Wang *et al.*, 1996), Bad (Yang *et al.*, 1995a), Bim/Bod (Hsu *et al.*, 1998; O'Connor *et al.*, 1998), Bik/Nbk (Boyd *et al.*, 1995; Han *et al.*, 1996), Hrk/DP5 (Inohara *et al.*, 1997a), Blk (Hegde *et al.*, 1998), die erst kürzlich entdeckten Noxa (Oda *et al.*, 2000a) und Puma (Nakano & Vousden, 2001; Yu *et al.*,

### Die Bcl-2-Familie



**Abbildung 5: Struktureller Vergleich der Mitglieder der Bcl-2-Familie.** Die Familie der zu Bcl-2 homologen Proteine umfasst anti-apoptotische sowie pro-apoptotische Proteine. Die pro-apoptotische Gruppe wird weiter in zwei Subgruppen unterteilt: zur einen gehören Proteine, die die Domänen BH1-3 besitzen (Bax-ähnliche), zur anderen gehören Proteine, die nur die BH3-Domäne besitzen (BH3-Subgruppe). Die Bcl-2-homologen Domänen BH1 bis BH4 sind durch entsprechende Ziffern in den Kästchen gekennzeichnet. Viele Mitglieder dieser Proteinfamilie besitzen außerdem C-terminal eine Transmembrandomäne (TM). Noxa, eine Mitglied der BH3-Subfamilie besitzt zwei mögliche BH3-Domänen (nach Strasser *et al.*, 2000).

2001) sowie das *C.elegans*-Protein Egl-1 (Conradt & Horvitz, 1998). Bcl-x<sub>S</sub>, eine Splicevariante des *bcl-x*-Gens, die keine BH1- und BH2-Domäne besitzt, wirkt ebenfalls pro-apoptotisch (Boise *et al.*, 1993).

Die meisten Mitglieder dieser Familie weisen außerdem C-terminal eine hydrophobe Sequenz auf, die ihnen eine Verankerung in Membranen verschiedener Organellen ermöglicht. Einige Proteine sind in ihrer Lokalisation festgelegt, andere, z.B. Bax und Bid, sind zunächst zytosolisch, bevor sie aktiviert werden und zu Mitochondrien translokalisieren (Goping *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998b; Luo *et al.*, 1998). Bid-Aktivierung erfolgt durch Caspase-8-vermittelte Proteolyse, die Aktivierung von Bax ist bisher unzureichend geklärt.

Bcl-2 ist selber in der äußeren Mitochondrienmembran, am ER und perinukleär zu finden (Chen-Levy *et al.*, 1989; Krajewski *et al.*, 1993). Ähnliche Lokalisierungen weisen Bcl-x<sub>L</sub>, A1 und Mcl-1 auf (Duriez *et al.*, 2000; Gonzalez-Garcia *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1995b). Die Onkogene Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> besitzen neben den vier homologen Regionen eine sogenannte Loop-Region zwischen BH3 und BH4 sowie eine negativ geladene Übergangsregion zwischen den  $\alpha$ -Helices 5 und 6. Mutationsanalysen zeigten, dass die Domänen BH1, BH2 und BH3 essentiell für die Interaktion mit einigen pro-apoptotischen Familienmitgliedern und das Überleben der Zellen nach vielen apoptotischen Stimuli sind. Diese drei Domänen formen eine hydrophobe Tasche, in die pro-apoptotische Proteine über ihre eigene BH3-Domäne binden (Oltvai *et al.*, 1993; Sattler *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1996). Durch diese Wechselwirkung können sich die Bcl-2-ähnlichen Proteine in ihrer Funktion gegenseitig neutralisieren. Diese Interaktion ist aber nicht immer essentiell für den protektiven Effekt. Bestimmte Mutationen in den Domänen BH1-3 verhindern eine Heterodimerisierung des Bcl-x<sub>L</sub>-Proteins mit Bax, obwohl das mutierte Protein immer noch anti-apoptotische Eigenschaften besitzt. Veränderungen der  $\alpha$ -Helices 5 und 6 führt dagegen zur Aufhebung der Protektion (Minn *et al.*, 1999).

Die Loop-Region weist mehrere Phosphorylierungsstellen auf, die möglicherweise wichtig für die Stabilität und Funktion des Proteins sind. Von einer Gruppe wurde nachgewiesen, dass hypophosphoryliertes Bcl-2 schneller proteolytisch degradiert, während andere zeigten, dass die Phosphorylierung von Serin70 in der Loop-Region das Überleben nach Wachstumsfaktorentzug und Etoposid- oder Adriamycinbehandlung verlängern kann (Dimmeler *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 1997; Ruvolo *et al.*, 1998).

Einen Einblick in weitere potentielle Wirkungsmechanismen lieferten Röntgenstrukturanalysen, die enthüllten, dass Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Bax eine große strukturelle Ähnlichkeit mit dem kanalformierenden Diphtherietoxin besitzen (Muchmore *et al.*, 1996; Petros *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2000). Tatsächlich sind diese drei Proteine in der Lage, Ionenkanäle in artifiziellen Membranen zu bilden (Antonsson *et al.*, 1997; Minn *et al.*, 1997; Schendel *et al.*, 1997).

Weiterhin wurde beschrieben, dass die BH4-Domäne essentiell für die protektive Wirkung von Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> ist, da eine Deletion dieser Domäne zur Inaktivierung der Proteine führt (Huang *et al.*, 1998). Außerdem kontrolliert das am Tyrosin28 phosphorylierte Bcl-2 den Zellzyklus, indem es den Eintritt in die G<sub>1</sub>/S-Phase verzögert (Vairo *et al.*, 2000). Diese Funktion erfolgt unabhängig von der anti-apoptotischen Wirkung, da Bcl-2 mit der Mutation Y28A in der BH4-Domäne immer noch vor Apoptoseinduktion schützt, obwohl es den Zellzyklus nicht mehr beeinflussen kann (Huang *et al.*, 1997; Vairo *et al.*, 1996).

Die Mitglieder der Bcl-2-Familie werden auf transkriptioneller Ebene sowie posttranslational reguliert. Eine Hochregulierung von Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> konnte in einigen Zellsystemen nach Stimulierung der Zellen mit Wachstumsfaktoren oder Mitogenen beobachtet werden (Boise *et al.*, 1995; Teague *et al.*, 1997; von Freeden-Jeffry *et al.*, 1997), während verstärkte Bax-Expression nach Schädigung der DNA durch Bestrahlung erfolgte (Kitada *et al.*, 1996). Posttranslational ist nicht nur die Phosphorylierung der anti-apoptotischen Proteine von Bedeutung; Bad wird durch die Serinkinase Akt phosphoryliert und dadurch inaktiviert (Datta *et al.*, 1997; del Peso *et al.*, 1997; Zha *et al.*, 1996). Neben Bid, das durch Caspasen-vermittelte Proteolyse aktiviert wird, werden auch Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und *C. elegans* Ced-9 unter bestimmten Bedingungen von Caspasen gespalten (Clem *et al.*, 1998; Kirsch *et al.*, 1999; Xue & Horvitz, 1997).

### 3.6.3 IAPs

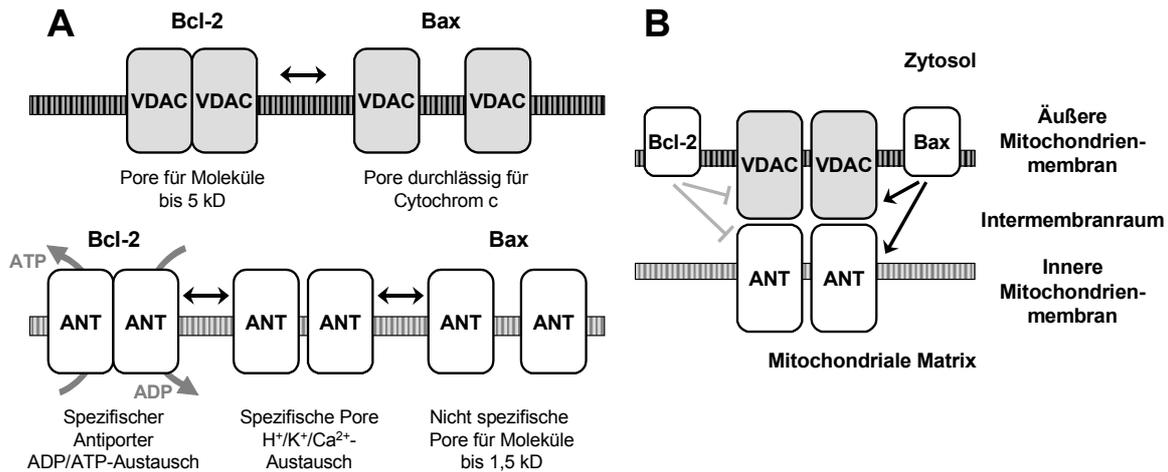
Die Familie dieser endogenen Inhibitoren umfaßt NAIP, XIAP/MIHA, cIAP-1, cIAP-2 und Survivin (Deveraux & Reed, 1999). Als gemeinsames Motiv besitzen alle IAPs N-terminal sogenannte BIR-Domänen (**B**aculovirus **I**AP **R**epeats), die wichtig für ihre anti-apoptotische Wirkung ist. XIAP, cIAP-1 und -2 weisen C-terminal außerdem ein RING-Finger-Motiv auf, dessen Funktion jedoch unklar ist.

XIAP, cIAP-1 und cIAP-2 sind in der Lage, aktive Caspasen direkt zu blockieren (Deveraux *et al.*, 1997; Duckett *et al.*, 1996; Roy *et al.*, 1997; Uren *et al.*, 1996). Alle drei Inhibitoren hemmen über ihre zweite BIR-Domäne Caspase-3 und Caspase-7, XIAP jedoch mit größerer Affinität als die beiden anderen. Außerdem kann XIAP durch die Interaktion über seine dritte BIR-Domäne Caspase-9 binden und ihre Aktivität unterdrücken (Deveraux *et al.*, 1999). NAIP wurde aufgrund einer partiellen Deletion in einer Subgruppe von Patienten mit spinaler Muskelatrophie gefunden (Roy *et al.*, 1995). Survivin, das nur eine BIR-Domäne besitzt, wird in vielen malignen Erkrankungen überexprimiert (Ambrosini *et al.*, 1997). Während des G2/M-Übergangs im Zellzyklus wird der Apoptoseinhibitor hochreguliert (Li *et al.*, 1998a). Von den beiden zuletzt genannten Inhibitoren konnte bisher keine direkte Interaktion mit aktiven Caspasen nachgewiesen werden.

### 3.7 Funktion der Mitochondrien in der Apoptose

Eine sehr genaue Regelung der apoptotischen Prozesse nach diversen Stimuli findet am Mitochondrium statt. Hierbei spielen die verschiedenen Mitglieder der Bcl-2-Familie eine große Rolle. Stimulierung der Zelltodrezeptoren, Inkubation mit Staurosporin oder Wachstumsfaktorentzug führt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) und zu einer damit assoziierten mitochondrialen Schwellung, die durch Bcl-x<sub>L</sub> verhindert werden kann (Vander Heiden *et al.*, 1997). Da die Oberfläche der inneren Membran viel größer ist als die der äußeren, wurde postuliert, dass die Ausdehnung der mitochondrialen Matrix zum Platzen der äußeren Membran und zur Freisetzung von apoptotischen Proteinen aus dem Intermembranraum führt. Unter den freigesetzten Proteinen ist Cytochrom c zu finden, das zusammen mit dATP und Apaf-1 Caspase-9 aktiviert, sowie AIF (**A**poptosis **I**nducing **F**actor), ein Flavoprotein, das unabhängig von Caspasenaktivierung die DNA-Degradierung in hochmolekulare Fragmente von ca. 50 kb induziert (Li *et al.*, 1997; Narita *et al.*, 1998; Susin *et al.*, 1999). Es gibt aber auch Hinweise, dass Bax und Bid die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium induzieren, ohne dass es zur Schwellung der mitochondrialen Matrix kommt (Jurgensmeier *et al.*, 1998; Kluck *et al.*, 1999).

Wie kommt es zum  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch? Der Adeninnukleotidtransporter ANT und der spannungsabhängige Anionenkanal VDAC (**V**oltage **D**eependent **A**nion **C**hannel) werden am Mitochondrium stark exprimiert, ANT an der inneren und VDAC an der



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der PT-Pore.** A) ANT und VDAC können unspezifische Kanäle bilden. Nach dem apoptotischen Stimulus wird VDAC durchlässig für Cytochrom c. B) Zusammen formieren ANT und VDAC eine Pore, deren Bildung durch Bax stimuliert, durch Bcl-2 jedoch blockiert wird. (nach Constantini *et al.*, 2000)

äußeren Mitochondrienmembran. ANT, das normalerweise ADP in die mitochondriale Matrix und ATP heraus transportiert, kann unter bestimmten Bedingungen einen Kanal bilden, der Ionen mit unterschiedlicher Spezifität leiten kann (Brustovetsky & Klingenberg, 1996; Ruck *et al.*, 1998). VDAC ist ein spannungsabhängiger Kanal, der normalerweise die Diffusion kleinerer Proteine mit einer Ausschlußgröße bis zu 5 kD aus dem Intermembranraum ins Zytosol erlaubt. Jedoch ist VDAC ebenfalls in der Lage, das ca. 14 kD große Cytochrom c auf einem durch Bax kontrollierten Weg durchzulassen (Costantini *et al.*, 2000).

ANT und VDAC können unter bestimmten Umständen einen unspezifischen auch als PT-Pore (**P**ermeability **T**ransition **P**ore) bezeichneten Kanal mit hoher Leitfähigkeit bilden, dessen Permeabilität durch verschiedene Proteine reguliert wird: Cyclophilin D bindet in der Matrix an ANT und fördert die Aktivierung des Megakanals (Crompton *et al.*, 1998). Es wurden ebenso Wechselwirkungen von Bax und Bcl-2 mit der Pore nachgewiesen. Während Bax die Öffnung des Kanals stimuliert, unterdrückt Bcl-2 diese jedoch (Brenner *et al.*, 2000; Marzo *et al.*, 1998a; Marzo *et al.*, 1998b; Shimizu *et al.*, 2000a; Shimizu *et al.*, 2000b; Shimizu *et al.*, 1999). Weiterhin kann die Öffnung dieses Megakanals sowohl durch Erhöhung der mitochondrialen Calciumkonzentration und des pH-Wertes, als auch durch Oxidation der Thiolreste des ANT an der Matrixseite gesteuert werden (Costantini *et al.*, 2000).

Die eben beschriebenen Beobachtungen führen zu der Annahme, dass anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Familie die mitochondriale Homöostase aufrechter-

halten, die pro-apoptotischen Mitglieder jedoch durch Öffnung der PT-Pore und den damit verbundenen  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch die Mitochondrien schädigen.

### 3.8 Zielsetzung

Die Strahlentherapie spielt eine wesentliche Rolle bei der Behandlung von Tumoren als alleinige Therapie, bzw. adjuvant in Kombination mit chirurgischen oder chemotherapeutischen Maßnahmen. Wenig ist jedoch über die molekularen Mechanismen bekannt, die die Strahlensensitivität beeinflussen und zur Tumorregression führen. Offenbar induziert ionisierende Strahlung Doppelstrangbrüche. Zur Beseitigung dieser werden Reparaturenzyme angeschaltet. Unvollständige oder fehlerhafte DNA-Reparatur kann zum Zelltod führen. Strahlensensitivität könnte möglicherweise aber auch durch Moleküle beeinflusst werden, die die Apoptose regulieren.

In vorangegangenen Experimenten dieser und anderer Arbeitsgruppen konnte eine Aktivierung von Caspase-8 sowie die Heraufregulierung von FasL nach Bestrahlung und Behandlung mit Zytostatika nachgewiesen werden (Belka *et al.*, 1998; Friesen *et al.*, 1996; Fulda *et al.*, 1998; Herr *et al.*, 1997). Diese Ergebnisse implizieren eine Caspasenaktivierung, die sekundär zum Zelltodrezeptor ist. Im Kontrast zu diesen Beobachtungen stehen andere Befunde, die eine vom Zelltodrezeptor unabhängige Caspase-8-Prozessierung beschreiben (Belka *et al.*, 1999a; Belka *et al.*, 1999b; Ferrari *et al.*, 1998; Wesselborg *et al.*, 1999).

Weiterhin ist unklar, auf welcher Ebene apoptotische Prozesse nach Bestrahlung reguliert werden. Induktion der Apoptose führt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, der in einigen Zellsystemen von Caspasenaktivierung abhängig zu sein scheint (Murphy *et al.*, 1999). Aber auch hier gibt es widersprüchliche Beobachtungen, die für eine Caspasenaktivierung sekundär zum  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch sprechen (Belka *et al.*, 1999a; Belka *et al.*, 1999b). Caspase-9, die im oligomeren Komplex aus Apaf-1, Cytochrom c und dATP prozessiert wird, wäre demnach die apikale Caspase, die nach dem  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch aktiviert wird. Untersuchungen an verschiedenen Zellen von Caspase-9<sup>-/-</sup>-Mäusen deuten darauf hin, dass die Reihenfolge der mitochondrialen Schädigung und Caspasenaktivierung von Zelltyp und Stimulus abhängig ist (Hakem *et al.*, 1998). Embryonale Stammzellen und Fibroblasten Caspase-9-defizienter Mäuse waren resistent gegenüber Apoptose, die durch Etoposid, Cis-Platin, UV- und  $\gamma$ -Bestrahlung induziert wurde.

Obwohl Caspase-9-defiziente Thymozyten und Splenozyten ebenfalls resistent waren gegenüber Dexamethason und  $\gamma$ -Bestrahlung, zeigten diese Zellen nach UV-Bestrahlung und Stimulierung über den Zelltodrezeptor die charakteristische apoptotische Morphologie. Ebenso führten die Untersuchungen der Bcl-2- und Bcl-x<sub>L</sub>-vermittelten Protektion zu unterschiedlichen Ergebnissen, die jedoch von dem verwendeten Zelltyp und/oder Stimulus abhingen (Scaffidi *et al.*, 1998).

Ebenso ist der Mechanismus, der zum  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch führt, unzureichend verstanden. Nach DNA-Schädigung und durch zellulären Stress wird der Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor p53 aktiviert, der die Bax-Expression hochregelt (Miyashita & Reed, 1995). Bax, ein Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie, das normalerweise zytosolisch exprimiert wird, kann nach einem apoptotischen Stimulus zum Mitochondrium translokalisieren und dort mit der PT-Pore interagieren (Gross *et al.*, 1998). Durch diese Wechselwirkung wird die Öffnung der PT-Pore, eines unspezifischen Kanals aus VDAC und ANT mit hoher Leitfähigkeit, induziert (Costantini *et al.*, 2000; Marzo *et al.*, 1998b). Die Öffnung hat den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials sowie die Ausschüttung von Cytochrom c ins Zytosol und die Aktivierung von Caspase-9 am Apoptosom zur Folge. Der pro-apoptotische Effekt von Bax kann durch Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> aufgehoben werden (Marzo *et al.*, 1998b). Jedoch sind auch andere Modelle für die Rolle der Mitochondrien in der Apoptose denkbar. Bossy-Wetzel *et al.* konnten zeigen, dass Cytochrom c-Freisetzung auch ohne die Involvierung der PT-Pore möglich ist (Bossy-Wetzel *et al.*, 1998).

Im Verlauf dieser Arbeit sollte deshalb geklärt werden, welcher Stimulus zu einem Caspase-abhängigen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt und wie die mitochondriale PT-Pore dabei beeinflusst wird. Desweiteren wurde die Rolle von Bcl-2 im apoptotischen Signalweg nach Bestrahlung oder Stimulierung von CD95 untersucht. Da Bcl-2 nicht nur am Mitochondrium, sondern auch am ER und perinukleär exprimiert wird, wurden die Analysen auf das endoplasmatisch exprimierte Protein ausgeweitet. Obwohl einige Signalwege der apoptotischen Kaskade relativ gut verstanden sind, bleibt der Zusammenhang zwischen dem programmierten Zelltod und der Strahlensensitivität weiterhin im Dunkeln. Deshalb wurde überprüft, ob die Überexpression von Bcl-2 in Zellen zu einem Überlebensvorteil führt. Die Beantwortung der letzten Frage ist besonders wichtig für das Verständnis der Ausbildung von Strahlenresistenzen in Tumoren.

## 4 MATERIAL

### 4.1 Reagenzien

$^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP, 3000 Ci/mmol	DuPont
Ampicillin	Sigma
AP-1-ds-Oligonukleotid (20 ng/ $\mu\text{l}$ )	Santa-Cruz-Biotechnologies
Aprotinin	Roth
Bromphenolblau	Sigma
BSA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	New England BioLabs
CCCP	Sigma
CSPD <sup>®</sup> -Substratlösung Tropix	Applied Biosystems, MA, USA
DEVD-CHO	Calbiochem
Gel 30 (30%-ige AA/BisAA-Lösung, 37,5:1)	Roth
Gel 40 (40%-ige AA/BisAA-Lösung 29:1)	Roth
Hoechst 33342	Calbiochem
LEHD-FMK	Calbiochem
Leupeptin	Sigma
NFAT-ds-Oligonukleotid (20 ng/ $\mu\text{l}$ )	Santa-Cruz-Biotechnologies
Poly-dIdC	Roche Molecular Biochemicals
Ponceau-S-Lösung	Sigma
Propidiumiodid	Calbiochem
Proteinmarker für SDS-PAGE	Amersham
Protein-Farbstoffkonzentrat	BioRad
Puffer für T4-Polynukleotidkinase, 10x	Promega
SDS-Laufpuffer	BioRad
SOC-Medium	Gibco BRL/Life Technologies
TBE-Puffer, 5x	Roth
TMRE	Molecular Probes, Mobitech
T4-Polynukleotidkinase (10U/ $\mu\text{l}$ )	Promega
zVAD-FMK	Calbiochem

Alle weiteren hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Deidenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

## 4.2 Puffer und Lösungen

- AP-Puffer: 100 mM NaCl  
100 mM Tris  
auf pH 9,5 mit HCl einstellen.
- Blocklösung/Blotto: TBS + 0,05% (v/v) Tween + 5% (v/v) FCS
- NFAT-Puffer, 10x:  
(für Gelshift-Analysen) 50 % (v/v) Glycerin  
600 mM KCl  
300 mM NaCl  
100 mM HEPES/NaOH, pH 7,9  
50 mM MgCl<sub>2</sub>  
30 mM Tris/HCl, pH 7,9  
10 mM DTT  
2 mM EDTA
- PBS: 8,0 g/l NaCl  
1,5 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
0,2 g/l KCl  
0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,4-7,6
- Puffer A (für Gelshift-Analyse): 10 mM HEPES/NaOH, pH 7,9  
10 mM KCl  
100 µM EDTA  
100 µM EGTA  
pH 7,9
- Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt und vor Gebrauch wurden pro 1 ml Puffer 1 µl DTT (1 M)  
und 1,25 µl PMSF (0,2 M) hinzugefügt.
- Puffer C (für Gelshift-Analyse): 400 mM KCl  
20 mM HEPES/NaOH, pH 7,9  
1 mM EDTA  
1 Mm EGTA  
10% (v/v) Glycerin  
pH 7,9
- Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt und vor Gebrauch wurden pro 1 ml Puffer 1 µl DTT (1 M)  
und 1,25 µl PMSF (0,2 M) hinzugefügt.

---

SDS-Lysepuffer:	125 mM NaCl
	25 mMol HEPES
	10 mM NaF
	10 mM Natrium-pyrophosphat
	10 mM EDTA
	1,0% (v/v) Triton X-100
	0,5% (w/v) Desoxycholat
	0,1% /w/v) SDS

Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt und vor Gebrauch wurden pro 1 ml Puffer 20 µl DTT Aprotinin/Leupeptin (je 5 mg/ml) hinzugefügt.

SDS-Probenpuffer:	2 ml Glycerin
	2 ml SDS, 10%
	0,025 g Bromphenolblau
	2,5 ml Sammelpuffer
	ad 10 ml bidest. Wasser

SDS-Sammelpuffer:	60,6 g/l Tris
	0,4% (w/v) SDS
	auf pH 6,8 mit HCl einstellen.

SDS-Trennpuffer:	18,17 g/l Tris
	0,4% (w/v) SDS
	auf pH 8,8 mit HCl einstellen.

TBS:	150 mM NaCl
	10 mM Tris
	ad 1000 ml dest. Wasser
	pH 8,0

TBS-Triton:	TBS + 0,02 % (v/v) Triton X-100
-------------	---------------------------------

TBS-Tween:	TBS + 0,05% (v/v) Tween
------------	-------------------------

Transferpuffer/Westernblot:	192 mM Glycin
	25 mM Tris
	0,1% (w/v) SDS
	10% (v/v) Methanol
	pH 8,3

### 4.3 Zellkultur

DMSO (für Zellkultur)	Sigma
Fetales Kälberserum	Gibco, Life Technologies
Ficoll (Biocoll), d=1,077 g/l	Biochrom-Seromed
G418 (Genicitin)	Gibco, Life Technologies
RPMI 1640	Gibco, Life Technologies
(100 mg/l Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 400 mg/l KCl, 100 mg/ml MgSO <sub>4</sub> , 6 g/l NaCl, 2 g/l NaHCO <sub>3</sub> , 800 mg/ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	
Penicillin/Streptomycin	Biochrom-Seromed
(10.000 U/ml, 10.000 µg/ml)	

### 4.4 Antikörper und Liganden

#### 4.4.1 Antikörper zur Westernblotanalyse

##### Primärantikörper:

mouse-anti-Bcl-2, 1:2000	Santa-Cruz-Biotech
mouse-anti-Caspase-3, 1:1000	BD Transduction Laboratories
mouse-anti-Caspase-8, 1:45	freundlicherweise erhalten von K. Schulze-Osthoff, Universität Münster
rabbit-anti Bcl-x, 1:1000	BD Transduction Laboratories
rabbit-anti-active-Caspase-3, 1:1000	Cell Signalling
rabbit-anti-active-Caspase-9, 1:1000	Cell Signalling
rabbit-anti-Caspase-12 (Ab-2), 1:1000	Oncogene™ Research Products
rabbit-anti-PARP, 1:1000	Cell Signalling
rat-anti-Bid, 1:2000	freundlicherweise erhalten von J. Yuan, Boston, MA, USA

##### Sekundärantikörper:

anti-mouse, AP-konjugiert	Santa-Cruz-Biotech
anti-rabbit, AP-konjugiert	Santa-Cruz-Biotech
anti-rat, AP-konjugiert	Santa-Cruz-Biotech

#### 4.4.2 Antikörper zur Immunfluoreszenzanalyse

Primärantikörper:

mouse-anti-Cytochrom c (65971A)	PharMingen
mouse-anti-SERCA	UBI Biomol
rabbit-anti-Bcl-2	Santa-Cruz-Biotech

Sekundärantikörper:

anti-mouse-Alexa488	Molecular Probes, Mobitech
anti-rabbit-Cy5	Dianova

#### 4.4.3 Antikörper und Liganden zur Stimulierung der Zellen:

anti-CD95/Fas/APO-1-IgM-Antikörper, Klon CH11	Upstate Biotechnology
rekombinantes, humanes TRAIL	Alexis
<i>Enhancer</i>	Alexis

### 4.5 Zellen

Jurkat-E6-T-Zell-Lymphoma wurden von American Type Culture Collection (ATCC), Bethesda, MD, USA bezogen.

Caspase-8-negative Jurkat-Zellen und die zugehörigen Kontrollzellen A3, ein Jurkat-Subklon, wurden uns freundlicherweise von J. Blenis, Boston, MA, USA überlassen. Bcl-2-überexprimierende Jurkat-Zellen und die respektiven Vektor-Kontrollzellen erhielten wir von H. Walczak (DKFZ, Heidelberg).

Jurkat-E6-Zellen, die Bcl-2/WT, Bcl-2/MT, Bcl-2/ER, bzw. Bcl-2/ $\Delta$ TM überexprimieren, sowie die jeweiligen Vektor-Kontrollzellen wurden eigenständig stabil transfiziert. Der leere Vektor pRC/cmv sowie die Vektoren mit den entsprechenden Bcl-2-Konstrukten wurden uns von B. Leber (Ontario, Kanada) zur Verfügung gestellt.

### 4.6 Bakterien

Es wurden kompetente Bakterien *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , Genotyp: *deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*( $r_k^- m_k^+$ ), *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*,  $\Delta$ (*lacZYA-argFV169*),  $\phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15, F<sup>-</sup>, der Firma Clontech benutzt.

#### 4.7 Kits

Zur Aufreinigung der DNA wurde der CONCERT™ High Purification Plasmid Maxi-prep Kit der Firma Gibco BRL/Life Technologies benutzt.

#### 4.8 Verbrauchsmaterial

Einfrierröhrchen	Greiner
Filterpapier Whatman 3 MM	Roth
Kopierfolien	Xerox
0,4 cm-Küvetten	BioRad
Nitrocellulosemembran Hybond ECL	Amersham Pharmacia Biotech
1,5 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf
Hyperfilm® ECL	Amersham Pharmacia Biotech
Röntgenfilm	Kodak
15 ml/50 ml-Zentrifugenröhrchen	Greiner

#### 4.9 Geräte

Bestrahlungsgerät	LINAC SL 25, Phillips
Elektroporator Gene Pulser® II	BioRad
FACS Calibur Durchflußzytometer	Becton Dickinson
Mikroskope:	
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 135, Carl Zeiss, Jena
Konfokales Laser Scan Mikroskop	Leica TCS NT
Schüttler	Biometra
SDS-Gelelektrophoresekammer	Biometra
Sequi-Gen GT Sequencing Cell	BioRad
Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	BioRad
4054 UV-VIS-Spectrophotometer	
Ultraspec Plus, LKB Biochrom	Pharmacia Biosystems
Zentrifugen	
Tischzentrifuge 5417R (Eppendorf)	
Für Zellkultur: Rotanta RPC Laborzentrifuge (Hettich)	
Für DNA-Aufreinigung: Sorvall® SUPER T21, Rotor SL-50T (Sorvall)	

## 5 METHODEN

### 5.1 Zellkultur

#### 5.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Zellen wurden in 75 ml-Zellkulturflaschen in einem Zellinkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphärengehalt kultiviert. Als Medium wurde RPMI 1640 verwendet, das mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin supplementiert wurde (→Vollmedium).

#### 5.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden 15 Millionen Zellen 5 min lang bei 500xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1,5 ml Einfriermedium (75% RPMI 1640, 20% FCS, 5% DMSO) resuspendiert und in Einfriereröhrchen überführt. Die Zellen wurden dann stufenweise im Zellkulturtank 35 VHC der Firma Taylor-Wharton für 15 min auf der obersten Stufe, 30 min auf der mittleren Stufe und 1 h auf der untersten Stufe langsam eingefroren, bevor sie im flüssigen Stickstoff gelagert wurden.

Das Auftauen der kryokonservierten Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Die Zellen wurden einmal mit dem Vollmedium gewaschen, um das toxische DMSO zu entfernen. Anschließend wurden sie zunächst über Nacht in 10 ml Vollmedium aufgenommen, das mit weiteren 10% FCS supplementiert wurde. Nach dieser Erholungsphase der Zellen nach dem Auftauen wurden sie schließlich wie oben beschrieben weiter kultiviert.

#### 5.1.3 Zellzahlbestimmung

50 µl der Zellen wurden in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer pipettiert. Es wurden die Zellen in den jeweils 16 Quadraten der beiden Hauptdiagonalen gezählt (insgesamt 32 Quadrate). Die Zelldichte im Medium (in Zellen/ml) wurde durch Multiplizierung der bestimmten Zellzahl mit dem Faktor 2500 berechnet.

## 5.2 Transfektion von Zellen

Zur Transfektion wurden 25 Millionen Zellen bei 500xg für 5 min in 50 ml-Zentrifugenröhrchen zentrifugiert. Nachdem das Zellpellet zweimal mit 20 ml einer eiskalten TBS-Lösung (pH 7,4 bei 4°C) gewaschen wurde, wurde es in 700 µl dieses Puffers aufgenommen und in 0,4 cm-Küvetten (BioRad) überführt. In die Küvette wurden 15-20 µg aufgereinigter DNA in einem Volumen < 20 µl hinzu pipettiert. Der Ansatz wurde für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden nach der Transfektion bei 500 V und 175 µF im Elektroporator Gene Pulser® II (BioRad) für weitere 20 min auf Eis inkubiert, bevor sie in 10 ml Vollmedium aufgenommen wurden, das zusätzlich mit 10% FCS supplementiert wurde.

Da viele Zellen nach der Strombehandlung starben, wurden die lebenden Zellen von den toten durch eine Ficoll-Zentrifugation getrennt. Hierfür wurde 5 ml der Biocoll-Lösung in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit den Zellen in einem Volumen von 2 ml überschichtet. Nach der Zentrifugation (500xg, 20 min) wurden die lebenden Zellen im Interphasenring mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in ein frisches Röhrchen überführt. Nach dem Waschen der Zellen mit dem Medium wurden sie wie oben beschrieben weiter kultiviert.

Zur Selektion der transfizierten Zellen von den nicht transfizierten Zellen wurde das Kulturmedium der Zellen ab dem dritten Tag nach der Elektroporation mit dem Selektionsantibiotikum G418 (800 µg/ml) supplementiert.

## 5.3 DNA-Vermehrung und -Aufreinigung

Zur Herstellung größerer Mengen der DNA für die Transfektion in Jurkat-Zellen, wurden die Plasmide in Bakterien vermehrt und aus diesen dann aufgereinigt.

### 5.3.1 Transformation von Bakterien

50 µl der kompetenten Bakterien *Escherichia coli* DH5α (Clontech) wurden mit ungefähr 1 µg DNA vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden diese für 90 sec auf 42°C erwärmt, bevor sie für fünf weitere Minuten auf Eis abgekühlt wurden. Die Bakterien wurden mit 500 µl SOC-Medium (Gibco BRL/Life Technologies) versetzt und bei 37°C für 1 h geschüttelt bevor sie auf LB-Agarplatten, die 50 µg/ml des Antibiotikums Ampicillin enthielten, ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert wurden. Transformierte Bakterien wuchsen in einzelnen Kolonien

heran, die danach gepickt und in LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) weiter vermehrt wurden.

### 5.3.2 *Aufreinigung von DNA*

Nach Vermehrung der transformierten Bakterien in 200 ml des mit Ampicillin (50 µg/ml) versetzten LB-Mediums, wurde die Plasmid-DNA nach der Zellyse der Bakterien über Säulen des CONCERT™ High Purification Plasmid Maxiprep Kits der Firma Gibco BRL/Life Technologies nach dem vorgeschriebenen Protokoll aufgereinigt. Die DNA interagiert über ihre negativen Phosphatreste mit den positiven Ladungen auf der Harzoberfläche der Säule. Temperatur, pH-Wert und die Salzkonzentration beeinflussen diese Interaktionsfähigkeit. Bei moderaten Salzkonzentrationen bleibt die Plasmid-DNA gebunden, während RNA, Proteine und andere Verunreinigungen ausgewaschen werden. Die Plasmid-DNA kann bei hohen Salzkonzentrationen eluiert werden.

200 ml der Übernachtskultur wurden bei 6000xg zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Mediums wurde das Bakteriensediment in 10 ml des Zellsuspensionspuffers E1, der 20 mg/ml RNase A enthielt, resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 10 ml des Lysepuffers E2 zur Bakteriensuspension. Nach vorsichtigem Vermischen wurde der Ansatz 5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von 10 ml Puffer E3 neutralisiert und für 10 min bei 15000xg bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde nun auf die zuvor mit 30 ml des Puffers E4 äquilibrierte Säule pipettiert und passierte die Säule. Die Säule wurde dann mit 60 ml des Puffers E5 gewaschen und die Plasmid-DNA wurde schließlich mit 15 ml Puffer E6 von der Säule eluiert. Durch Zugabe von 10,5 ml 2-Propanol zum Eluat und der anschließenden Zentrifugation bei 12000xg (4°C, 30 min) wurde die DNA gefällt. Das DNA-Pellet wurde anschließend zweimal mit 5 ml 70%-igem Alkohol gewaschen und bei 12000xg (4°C, 5 min) zentrifugiert, bevor es in 500µl bidest. Wasser gelöst wurde.

### 5.3.3 *Bestimmung der DNA-Konzentration und Überprüfung der DNA-Reinheit*

Die Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren wurde mittels der Extinktionsmessungen in einem UV-VIS-Densitophotometer Ultraspec Plus (Pharmacia Biosystems)

bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt. Hierfür wurde die DNA-Lösung auf eine geeignete Konzentration verdünnt.

Für eine reine DNA-Lösung beträgt das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  1,8.  $OD_{260}$  von 1,0 entspricht einer ds-DNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 5.4 Stimulierung der Zellen

Zellen wurden bei Raumtemperatur mit 6 MV-Photonen an dem Linearbeschleuniger LINAC SL25 (Phillips) bei einer Dosis/Leistung von 4 Gy/min bestrahlt. Um eine homogene Strahlendosis im Medium zu gewährleisten und den Aufbaueffekt zu verhindern, wird unter die Zellkulturflaschen ein 10 cm dicker Plexiglasblock und über sie ein 1,5 cm dicker gelegt.

Die Stimulierung des Zelltodrezeptors CD95/Fas/APO-1 erfolgte mit dem agonistischen IgM-Antikörper  $\alpha\text{CD95}$  (Klon CH11, Upstate Biotechnology) bei einer Endkonzentration von 100 ng/ml im Zellkulturmedium.

Zur Stimulierung mit dem Zelltodliganden TRAIL wurden die Zellen zunächst für 30 min bei 37°C mit 100 ng/ml des rekombinanten humanen TRAIL (Alexis) im Vollmedium inkubiert. Die Rezeptoraktivierung nach der Ligandenbindung wurde durch Zugabe des *Enhancers* (1  $\mu\text{g/ml}$  Endkonzentration, Alexis) verstärkt.

#### 5.5 Bestimmung der Apoptose, Viabilität und $\Delta\Psi_m$

##### 5.5.1 Durchflußzytometrie/FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*)

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von einzelnen Zellen hinsichtlich der Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften nach Markierung der Zellen mit einem geeigneten Farbstoff.

Die Zellen wurden zur Bestimmung des prozentualen Anteils der apoptotischen Zellen in der Population über eine Stahlkapillare in die Messküvette eingeführt, wo sie durch einen Laserstrahl erfaßt und charakterisiert werden. Das in die Vorwärtsrichtung durchgehende Licht (FSC für **F**orward **S**catter) ist ein Maß für die Zellgröße, das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht (SSC für **S**ideward **S**catter) ist ein Maß für die Granularität. Da apoptotische Zellen kleiner und granulärer sind als gesunde Zellen, konnten die beiden Zellpopulationen in einem Koordi-

natensystem, in dem FSC gegen SSC aufgetragen wurde, dargestellt und getrennt voneinander ausgewertet werden.

Zusätzlich zu den Streulichteigenschaften können mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Zellen nach Anregung im Laserstrahl bei geeigneten Filtern in entsprechenden Kanälen untersucht werden.

Zur Bestimmung der Viabilität wurden die Zellen im Medium, das 5 µg/ml Propidiumiodid (Calbiochem) enthielt, für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde durchflußzytometrisch neben den FSC und SSC die Propidiumiodid-Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzkanal FL-2 bestimmt. Gesunde Zellen besitzen eine intakte Membran und nehmen diesen Farbstoff nicht auf. Zellen mit einer beschädigten Membran nehmen den Farbstoff auf, der schließlich in den Kern gelangt und dort mit der DNA interkaliert. Diese Zellen weisen eine erhöhte PI-Fluoreszenz auf. In apoptotischen Zellen wird die DNA anschließend degradiert und in kleine Membranvesikel verpackt, die eine niedrigere PI-Fluoreszenz als beschädigte, aber eine höhere als gesunde Zellen aufweisen. Die Zellpopulationen mit intakter und beschädigter Membran wurden im Koordinatensystem, in dem FL-2 gegen SSC aufgetragen wurde, ausgewertet.

Zur Messung des mitochondrialen Membranpotentials wurden die Zellen im Medium, das 25 nM TMRE (Molecular Probes, Mobitech) enthielt, für 30 min bei 37°C inkubiert. TMRE ist ein membranpermeabler potentialabhängiger Farbstoff, der in Mitochondrien mit intaktem Membranpotential akkumuliert. Bricht das mitochondriale Membranpotential zusammen, so diffundiert der Farbstoff aus den Mitochondrien. Zellen mit intaktem mitochondrialen Stoffwechsel weisen eine höhere Fluoreszenzintensität auf als Zellen, in denen das mitochondriale Membranpotential zusammengebrochen ist. Die Messung wurde in einem Histogramm durch Auftragung der bei bestimmter Fluoreszenzintensität im Kanal FL-2 detektierten Ereignisse dargestellt oder in einem Koordinatensystem, in dem FL-2 gegen SSC aufgetragen wurde, ausgewertet. Zur Kontrolle wurden Zellen während der TMRE-Färbung mit 1 µM des Cyanid-Derivats CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon; Sigma) behandelt. CCCP entkoppelt die Atmungskette, verhindert auf diese Weise den Transport von Protonen aus der mitochondrialen Matrix und führt so zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials.

### 5.5.2 Hoechst-Färbung

Die DNA-Färbung mit dem membrangängigen Farbstoff Hoechst 33342 (Calbiochem) ist eine anschauliche Methode zur Darstellung und Evaluierung apoptotisch veränderter Zellkerne.

Hierfür wurden die Zellen für 15 min bei Raumtemperatur im Medium, das 1 µg/ml des Hoechst-Farbstoffs enthielt, inkubiert. Die Zellen wurden anschließend manuell mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Axiovert 135 (Carl Zeiss, Jena) ausgezählt. Nach Anregung des mit der DNA interkalierenden Farbstoffs mit einer Quecksilberlampe kann die Fluoreszenz unter Verwendung eines 380 nm-Filters detektiert werden. Die Dokumentation erfolgte mittels einer verstärkenden CCD-Videokamera (Proxitronic). Die Zählung der apoptotischen Zellen wurde in mehreren Blickfeldern von zwei Personen unabhängig voneinander durchgeführt. Als apoptotisch wurden die Zellen nur dann bezeichnet, wenn sie mehr als zwei DNA-Klumpen aufwiesen.

## 5.6 Bestimmung der Radioresistenz

Da Jurkat-Zellen als nicht adhärente Zellen in Suspension wachsen wurde ein modifizierter Test nach Green et al. zur Bestimmung des klonogenen Überlebens durchgeführt (Green *et al.*, 1991). Hierfür wurden im achtfachen Ansatz Zellen in einer berechneten Anzahl von 0.2, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 und 6400 in einem Volumen von 500 µl in je acht Vertiefungen einer 48-well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Ansätze wurden dann unbestrahlt, bzw. mit 1,5 Gy, 3 Gy oder 4,5 Gy Einzeldosis bestrahlt und für vier Wochen im Zellinkubator kultiviert, bevor der Anteil der Vertiefungen bestimmt wurde, in denen Zellwachstum nachgewiesen werden konnte. Aus den gewonnenen quantalen Daten der einzelnen Verdünnungsstufen wurde nach Logit-Transformation und Berechnung der nicht-linearen Regression für jede Strahlendosis der WGD (**W**ell **G**rowth **D**ose) 50-Wert ermittelt, d.h. die Zellzahl bestimmt, bei der in 50% der Vertiefungen Zellwachstum stattfindet. Die Berechnung der 95%-Konfidenzintervalle der WGD50-Werte erfolgte computergestützt nach einem von Walker und Suit entwickelten Algorithmus. Die Überlebensfraktion SF (**S**urviving **F**raction) wurde wie folgt berechnet:  $SF = WGD50(\text{unbestrahlt}) / WGD50(\text{bestrahlt})$ .

## 5.7 Westernblot

Zum Nachweis der Caspasenaktivierung, der Bid- und PARP-Spaltung sowie der Bcl-2- und Bcl-x<sub>L</sub>-Proteinexpression wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen lysiert, per SDS-PAGE elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Erstantikörpers und einem gegen den Erstantikörper gerichteten Sekundärantikörper, an den die alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt war. Nach Zugabe der Substratlösung wird bei Umsetzung des Substrats Lichtquanten emittiert, die auf einem Film als Banden nachgewiesen werden konnten.

### 5.7.1 Herstellung von Lysaten

$2 \cdot 10^6$  Zellen wurden bei 500xg zentrifugiert, in 200 µl SDS-Lysepuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10000xg in der Tischzentrifuge für 10 min wurde der Überstand abgenommen und für die Versuche weiter verwendet.

### 5.7.2 Proteinbestimmung

Um sicherzustellen, dass die gleiche Proteinmenge in jeder Spur während der Gelelektrophorese aufgetrennt wurde, wurde die Proteinkonzentration des Lysats überprüft. Hierfür wurde das phosphorhaltige Protein-Farbstoff-Konzentrat (BioRad) 1:5 mit bidest. Wasser verdünnt. Zu 1 ml der verdünnten Farbstofflösung wurden 5 µl des Lysats pipettiert. Nachdem die Probe gut durchmischt wurde, wurde der Extinktionswert bei 595 nm bestimmt. Um die absolute Proteinmenge im Lysat zu bestimmen, wurde eine Eichgerade erstellt, indem statt des Lysats BSA in einer genau definierten Konzentration zur BioRad-Lösung zugegeben wurde und parallel zu den übrigen Proben photometrisch gemessen wurde.

### 5.7.3 Probenvorbereitung

Nach Normierung der Proben auf die gleiche Proteinmenge wurden zu 20 µl des Lysats 5 µl SDS-Probenpuffer sowie 1 µl β-Mercaptoethanol pipettiert. Nach dem Durchmischen wurden die Proben 5 min lang bei 95°C im Thermoschüttler denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

#### 5.7.4 SDS-PAGE

In der vertikalen diskontinuierlichen SDS-PAGE (**Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgелеlektrophorese**) werden die Proteine ihrer Größe nach unter denaturierten Bedingungen in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt: bei angelegter Spannung wandern große Proteine langsamer, kleine Proteine schneller durch das Gel. Um die Trennung zu optimieren, wurde über dem Trenngel ein 4,5%-iges Sammelgel gegossen, durch das die Proteine schnell wandern und sich in der Grenzschicht zwischen Trenn- und Sammelgel konzentrieren, bevor sie im 10-14%-igem Trenngel aufgetrennt wurden.

Zusammensetzung der Gele (Angaben pro Gel):

	Trenngel			Sammelgel
	10%	12%	14%	
bidest. Wasser	6,25 ml	5,25 ml	4,25 ml	3,00 ml
Trennpuffer	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	--
Sammelpuffer	–	–	–	1,25 ml
Gel 30	5,00 ml	6,00 ml	7,00 ml	0,75 ml
APS, 10% w/v	75 µl	75 µl	75 µl	50 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	5 µl
SDS, 20% w/v	75 µl	75 µl	75 µl	–

Die Gelelektrophorese wurde in einer Multigel-Long Gelbox (Biometra) bei 50V, während die Proben sich im Sammelgel befinden, und bei 150V, wenn die Proben im Trenngel sind, durchgeführt. Als Reservoirpuffer wurde das SDS-Laufpufferkonzentrat von BioRad verwendet, das für den Gebrauch 1:10 mit bidest. Wasser verdünnt wurde.

#### 5.7.5 Detektion der Proteine

Für die Weiterbearbeitung wurden die Proteine von dem Gel auf eine Hybond ECL Nitrocellulosemembran (Amersham Pharmacia Biotech) übertragen. Der Proteintransfer erfolgte in einer Trans-Blot<sup>®</sup> Electrophoretic Transfer Cell (BioRad) im Transferpuffer bei 0,1 A über Nacht. Durch anschließende Färbung der Membran für 5 min mit Ponceau S-Lösung (1:20 in bidest. Wasser verdünnt; Sigma) und nach

dem Auswaschen des ungebundenen Farbstoffs mit bidest. Wasser wurde eine gleichmäßige Proteinauftragung und gleichmäßiger Proteintransfer überprüft.

Um die freien Bindungsstellen abzudecken, an die sich die Antikörper unspezifisch anlagern könnten, wurde die Membran für 15 min in der Blocklösung inkubiert. Dann wurde die Membran für 45 min in einer Blocklösung, in der der Erstantikörper entsprechend verdünnt wurde, inkubiert. Die Membran wurde nun dreimal für je 5 min in einer TBS-Tween-Lösung gewaschen, bevor sie für weitere 30 min in einer Blocklösung, in der der AP-konjugierte Sekundärantikörper 1:20000 verdünnt wurde, inkubiert wurde. Schließlich wurde die Membran dreimal in TBS-Triton, einmal in TBS und einmal im AP-Puffer für jeweils 5 min gewaschen, bevor sie 5 min lang in CSPD<sup>®</sup>-Substratlösung Tropix (Applied Biosystems, MA, USA) inkubiert wurde. Die Membran wurde in einer Filmkassette zwischen zwei Folien glattgestrichen, auf die ein Film (Hyperfilm<sup>®</sup> ECL Filmmaterial, Amersham Pharmacia Biotech) gelegt wurde, der nach entsprechender Belichtungszeit entwickelt wurde.

## 5.8 Gelshift-Analyse

Die Funktionalität von Cyclosporin A in der Zelle wurde mit Hilfe eines Gelshift-Assays überprüft. Cyclosporin A blockiert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT und somit seine Translokation vom Zytosol in den Zellkern. Nach Stimulierung der Zellen mit Thapsigargin, die zur NFAT-Aktivierung führt, wurden die Zellkerne extrahiert. Die Kernlysate wurden dann mit einem radioaktiv markiertem Oligonukleotid, das eine spezifische Bindungsstelle für NFAT aufwies, inkubiert. Lag der Transkriptionsfaktor aktiv im Zellkern vor, so band er an das markierte Oligonukleotid. Im Gel wanderte der Oligonukleotid-Protein-Komplex langsamer als das freie Oligonukleotid. Zur Überprüfung der Bindungsspezifität wurde die Bindung von NFAT an das markierte Oligonukleotid durch Zugabe des unmarkierten spezifischen Oligonukleotids im Überschuss kompetitiv gehemmt. Diese kompetitive Hemmung fand bei Zugabe eines unspezifischen unmarkierten Oligonukleotids nicht statt.

### 5.8.1 Markierung der Oligonukleotide

Ansatz:

25-100 ng NFAT-ds-Oligonukleotid (GGAAAA)  
5  $\mu$ l T4-Polynukleotidkinase-Puffer, 10x  
5  $\mu$ l  $^{32}$ P- $\gamma$ -ATP (50  $\mu$ Ci)  
1  $\mu$ l T4-Polynukleotidkinase (10 U/ $\mu$ l)  
ad 50  $\mu$ l mit bidest. Wasser

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert, bevor er 5 min lang bei 65°C inaktiviert wurde. Die markierten Oligonukleotide konnten beim Verbrauch innerhalb der nächsten zwei Wochen bei -70°C gelagert werden.

### 5.8.2 Probenvorbereitung

10<sup>6</sup> Jurkat-Zellen wurden für 20 min mit 1  $\mu$ M Thapsigargin (Calbiochem) stimuliert. Zur Hemmung der NFAT-Aktivierung wurden die Zellen vor Thapsigarginstimulierung mit 0,5  $\mu$ g/ml Cyclosporin A (Calbiochem) behandelt. Nach Zentrifugation bei 500xg wurde das Pellet in 200  $\mu$ l Puffer A resuspendiert und 15 min lang auf Eis inkubiert. 12,5  $\mu$ l einer 10%-iger Nonidet P-40-Lösung wurden zur Suspension dazu pipettiert, die anschließend gut vermischt wurde. Die Kerne wurden dann bei 10000xg 60 sec lang zentrifugiert und in 200  $\mu$ l Puffer A gewaschen. Das Kernpellet (ca. 30  $\mu$ l) wurde im gleichen Volumen Puffer C resuspendiert und 60 min lang bei 4°C im Rotationschüttler inkubiert, um die Kernproteine zu eluieren. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 10000xg und 4°C wurde der Überstand abgenommen und für die weitere Analyse verwendet. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Kernlysate erfolgte mit dem Protein-Farbstoffkonzentrat von BioRad wie bereits im Abschnitt 5.7.2 beschrieben.

Inkubationsansatz:

2  $\mu$ l BSA (10  $\mu$ g/ $\mu$ l)  
1,4  $\mu$ l Poly-dIdC (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)  
2  $\mu$ l NFAT-Puffer, 10x  
2-3  $\mu$ l Kernlysate (ca. 5-10  $\mu$ g)  
1  $\mu$ l  $^{32}$ P-markierte NFAT-ds-Oligonukleotid  
ad 20  $\mu$ l mit bidets. Wasser

Zur Kompetition der Bindung des Transkriptionsfaktors NFAT an das markierte Oligonukleotid wurde zum Ansatz zusätzlich 40 ng des unmarkierten spezifischen NFAT-ds-Oligonukleotids (GGAAAA, Santa Cruz, 20 ng/ $\mu$ l), bzw. des unspezifischen AP-1-ds-Oligonukleotids (TGACTGA, Santa Cruz, 20 ng/ $\mu$ l) pipettiert.

Die Ansätze wurden kurz durchmischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

### 5.8.3 Auftrennung der Oligonukleotid/Protein-Komplexe im Gel

Zusammensetzung des Gels:

7,5 ml	Gel 40
7 ml	TBE, 5x
55,5 ml	Bidest. Wasser
400 $\mu$ l	APS, 10% w/v
40 $\mu$ l	TEMED

Als Reservoirpuffer wurde 0,5x TBE-Puffer verwendet. Die elektrophoretische Trennung wurde in der Kammer Sequi-Gen GT Sequencing Cell (BioRad) durchgeführt. Vor der Probenauftragung wurde das Gel 15 min an eine Spannung von 200V angeschlossen. Die elektrophoretische Trennung der Oligonukleotid-Protein-Komplexe erfolgte anschließend für weitere 2,5 h bei 200V.

Nachdem das Gel abgebaut und getrocknet wurde, wurde es in einer Filmkassette über einen Kodak-Film gelegt, der nach einer Exposition bei  $-70^{\circ}\text{C}$  für 4-12 h entwickelt wurde.

## 5.9 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Überprüfung der subzellulären Lokalisierung der Bcl-2-Proteine wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe des konfokalen Mikroskops Leica TCS NT untersucht.

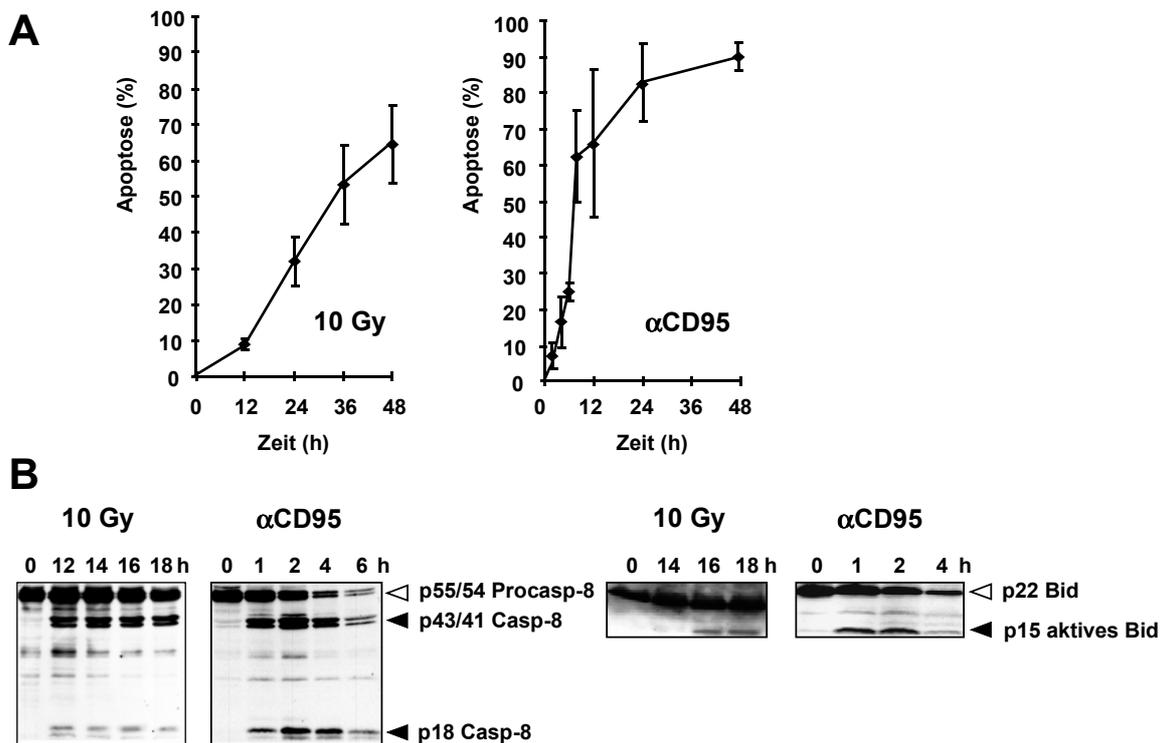
Die Deckgläschen wurden zunächst für 10 min bei Raumtemperatur mit einer 1:100 in bidest. Wasser verdünnten Poly-L-Lysinlösung (Sigma, 0,1% w/v) beschichtet. Nach Entfernung der Lösung wurden die Zellen in einer Zelldichte von  $10^7$  Zellen/ml auf die Deckgläschen pipettiert und für 20 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Zellen auf dem Deckgläschen wurden einmal vorsichtig mit PBS gewaschen, bevor sie mit einer Para-Formaldehydlösung (2,5% w/v in PBS) für 15 min bei Raumtemperatur fixiert wur-

den. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen mit Triton X-100 (0,1% w/v in PBS) für weitere 15 min permeabilisiert und anschließend zweimal mit PBS vorsichtig gewaschen. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden durch eine zehnminütige Inkubation der Zellen in einer Blocklösung (10% FCS in PBS) abgesättigt. Im Anschluß wurden die Zellen auf Deckgläschen über Nacht bei 4°C mit den Primärantikörper inkubiert. Um die Bcl-2-Lokalisierung am Mitochondrium zu überprüfen, wurde rabbit-anti-Bcl-2 (Santa-Cruz-Biotech) zusammen mit mouse-anti-Cytochrome c (PharMingen) jeweils 1:100 in Blocklösung verdünnt. Die Bcl-2-Lokalisierung am ER wurde durch Verwendung der Primärantikörper rabbit-anti-Bcl-2 (Santa-Cruz-Biotech) und mouse-anti-SERCA (UBI Biomol), die beide 1:100 in Blocklösung verdünnt wurden, analysiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach zweimaligen Waschen für 30 min im Dunkeln in einer Lösung mit den Sekundärantikörpern anti-mouse-Alexa488/anti-rabbit-Cy5 (Molecular Probes, Mobitech/Dianova, beide 1:200 in Blocklösung verdünnt) überschichtet. Abschließend wurden die Zellen nochmals zweimal mit PBS gewaschen und auf einem Objektträger in Mowiol eingedeckelt.

## 6 ERGEBNISSE

### 6.1 Apoptose in Jurkat-Zellen

In Jurkat-T-Zellen wurde Apoptose nach Bestrahlung mit 10 Gy ebenso wie nach Stimulierung des Zelltodrezeptor CD95 mit dem agonistischen Antikörper ( $\alpha$ CD95), der die Vernetzung des Zelltodrezeptors bewirkte, initiiert (Abbildung 7). Apoptose wurde in diesem Zellsystem durchflußzytometrisch quantifiziert. Außerdem erfolgte eine Überprüfung der Caspasenaktivierung mittels Westernblot-Technik. Die Apoptoseinduktion verlief nach beiden Stimuli zeitabhängig, nach CD95-Stimulierung jedoch bedeutend schneller als nach Bestrahlung. So waren 48 h nach Bestrahlung etwa 65 % aller Zellen apoptotisch, während 24 h nach Stimulierung des Zelltodrezeptors bereits 90% apoptotische Änderungen aufwiesen. Weiterhin konnte 1 h nach CD95-Stimulierung eine deutliche Aktivierung der Caspase-8 sowie ein fast voll-

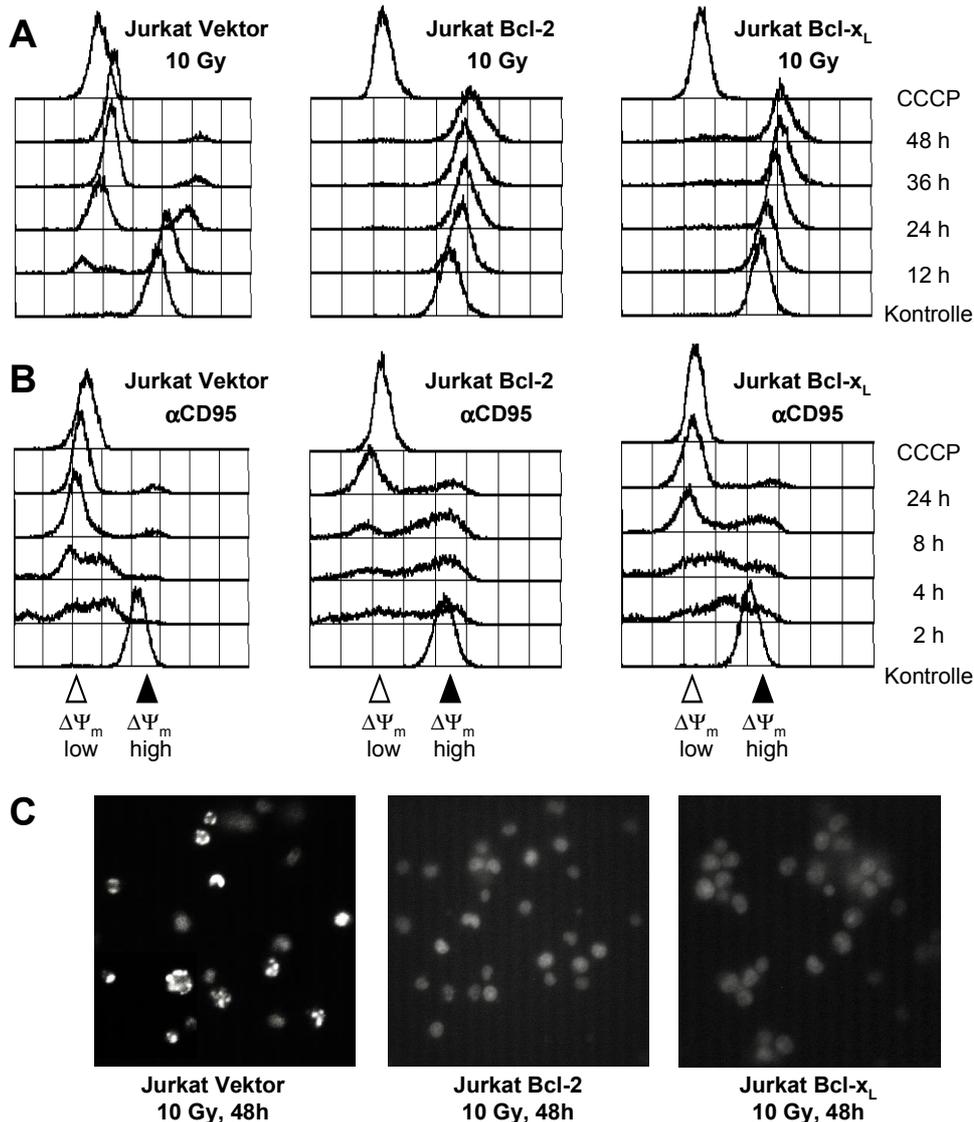


**Abbildung 7: Induktion der Apoptose nach CD95-Stimulierung und Bestrahlung.**

A) Jurkat-T-Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt, bzw. mit 100 ng/ml des agonistischen anti-CD95-Antikörpers stimuliert. Apoptoserate wurde durchflußzytometrisch bestimmt. B) Caspase-8- und Bidaktivierung wurde mittels der Westernblot-Technik analysiert. Procaspase-8 wird in zwei Isoformen exprimiert (Caspase-8a/b, offene Pfeile, linke Seite). Nach Abspaltung der kleinen Untereinheit werden die Intermediärfragmente p43/41 detektierbar. Die Proteolyse dieser Intermediärfragmente C-terminal von der Prodomäne führt zur Freisetzung der großen Untereinheit p18 (linke Seite). p22Bid wird während der Apoptose durch Proteolyse in aktives p15Bid überführt (rechte Seite).

ständiger Verbrauch ihrer Proform nach 4 bis 6 h nachgewiesen werden, während die Prozessierung der Caspase-8 nach Bestrahlung ohne einen nennenswerten Verbrauch der Proform ablief.

Bid, ein pro-apoptotisches Molekül der Bcl-2-Familie mit einer BH3-Domäne, wurde als ein Substrat der Caspase-8 beschrieben. Gespaltenes Bid translokalisiert zum



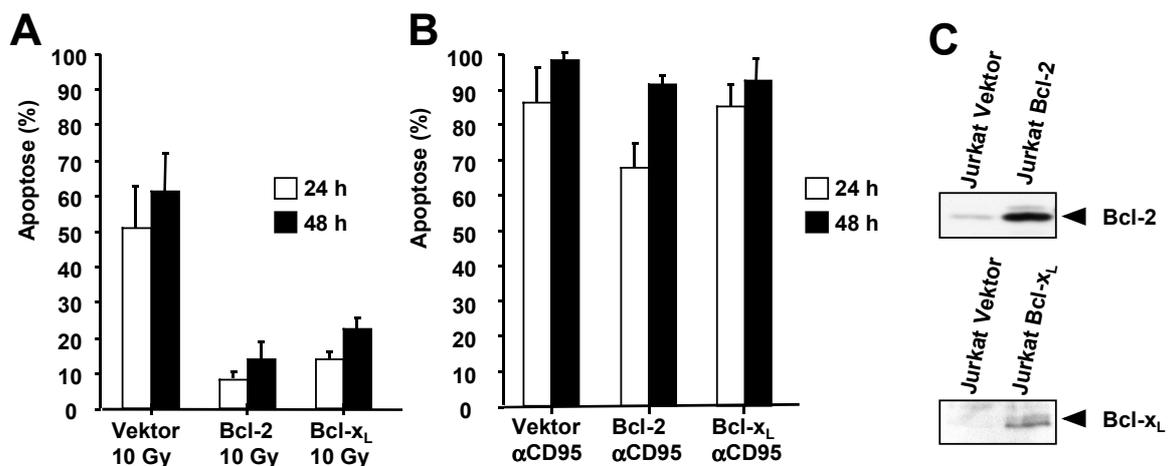
**Abbildung 8: Einfluß von Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> auf die Apoptose.** Nach Bestrahlung der Zellen, bzw. nach Stimulierung des Zelltodrezeptors mit dem agonistischen Antikörper  $\alpha$ CD95, wurde die mitochondriale Integrität durchflußzytometrisch nach Anfärben der Zellen mit dem Farbstoff TMRE analysiert. Zellen mit intaktem mitochondrialen Membranpotential weisen eine höhere Farbintensität auf ( $\Delta\Psi_m$  high) als Zellen, in denen das mitochondriale Membranpotential zusammengebrochen ist ( $\Delta\Psi_m$  low). A) Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> schützen vor dem  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nach Bestrahlung. B) Der mitochondriale Schaden kann nach Stimulierung des Zelltodrezeptors CD95 durch diese anti-apoptotischen Proteine nicht verhindert werden. C) 48h nach Bestrahlung wurden die Zellen mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> die Chromatin-kondensation blockieren.

Mitochondrium, wo es den  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch bewirkt. Die proteolytische Bid-Prozessierung konnte ebenso nach CD95-Stimulierung wie nach Bestrahlung nachgewiesen werden. Sie erfolgte mit einer Kinetiken, die der Caspase-8-Aktivierung entsprachen.

### 6.2 Inhibition der Apoptose durch Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub>

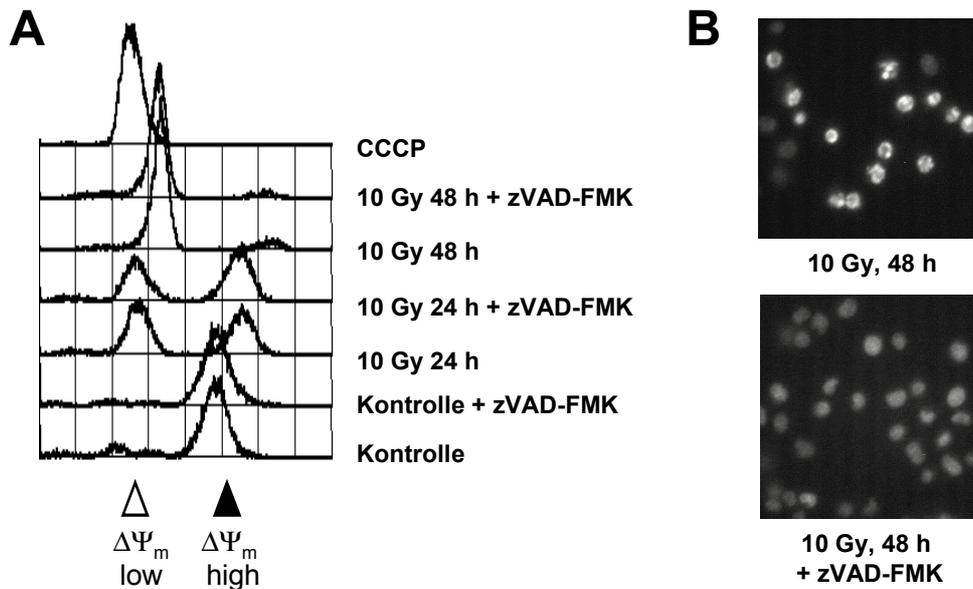
Der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und die damit assoziierte Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol ist ein bedeutender Schritt in der Apoptose, der zur Aktivierung von Caspasen an einem oligomeren Komplex, dem sogenannten Apoptosom, führt. Mitglieder der Bcl-2-Familie, wie z.B. Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub>, können den programmierten Zelltod und  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch durch Inhibierung der PT-Pore blockieren. Außerdem sind diese Moleküle in der Lage, Caspasenaktivierung nach Mikroinjektion von Cytochrom c ins Zytosol zu verhindern.

Um zu klären, ob und auf welcher Ebene diese Proteine mit dem programmierten Zelltod interferieren, wurde die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials  $\Delta\Psi_m$  in Jurkat-Zellen analysiert, die Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> stabil überexprimieren (Abbildung 8). Der Verlust der mitochondrialen Integrität wurde durch die Zugabe des Cyanid-Derivats CCCP (100  $\mu$ M für 30 min) zur Zellkultur überprüft. Nach CD95-Stimulierung brach  $\Delta\Psi_m$  in allen Zellen unabhängig davon, ob sie mit Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> oder mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden, zusammen. Nach Bestrahlung



**Abbildung 9: Wirkung von Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> auf Apoptoseinduktion.**

Apoptose wurde nach Bestrahlung, bzw. Stimulierung des Zelltodrezeptors CD95/Fas/APO-1, durchflußzytometrisch analysiert. A) Apoptose wird fast vollständig durch Bcl-2- bzw. Bcl-x<sub>L</sub>-Überexpression verhindert. B) Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> verhindern Apoptose jedoch nicht nach Stimulierung der Zelltodrezeptors CD95. C) Westernblotanalyse zeigt, dass Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> in den entsprechenden Zellen überexprimiert werden.



**Abbildung 10: Auswirkungen der Caspaseinhibition auf strahleninduzierte Apoptose.**

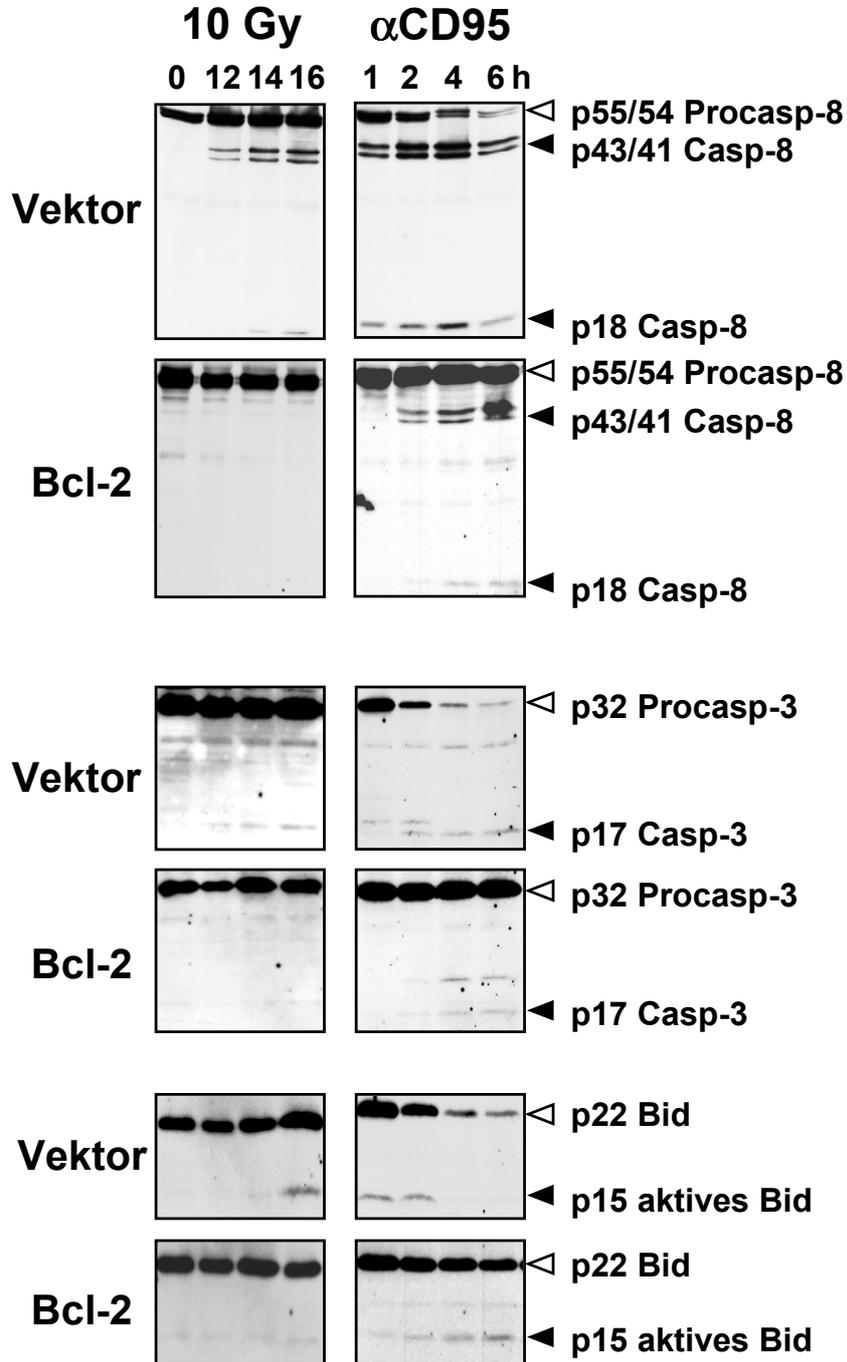
Die durchflußzytometrische Analyse der mitochondrialen Integrität sowie die DNA-Färbung 48h nach Bestrahlung mit 10 Gy demonstrieren, dass die Behandlung der Zellen mit dem Caspaseinhibitor zVAD-FMK kurz vor der Bestrahlung die Chromatinkondensation verhindert (B), jedoch nicht den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials  $\Delta\Psi_m$  (A).

konnte in den Kontrollzellen ein zeitabhängiger  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch nachgewiesen werden, der in Zellen, die die anti-apoptischen Proteine exprimieren, fast vollständig blockiert wurde. Der mitochondriale Schaden konnte mit der Manifestation der apoptotischen Morphologie assoziiert werden. Bcl-2- und Bcl-x<sub>L</sub>-Überexpression verhinderten nach Bestrahlung Chromatinkondensation.

In weiteren Versuchen wurde Apoptose quantifiziert (Abbildung 9). 48 h nach Bestrahlung war die Anzahl der apoptotischen Zellen in Bcl-2-, bzw. Bcl-x<sub>L</sub>-überexprimierenden Zellen deutlich reduziert, während nach CD95-Stimulierung alle Zellen nahezu 100%-ig tot waren. Zu früheren Zeitpunkten konnte jedoch in Bcl-2- und Bcl-x<sub>L</sub>-Zellen eine diskrete Verzögerung der Apoptoseinduktion nach Rezeptoraktivierung beobachtet werden.

Die Frage, ob der strahleninduzierte  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch eine Folge oder die Ursache der Caspasenaktivierung ist, konnte geklärt werden, indem Jurkat-Zellen 30 min vor Bestrahlung mit 20  $\mu$ M zVAD-FMK, einem Pan-Caspasen-Inhibitor, der in dieser Konzentration die meisten Caspasen irreversibel hemmt, behandelt wurden. Wie Abbildung 10 entnommen werden kann, konnte der Inhibitor die Chromatinkondensation blockieren, zeigte aber keinen Einfluß auf den  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch.

Diese Ergebnisse implizieren, dass Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> den programmierten Zelltod blockieren, indem sie mitochondriale Funktionen aufrecht erhalten.

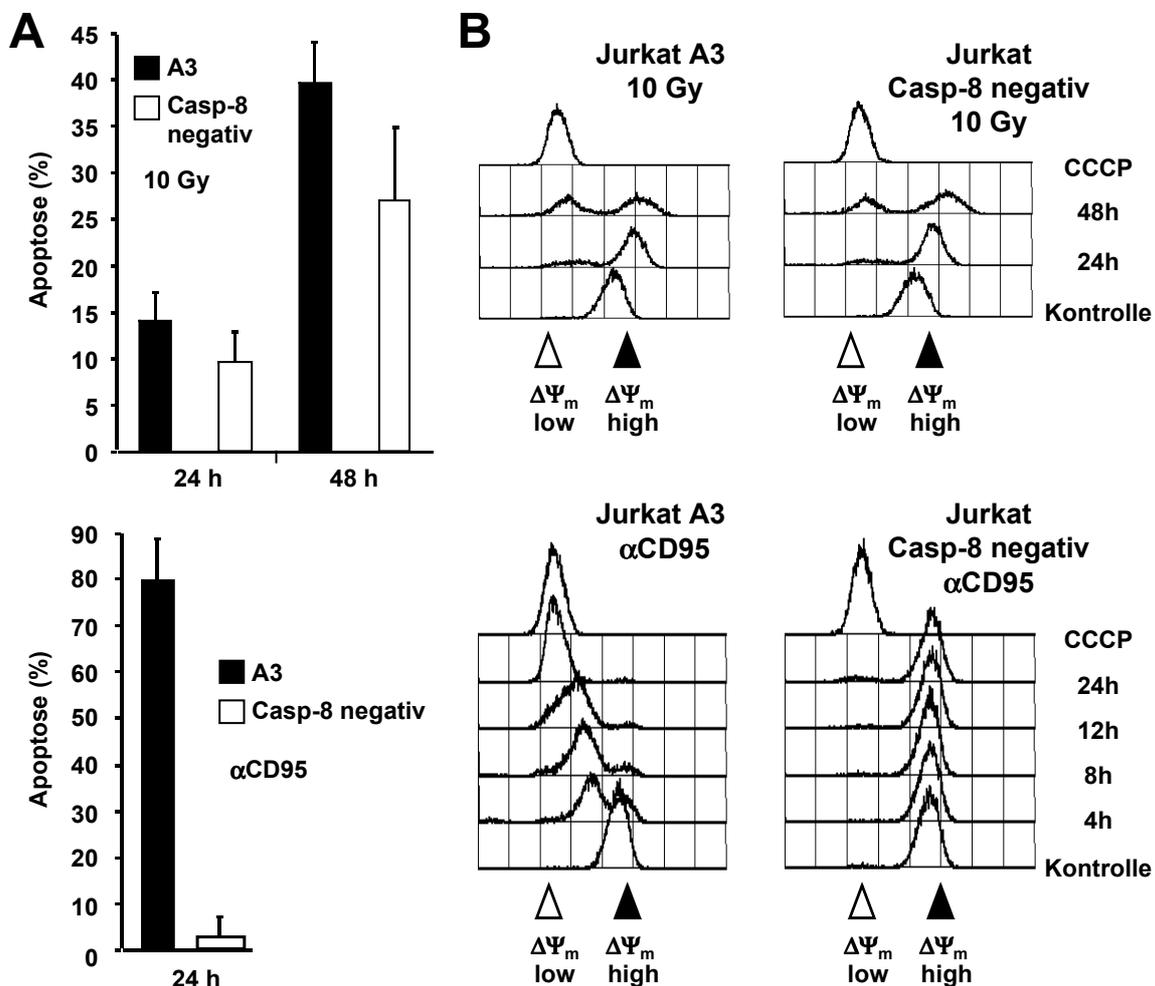


**Abbildung 11: Einfluß von Bcl-2 auf Caspase-8,-3 und Bid-Prozessierung.** Nach Bestrahlung oder Stimulierung mit 100 ng/ml des agonistischen Antikörpers  $\alpha$ CD95 wurden die Bcl-2-überexprimierenden Zellen, bzw. die Vektorzellen, zu indizierten Zeitpunkten lysiert. Die Untersuchung dieser Lysate mittels der Westernblot-Technik demonstriert, dass Bcl-2 die Aktivierung der Caspasen-8 und -3 sowie die Bid-Spaltung nach Stimulierung des Zelltodrezeptors CD95 verzögert, nach Bestrahlung mit 10 Gy jedoch vollständig blockiert. Die weißen Pfeile zeigen die inaktive Proformen der Caspasen und des Bid-Moleküls, die schwarzen Pfeile zeigen die prozessierten Formen dieser Moleküle.

### 6.3 Inhibition der Caspasenaktivierung durch Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub>

Nachfolgend wurde untersucht, inwiefern Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> mit Caspasenaktivierung interferieren. Die Prozessierung der Caspasen -8 und -3 sowie des Bid-Moleküls konnte nach Stimulierung des Zelltodrezeptors durch Bcl-2 zwar verzögert, aber deutlich sichtbar nachgewiesen werden. Nach Bestrahlung blockierte dieses Protein jedoch nahezu vollständig die Caspasenaktivierung und Bidspaltung (Abbildung 11). Vergleichbare Resultate wurden in Versuchen mit Zellen, die Bcl-x<sub>L</sub> überexprimieren, erzielt (Daten sind hier nicht gezeigt).

Die bis hierher durchgeführten Untersuchungen deuten darauf hin, dass Caspasen nach Bestrahlung sekundär zum mitochondrialen Schaden aktiviert werden. Im Ge-



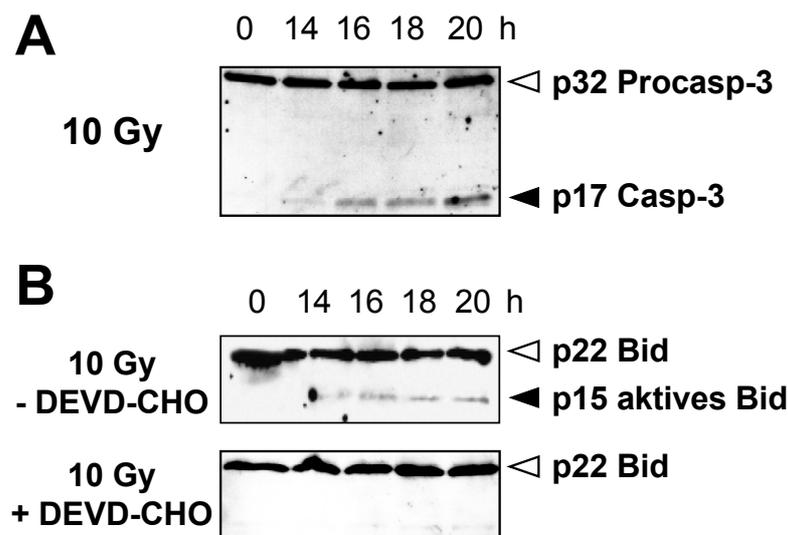
**Abbildung 12: Caspase-8-Involvement in Apoptose nach Bestrahlung und CD95-Stimulierung.** Caspase-8-negative Jurkat-Zellen und die Kontrollzellen A3 wurden nach Bestrahlung und Stimulierung des Zelltodrezeptors CD95 durchflußzytometrisch untersucht. A) Caspase-8 ist notwendig für den CD95-induzierten programmierten Zelltod, während die Induktion der Apoptose nach Bestrahlung lediglich schwach verzögert wird. B) Auf den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nach Bestrahlung hat Caspase-8 keinen Einfluß. In Caspase-8-negativen Zellen wird der mitochondriale Schaden nach CD95-Stimulierung jedoch vollständig unterbunden.

gensatz dazu konnte der mitochondriale Weg nach CD95-Stimulierung umgangen werden.

#### 6.4 Caspase-8: Aktivator oder Effektor?

Um den Einfluß von Caspase-8 nach Strahlenexposition zu untersuchen, wurden Kinetiken der Apoptoseinduktion ebenso in Caspase-8-negativen Jurkat-Zellen und in den Kontrollzellen A3 analysiert. Obwohl Rezeptor-vermittelte Apoptose in diesen Zellen vollständig blockiert war, induzierte ionisierende Bestrahlung eindeutig Apoptose, die jedoch leicht verzögert in Caspase-8-defizienten Zellen verlief (Abbildung 12A).

Inwieweit Caspase-8 für mitochondriale Veränderungen verantwortlich ist, wurde durch Messung des mitochondrialen Membranpotentials untersucht. Bis zu diesem Zeitpunkt veröffentlichte Daten deuteten darauf hin, dass Caspase-8 durch Bid-Spaltung mitochondrialen Schaden verursacht. In der Tat schützte Caspase-8-Defizienz vor  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch nach Stimulierung des Zelltodrezeptors innerhalb der ersten 24 h, jedoch nicht nach Bestrahlung (Abbildung 12B). Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials mit vergleichbaren Kinetiken in Caspase-8-positiven und -negativen Zellen implizierte, dass Caspase-8-Aktivierung für strahleninduzierten  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch nicht benötigt wird.



**Abbildung 13: Aktivierung von Caspase-3 und Bid nach Bestrahlung in Caspase-8 negativen Zellen.** Nach Bestrahlung der Zellen wurden zu gegebenen Zeitpunkten Lysate hergestellt, die mit Die Hilfe der Westernblot-Technik analysiert wurden. A) Caspase-3 wird in Caspase-8 defizienten Jurkat-Zellen prozessiert. B) Bid, wird ebenso in Caspase-8 negativen Zellen nach Bestrahlung gespalten wird. Die Aktivierung des Proteins findet jedoch nicht mehr statt, wenn diese Zellen mit dem Caspase-3-Inhibitor DEVD-CHO (20 $\mu$ M) vorbehandelt wurden.

Die Position des Bid-Moleküls im Zelltodprogramm, das durch ionisierende Strahlung initiiert wurde, konnte mit Hilfe der Westernblot-Technik geklärt werden. Bid-Spaltung findet auch in Caspase-8-negativen Zellen statt (Abbildung 13), in denen ebenso die Aktivierung der Effektorcaspase-3 nachgewiesen wurde. Um die Frage zu klären, ob Bidaktivierung von Caspase-3 abhängig ist, wurden Caspase-8-defiziente Zellen mit 20  $\mu\text{M}$  DEVD-CHO vor Bestrahlung behandelt. In dieser Konzentration hemmte dieser Inhibitor spezifisch Caspasen mit der Substratpräferenz für das Tetrapeptid DEVD (Caspase-3 und Caspase-7) und unterdrückte nahezu vollständig die Bid-Prozessierung.

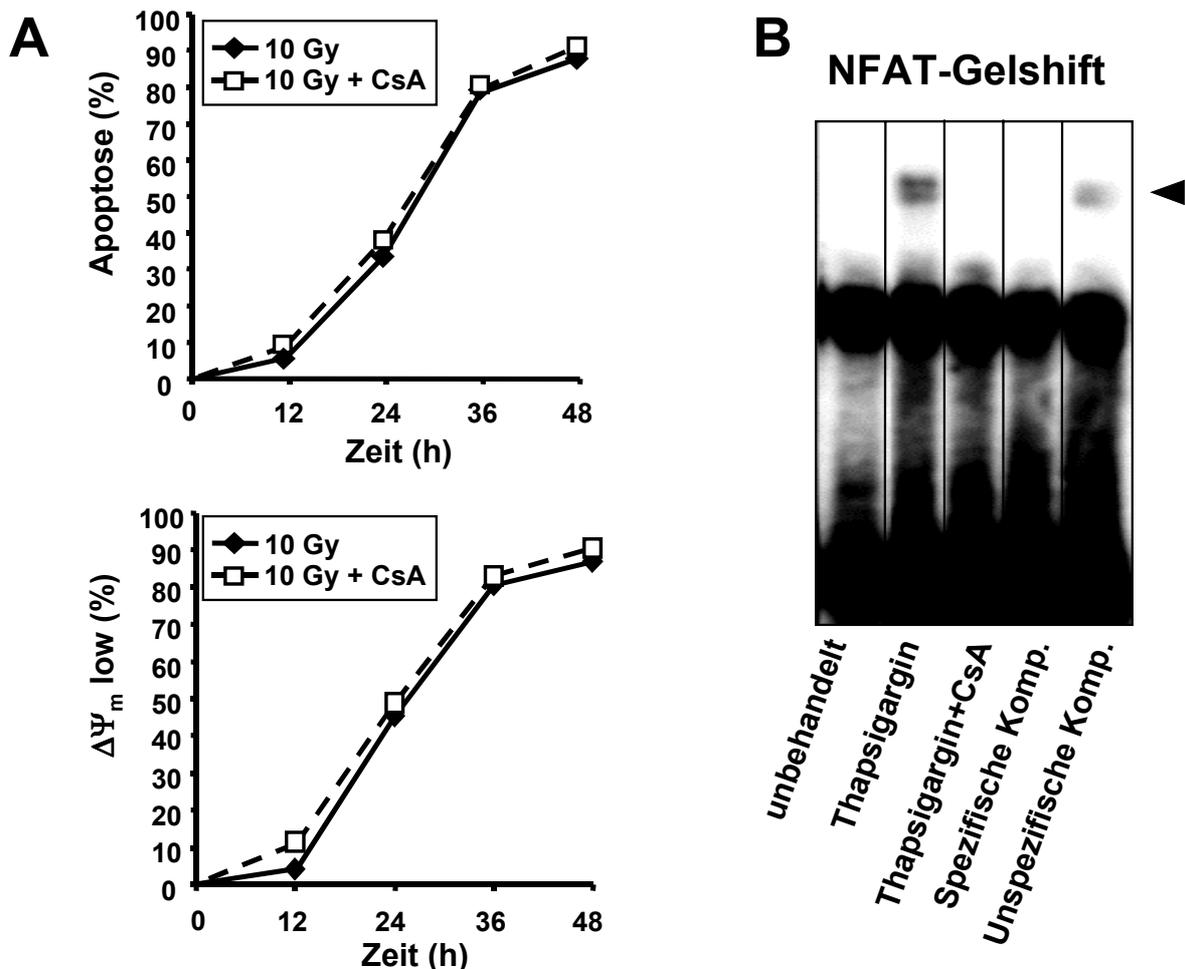
### 6.5 Rolle der PT-Pore in der Apoptose

Bisherige Ergebnisse führten zur Identifizierung potentieller Kandidaten, die Apoptose nach Bestrahlung auf mitochondrialer Ebene regulieren. Wie Abbildung 8 und 9 entnommen werden kann, schützte Bcl-2-Überexpression vor dem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nach Bestrahlung mit 10 Gy, während die Blockierung der Caspasen keinen Effekt zeigte. Das Schlüsselereignis, das zur mitochondrialen Schädigung führt, ist die Öffnung der sogenannten PT-Pore. Durch diesen unspezifischen Megakanal kommt es zum Ionenfluss entlang des Konzentrationsgradienten, der zur osmotischen Schwellung der mitochondrialen Matrix und zum Platzen der äußeren Mitochondrienmembran führen kann. Außerdem kann die Öffnung der Pore den Zusammenbruch des mitochondrialen Protonengradienten verursachen und die damit gekoppelte oxidative Phosphorylierung unterbrechen.

Da bereits eine Interaktion von Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Bax mit der PT-Pore nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, ob die protektive Eigenschaft von Bcl-2 in der strahleninduzierten Apoptose auf diese Wechselwirkung zurückzuführen ist. Um herauszufinden, inwiefern die PT-Pore in die strahleninduzierte Apoptose involviert ist, wurden die Zellen vor Bestrahlung mit Cyclosporin A (CsA) behandelt. Es ist beschrieben worden, dass CsA die Öffnungswahrscheinlichkeit des Megakanals reduziert, indem es Cyclophilin D, ein Protein, das in der mitochondrialen Matrix an ANT bindet, blockiert. Zur Kontrolle wurde die Calcium-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT mit Hilfe eines Gelshifts überprüft, die durch CsA blockiert wurde. Überraschenderweise hatte CsA keinen Einfluss auf den apoptotischen Verlauf oder das Zusammenbrechen von  $\Delta\Psi_m$  (Abbildung 14A). Das Kontrollexperiment zeigt,

dass CsA jedoch aktiv in der Zelle war, denn der Inhibitor blockierte die Bindung von NFAT an die DNA im Nukleus (Abbildung 14B).

Die bis hierhin durchgeführten Experimente deuten darauf hin, dass Caspasen nach Stimulierung des Zelltodrezeptors CD95 zumindest in Jurkat-Zellen auf direktem Weg aktiviert werden. Caspase-8 fungiert dabei als apikale Caspase, die über Bid-Spaltung  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch induzieren kann. Der mitochondriale Weg ist jedoch nicht notwendig für die Manifestation der apoptotischen Morphologie. Im Gegensatz dazu werden Caspasen nach Bestrahlung als Folge der mitochondrialen Schädigung aktiviert, die durch die anti-apoptischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> verhindert wird. Für die protektive Wirkung der Bcl-2-Proteine scheint eine Interaktion mit der PT-Pore nicht essentiell zu sein. Die Ergebnisse erlauben außerdem die Schlussfolgerung, dass die strahleninduzierte Hochregulation des Rezeptors CD95 und seines Li-



**Abbildung 14: Rolle der PT-Pore in der strahleninduzierten Apoptose.** A) Zellen wurden direkt vor Bestrahlung mit Cyclosporin A (CsA, 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Diese Vorbehandlung hatte weder einen Einfluß auf die strahleninduzierte Apoptose noch verzögerte sie den  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch. Die Daten repräsentieren eins von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. B) Die CsA-Aktivität in der Zelle wurde mit Hilfe der Gelshift-Analyse überprüft. CsA blockierte NFAT-Aktivierung, die durch den SERCA-Inhibitor Thapsigargin induziert wurde.

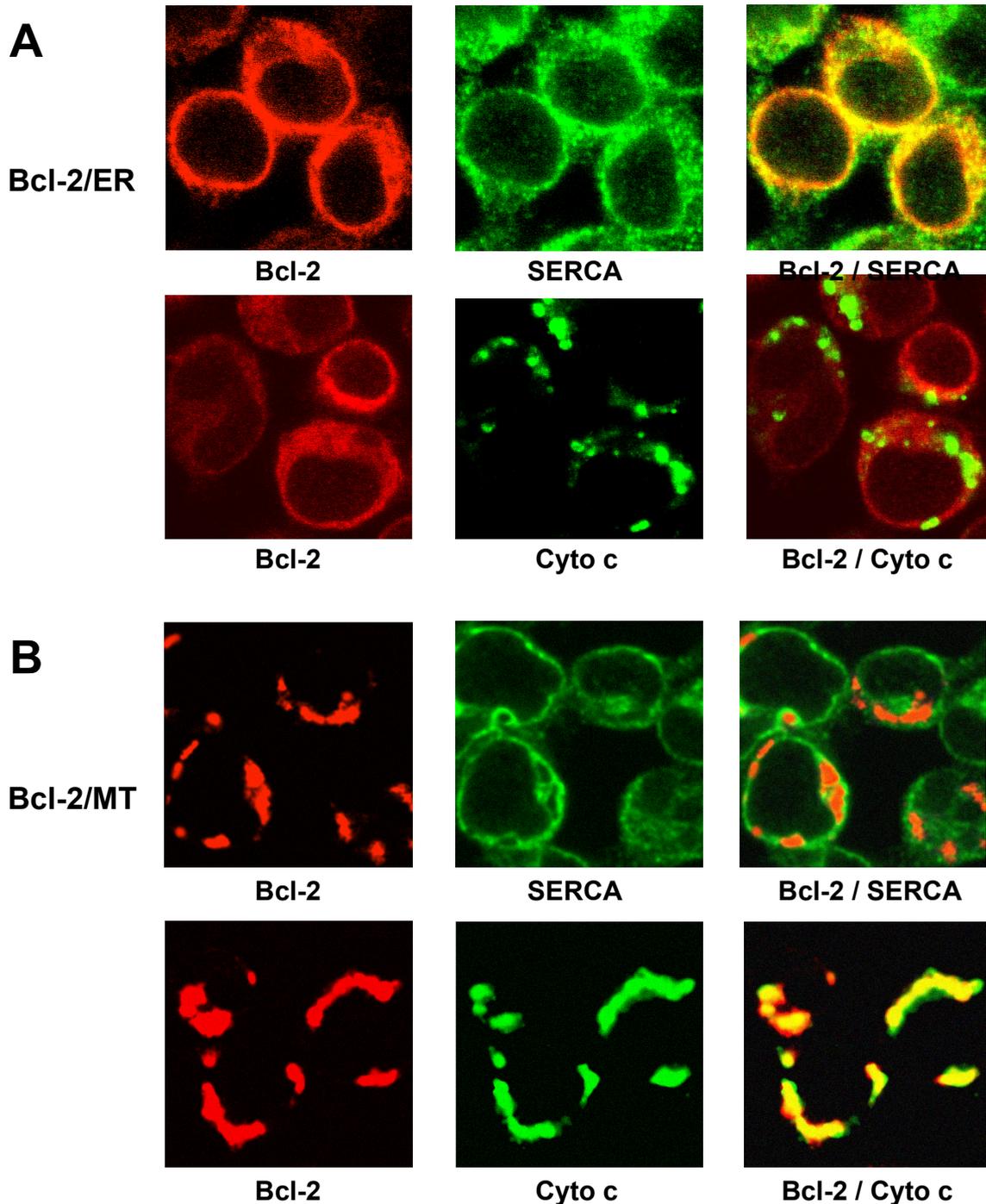
ganden CD95L an der Zelloberfläche keine wichtige Rolle spielt, da Caspase-8 für diesen programmierten Zelltod nicht essentiell war.

## 6.6 Apoptoseregulierung in verschiedenen subzellulären Kompartimenten

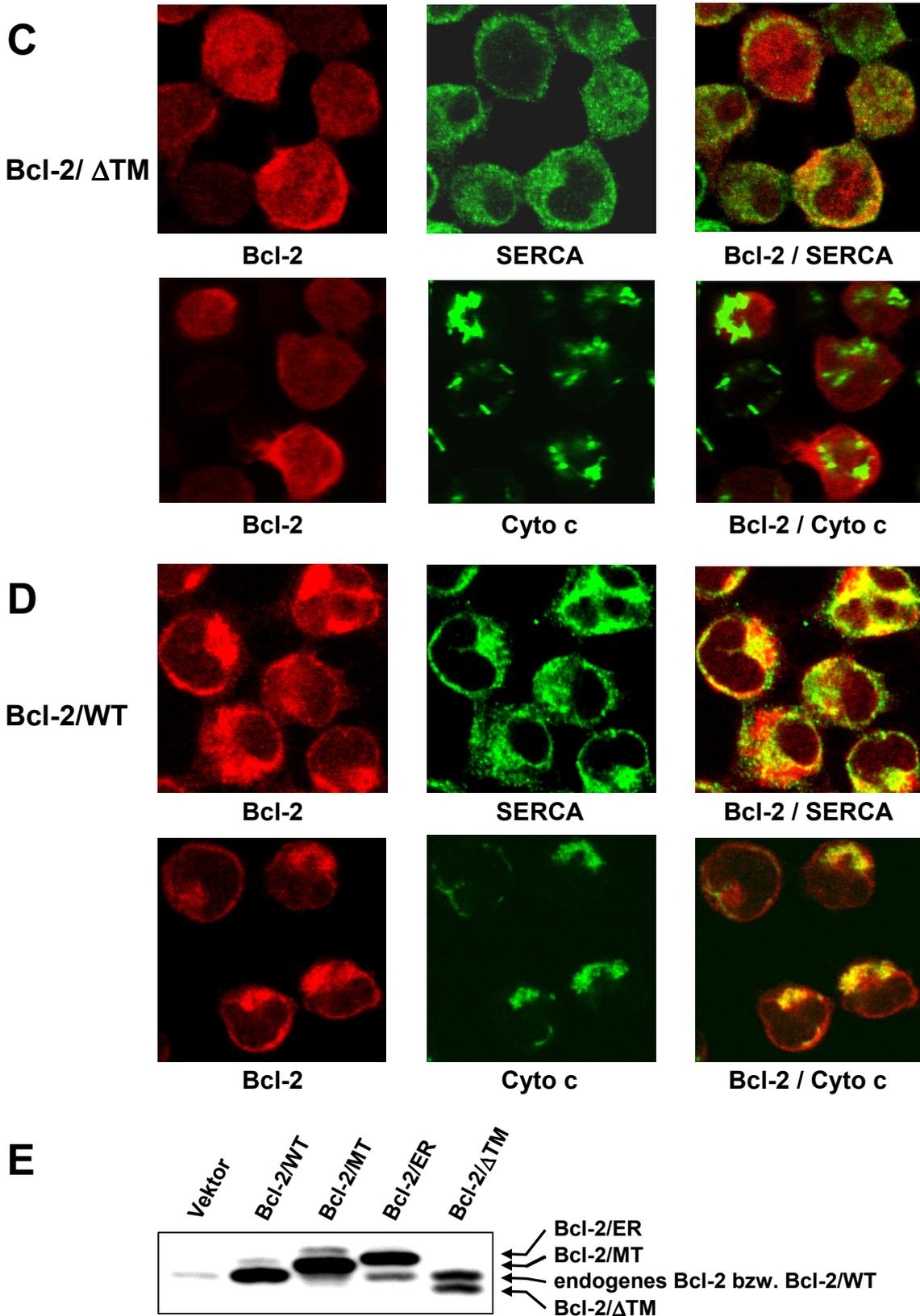
### 6.6.1 Subzelluläre Bcl-2-Expression

Bisherige Untersuchungen von Bcl-2 im Hinblick auf seine anti-apoptotische Funktion konzentrierten sich auf seine Rolle am Mitochondrium. Eine Bcl-2-Expression wurde aber auch perinukleär und am ER nachgewiesen. Die Bedeutung der subzellulären Lokalisation für die protektive Eigenschaft des Proteins ist jedoch weitgehend unverstanden. In folgenden Experimenten wurde deshalb Bcl-2 spezifisch am Mitochondrium (Bcl-2/MT), am ER (Bcl-2/ER), als Wildtyp an beiden Organellen (Bcl-2/WT) oder ohne die C-terminale Verankerungsdomäne (Bcl-2/ $\Delta$ TM) in Jurkat-Zellen überexprimiert.

Wie bereits beschrieben, wurde die subzelluläre Restriktion der Expression erreicht, indem der Bcl-2-Membrananker durch die mitochondriale Insertionssequenz von ActA, einem Protein der *Listeria monocytogenes*, oder durch die ER-spezifische Sequenz des Ratten-Cytochrom b5 ersetzt wurde (Zhu *et al.*, 1996). Die organellspezifische Lokalisation jeder Bcl-2-Form wurde außerdem durch Kofärbung mit mitochondrialem Cytochrom c, bzw. der endoplasmatischen Calcium-ATPase SERCA, mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie überprüft. Wie Abbildung 15 entnommen werden kann, kolokalisierte Bcl-2/ER mit SERCA, Bcl-2/MT und Bcl-2/ $\Delta$ TM dagegen nicht. Gegensatz dazu zeigte Bcl-2/MT das für die mitochondriale Expression typische Pünktchenmuster, das der Cytochrom c-Färbung entspricht, während Bcl-2/ER und Bcl-2/ $\Delta$ TM am Mitochondrium nicht detektiert wurden. Aufgrund der fehlenden Transmembrandomäne wurde Bcl-2/ $\Delta$ TM diffus im Zytosol exprimiert. Auch der Zellkern wurde von der Bcl-2-Färbung nicht ausgeschlossen. Dies weist darauf hin, dass Bcl-2/ $\Delta$ TM frei in den Zellkern diffundieren konnte. Bcl-2/WT-Zellen zeigten schließlich eine Kolokalisierung mit SERCA und mit Cytochrom c. Eine rote, diskrete Hintergrundfärbung, die in allen Zellen nachgewiesen werden konnte, ist auf endogenes Bcl-2 in Jurkat-Zellen zurückzuführen. Die Bcl-2-Expressionsniveaus der verschiedenen Konstrukte wurde weiterhin mit Hilfe der Westernblot-Technik überprüft (Abbildung 15E).



**Abbildung 15A-B: Subzelluläre Lokalisation von Bcl-2/ER und Bcl-2/MT.** Die subzelluläre Bcl-2-Lokalisation wurde mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie überprüft. In stabil transfizierten Zellen wurde Bcl-2 (rot) zusammen mit der endoplasmatischen Calcium-ATPase SERCA, bzw. mit dem mitochondrialen Cytochrom c (grün) gefärbt. Überlagerungen erscheinen gelb. A) Bcl-2/ER kolokalisiert mit dem endoplasmatischen Marker SERCA, aber nicht mit Cytochrom c. B) Im Gegensatz dazu zeigt Bcl-2/MT eine Kolokalisation mit Cytochrom c am Mitochondrium, jedoch nicht mit SERCA.



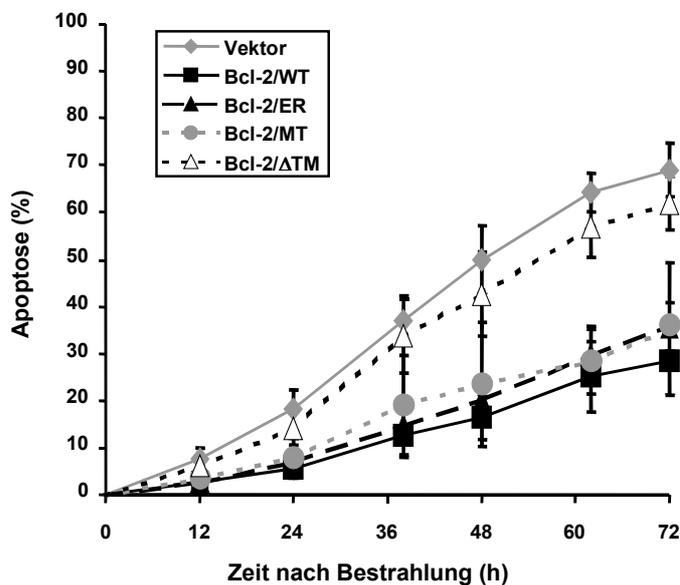
**Abbildung 15C-E: Subzelluläre Lokalisation von Bcl-2/ $\Delta$ TM und Bcl-2/WT.** C) Bcl-2/ $\Delta$ TM ist zytosolisch und nukleär lokalisiert. D) Bcl-2/WT ist dagegen am Mitochondrium und am ER zu finden. E) Die Expression dieser verschiedenen Bcl-2-Konstrukte wurde außerdem mit Hilfe der Westernblot-Technik überprüft. Jurkat-Zellen, die mit dem leeren Vektor transfiziert wurden, exprimieren endogenes Bcl-2 auf sehr niedrigem Niveau. Die unterschiedlichen Bcl-2-Konstrukte werden in den entsprechenden Transfektanten überexprimiert. Aufgrund der längeren C-Termini ist die Wanderungsgeschwindigkeit von Bcl-2/MT und Bcl-2/ER im Gel gegenüber dem endogenen Bcl-2 verlangsamt. Bcl-2/ $\Delta$ TM besitzt ein geringeres Molekulargewicht als das endogene Bcl-2.

6.6.2 Kontrolle der Apoptose nach ionisierender Strahlung

Weil die bisherigen Ergebnisse auf eine mitochondriale Kontrolle der strahleninduzierten Signaltransduktion deuteten, wurde in den folgenden Experimenten untersucht, inwiefern Bcl-2 in anderen subzellulären Kompartimenten die Apoptose beeinflusst. Überraschenderweise schützte endoplasmatisches Bcl-2 genauso gut wie mitochondriales Bcl-2 oder Bcl-2/WT vor programmiertem Zelltod nach Bestrahlung mit 10 Gy. Nicht verankertes Bcl-2 (Bcl-2/ $\Delta$ TM) besaß keine protektive Wirkung (Abbildung 16).

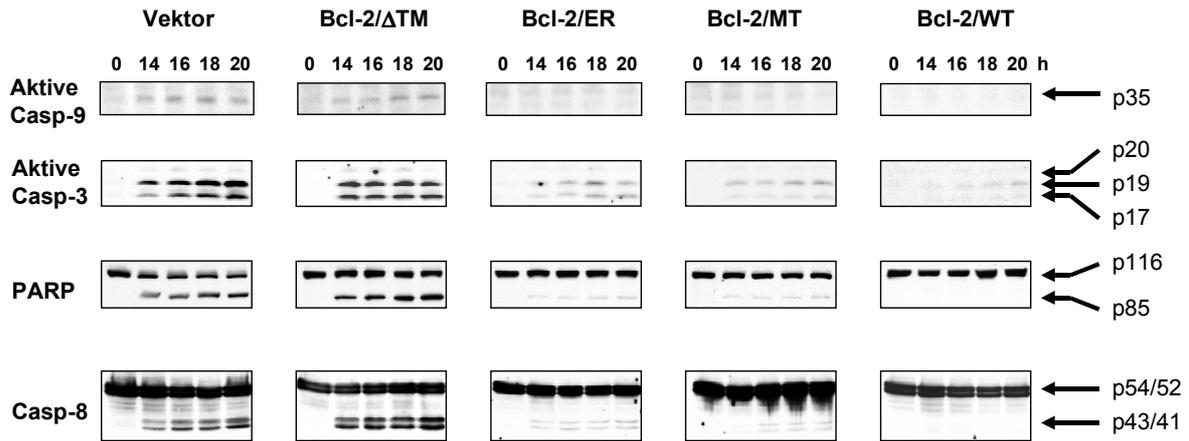
Da Apoptose mit Caspasenaktivierung assoziiert wird, stellte sich die Frage, ob unterschiedlich lokalisiertes Bcl-2 diesen Schritt unterbinden kann. Caspase-9 wird nach Exposition gegenüber ionisierenden Strahlen als apikale Caspase zuerst nach mitochondrialer Schädigung autoproteolytisch aktiviert. In einer Kaskade aktiviert sie ihrerseits andere Caspasen. U.a. werden Caspase-3 und auch Caspase-8 gespalten, wie den vorherigen Experimenten entnommen werden konnte (siehe Abbildung 11). Es wurde erwartet, dass sowohl Bcl-2/WT als auch Bcl-2/MT die Prozessierung von Caspase-9, -3 und -8 sowie die Spaltung des Caspase-3-Substrats PARP verhindern. Außer diesen beiden Bcl-2-Konstrukten blockierte aber auch endoplasmatisches Bcl-2 Caspasen-vermittelten Proteolyse, während Bcl-2/ $\Delta$ TM auch hier keine Wirkung zeigte (Abbildung 17).

Es wurde beschrieben, dass Bcl-2 nach Mikroinjektion von Cytochrom c ins Zytosol die Ausbildung einer apoptotischen Morphologie verhindert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde jedoch bereits gezeigt, dass Bcl-2 vor strahleninduziertem  $\Delta\Psi_m$ -



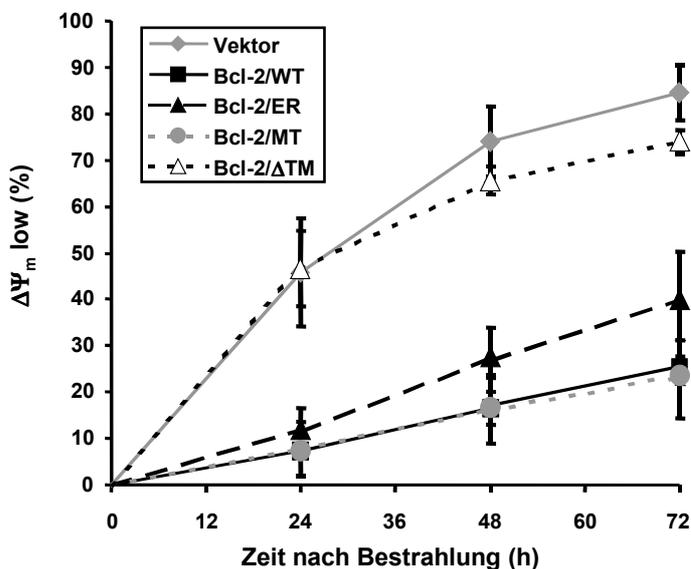
**Abbildung 16: Induktion der Apoptose nach Bestrahlung.**

Die Zellen wurden mit einer Dosis von 10 Gy bestrahlt. Apoptose wurde durchflußzytometrisch zu den indizierten Zeitpunkten gemessen. Bcl-2/WT, Bcl-2/MT sowie Bcl-2/ER schützten vergleichbar gut vor strahleninduzierter Apoptose, wohingegen Bcl-2/ $\Delta$ TM keine Protektion zeigt.



**Abbildung 17: Caspasenaktivierung nach Bestrahlung.** Westernblot-Analyse zeigt eine deutliche Caspasen- und PARP-Prozessierung in den Kontrollzellen (Vektor) und in Bcl-2/ΔTM-exprimierenden Zellen. Bcl-2/WT, aber auch Bcl-2/MT und Bcl-2/ER, blockieren Caspasenproteolyse nach Bestrahlung.

Zusammenbruch schützt. Da Cytochrom c aus beschädigten Mitochondrien freigesetzt wird, würde dies eine Protektion des endoplasmatischen Bcl-2 sekundär zum mitochondrialen Schaden implizieren. Alternativ könnte Bcl-2 Apoptoseinduktion auch oberhalb der mitochondrialen Ebene kontrollieren, z.B. durch Regulation der Calciumhomeostase nicht nur am Mitochondrium, sondern auch am ER. Die Analyse des mitochondrialen Membranpotentials nach Bestrahlung zeigte einen Schutz sowohl durch Bcl-2/ER als auch durch Bcl-2/MT und wie erwartet durch Bcl-2/WT (Abbildung 18). In Zellen, die Bcl-2/ΔTM überexprimierten, brach das mitochondriale Membranpotential dagegen mit vergleichbarer Kinetik zusammen wie in Zellen, die mit einem Kontrollvektor transfiziert wurden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Bcl-2 am ER und am Mitochondrium die mitochondriale Homeostase aufrechterhalten können.



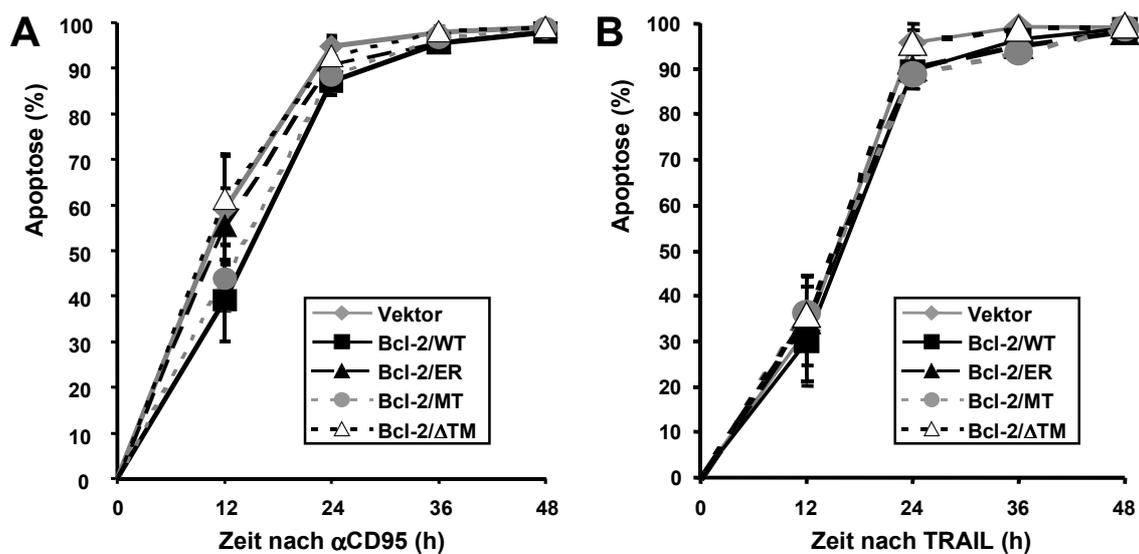
**Abbildung 18: Mitochondriale Membranpotentialänderungen nach Bestrahlung.**

Nach Bestrahlung wurde zu den indizierten Zeitpunkten der Prozentsatz der Zellen mit intaktem mitochondrialem Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) durchflußzytometrisch bestimmt. Sowohl Bcl-2/WT, als auch Bcl-2/MT und Bcl-2/ER, schützen vor  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch. Bcl-2/ΔTM zeigt dagegen keine Protektion.

6.6.3 Kontrolle der Apoptose nach Stimulierung der Zelltodrezeptoren

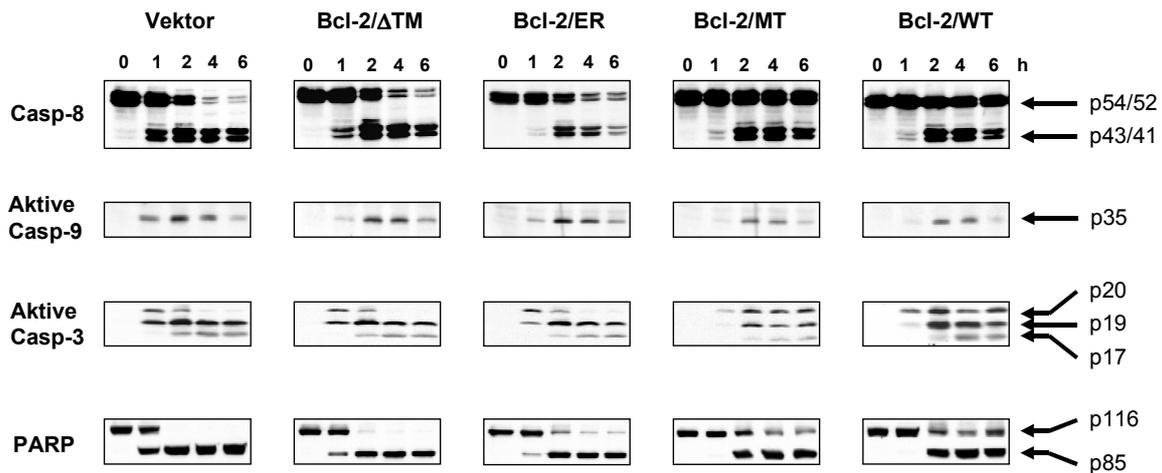
Untersuchungen zur Bcl-2-vermittelten Protektion nach Stimulierung eines Zelltodrezeptors führten zu widersprüchlichen Aussagen, die von dem verwendeten Zellsystem abhingen. Jurkat T-Zellen wurden als Typ II-Zellen charakterisiert, die Apoptose über den mitochondrialen Weg einleiten (Scaffidi *et al.*, 1998). In vorangegangenen, eigenen Experimenten wurde jedoch gezeigt, dass Bcl-2-Überexpression die Apoptoseinduktion nach CD95-Aktivierung lediglich moderat verzögert, jedoch nicht verhindert. Um den Einfluß der unterschiedlichen subzellulären Kompartimentierung von Bcl-2 nach Rezeptorstimulierung zu testen, wurden die Zellen mit den unterschiedlichen Bcl-2-Transfektanten durchflußzytometrisch nach Inkubation mit 100 ng/ml des agonistischen CD95-Antikörpers, bzw. mit 100 ng/ml TRAIL, analysiert. Unabhängig davon, ob und wo Bcl-2 exprimiert wurde, waren immer etwa 90% aller Zellen 24 h nach Stimulierung apoptotisch (Abbildung 19).

Caspase-8 fungiert als Initiatorcaspase, die nach Trimerisierung, bzw. Oligomerisierung der Zelltodrezeptoren direkt an dem sogenannten DISC-Signalkomplex aktiviert wird. *In vitro* ist Caspase-8 in der Lage, Caspase-3 zu prozessieren. Über den mitochondrialen Weg kann aber auch Caspase-9 proteolytisch gespalten werden. In Übereinstimmung mit bisherigen Daten konnten Spaltfragmente der verschiedenen Caspasen und des Caspase-3-Substrats PARP in Zellen, die Bcl-2 mitochondrial exprimieren, verzögert nachgewiesen werden (Abbildung 20). Während die Proform



**Abbildung 19: Induktion der Apoptose nach Stimulierung der Zelltodrezeptoren.**

Wie die durchflußzytometrische Messung zeigt, führt die Aktivierung des Rezeptors CD95 bzw. Stimulierung der Zellen mit TRAIL zur Apoptose unabhängig davon, ob und an welcher Position Bcl-2 exprimiert wird.



**Abbildung 20: Caspasenaktivierung nach Stimulierung von CD95.** Stimulierung des Zelltodrezeptors führt zur Caspasenprozessierung in allen Zellen. In Zellen, die Bcl-2 mitochondrial exprimieren (Bcl-2/WT und Bcl-2/MT) werden die Caspasen jedoch mit verzögerter Kinetik aktiviert.

von Caspase-8 in den Zellen, die mit dem leeren Vektor, Bcl-2/ER, bzw. Bcl-2/ΔTM transfiziert wurden, nach 4 h bis 6 h nahezu vollständig verbraucht wurde, blieb diese Procaspase sowie auch das intakte PARP in Bcl-2/MT- und Bcl-2/WT-Zellen weitgehend unprozessiert.

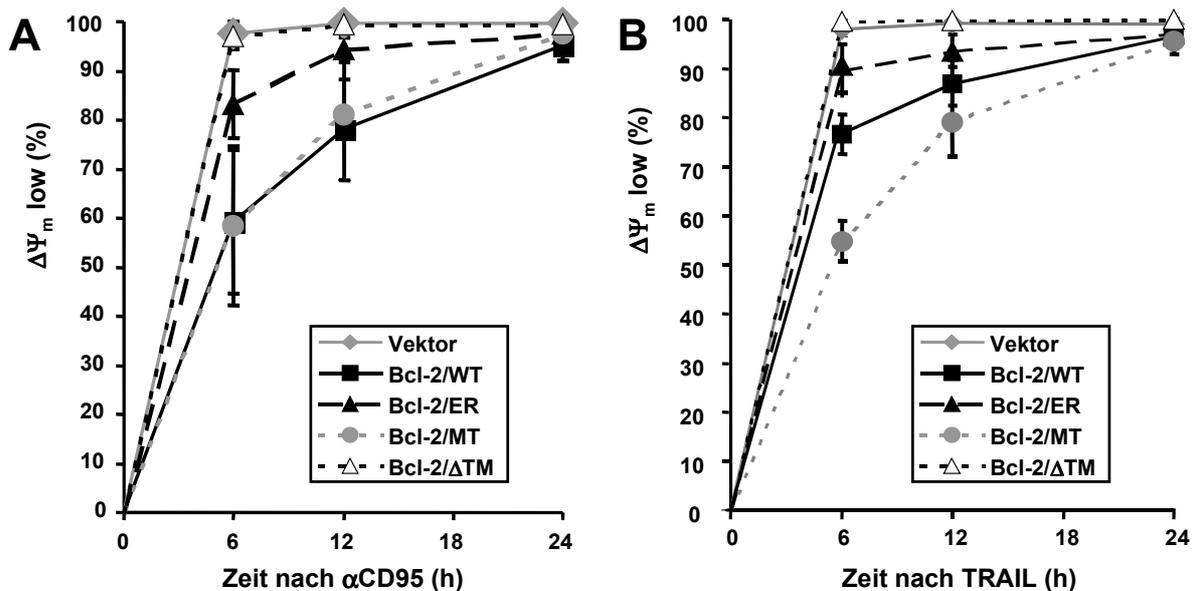
Die proteolytische Caspase-3-Spaltung wurde mit einem Antikörper detektiert, der gegen die aktive Form gerichtet ist. Die initiale Spaltung nach D315 zwischen der großen und kleinen Untereinheit führt zur Generierung der p20- und p12-großen Fragmente. Ersteres kann anschließend weiter durch die bereits aktive Caspase-3 selbst am D9 (p19-Fragment) oder am D28 durch Caspase-9 (p17-Fragment) prozessiert werden. Die Proteolyse zum p17-Fragment wurde aufgrund der Blockierung des mitochondrialen Weges und Caspase-9-Aktivierung durch Bcl-2/MT und Bcl-2/WT sehr effizient verzögert. In diesen Zellen wurden bevorzugt p20- und p19-Fragmente detektiert, während Bcl-2/ΔTM und überraschenderweise auch Bcl-2/ER Caspase-9- und Caspase-3-Prozessierung nicht beeinflussten.

Die anschließende Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials untermauerte die bisherigen Ergebnisse. Mitochondriales Bcl-2 verzögerte leicht den  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch nach Stimulierung der Zellen über den CD95-Rezeptor oder mit TRAIL, wohingegen diffus und endoplasmatisch exprimiertes Bcl-2 nahezu keinen Einfluß auf die Kinetik zeigten (Abbildung 21).

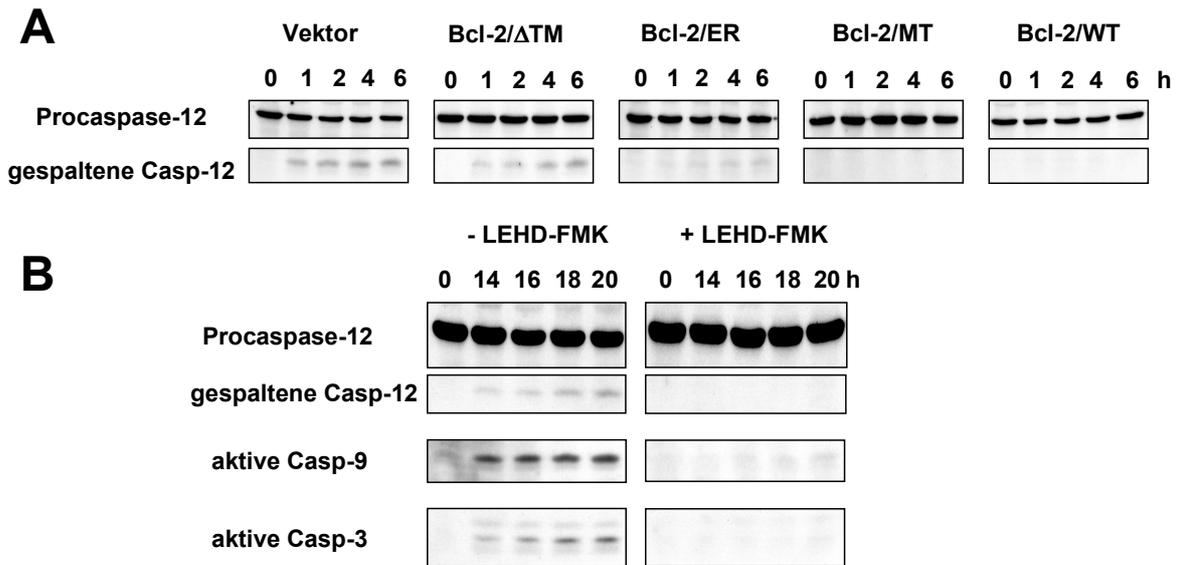
6.6.4 Rolle von Caspase-12 in strahleninduzierter Apoptose

Bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführte Experimente lassen eine Kontrolle der apoptotischen Signaltransduktion durch Bcl-2 nicht nur am Mitochondrium sondern auch am ER vermuten. Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse zeigten die Notwendigkeit von Caspase-12-Aktivierung im programmierten Zelltod, der durch ER-Stress ausgelöst wurde (Nakagawa *et al.*, 2000). ER-Stress konnte durch Blockierung des Proteintransports mit Brefeldin A oder durch Hemmung der Proteinglykosylierung im Golgi-Apparat mit Tunicamycin induziert werden. Apoptose nach Behandlung mit Staurosporin oder nach CD95-Stimulierung wurde in Caspase-12-defizienten Zellen dagegen nicht beeinträchtigt. Um die Rolle der Caspase-12 bei der strahleninduzierten Apoptose aufzuklären wurde Caspase-12-Prozessierung untersucht. Das polyklonale Serum erkennt Procaspase-12 als eine Bande in Höhe von 53 kD im Westernblot. Nach Bestrahlung mit 10 Gy tauchte eine Bande in Größe von etwa 17 kD in Zellen auf, die mit dem leeren Vektor, bzw. mit dem Bcl-2/ $\Delta$ TM-Konstrukt transfiziert wurden. Bcl-2-Expression in mitochondrialer oder alternativ in endoplasmatischer Position verhinderte Caspase-12-Aktivierung (Abbildung 22A).

Bisher wurde Caspase-9 in der Aktivierung der Caspasenkaskade nach Bestrahlung eine Schlüsselposition zugesprochen. Ob Caspase-12 nun initial oder sekundär zu Caspase-9 aktiviert wird, wurde in dem folgenden Experiment geklärt. Behandlung



**Abbildung 21: Mitochondriale Membranpotentialänderungen nach Stimulierung der Zelltodrezeptoren.** Aktivierung des Rezeptors CD95 bzw. Stimulierung der Zellen mit TRAIL führt zum  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch in allen Transfektanten. Mitochondrial exprimiertes Bcl-2 verzögert jedoch die mitochondriale Schädigung.



**Abbildung 22: Rolle der Caspase-12 in strahleninduzierter Apoptose.** A) Aktivierung der Caspase-12 konnte nach Bestrahlung in den Kontrollzellen und in Zellen, die Bcl-2 ohne die Transmembrandomäne exprimieren (Bcl-2/ΔTM), nachgewiesen werden. Bcl-2 in der mitochondrialen oder der endoplasmatischen Position blockiert Caspase-12-Prozessierung. B) Behandlung der Kontrollzellen mit dem Caspase-9-Inhibitor LEHD-FMK (30 μM) kurz vor der Bestrahlung verhindert die apoptotische Proteolyse der Caspasen -12, -9 sowie -3.

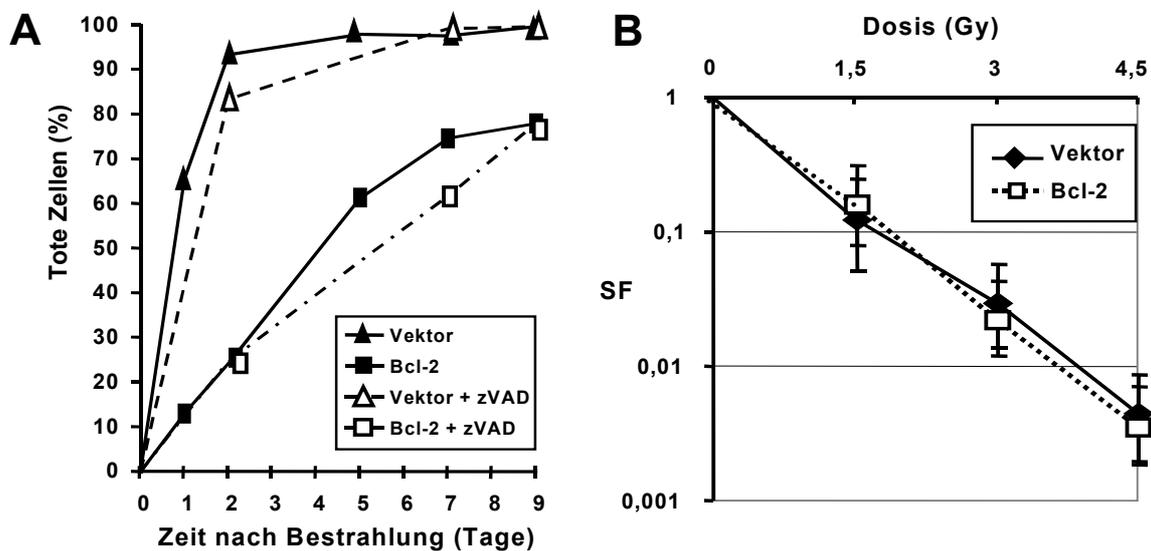
der Jurkat-Zellen mit 30 μM LEHD-FMK, einem Caspase-9-Inhibitor, 30 min vor Bestrahlung führte dazu, dass nicht nur die Prozessierung von Caspase-9 und -3, sondern auch die von Caspase-12 blockiert wurde (Abbildung 22B). Folglich wird zumindest in diesem Zellsystem durch Exposition gegenüber ionisierender Strahlung Caspase-12 erst sekundär zu Caspase-9 aktiviert.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass Bcl-2 sowohl am Mitochondrium als auch am ER in der Lage ist, Zellen vor Apoptoseinduktion nach Bestrahlung, aber nicht nach Stimulierung der Zelltodrezeptoren zu schützen. Die Verankerung von Bcl-2 in subzellulären Membranen ist essentiell für die Protektion, da eine Deletion der Transmembrandomäne zum Verlust der anti-apoptotischen Wirkung führt.

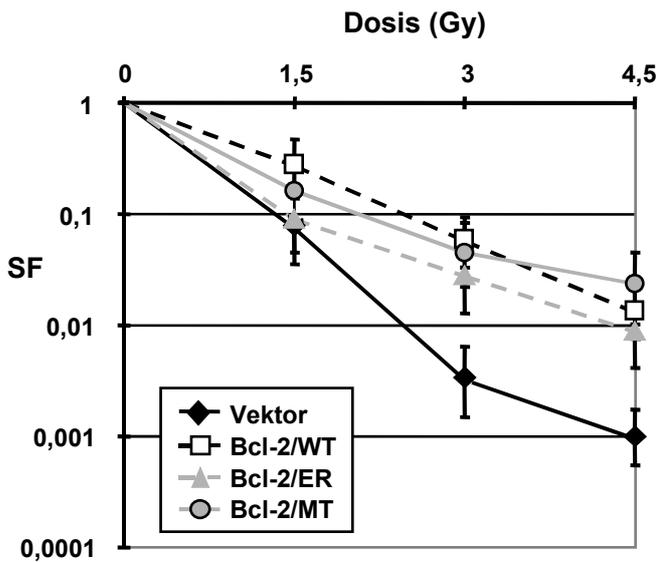
### 6.7 Einfluss von Bcl-2 auf das Langzeitüberleben und die Strahlensensitivität

Es ist unklar, auf welcher Ebene die Entscheidung getroffen wird, die zum Überleben oder zum Tod der Zelle nach Bestrahlung führt. Deshalb wurde der apoptotische Prozess zum einen durch Bcl-2-Überexpression in der Entscheidungsphase, zum anderen durch Caspaseninhibierung in der Degradationsphase blockiert.

Obwohl der Caspaseninhibitor zVAD-FMK bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  und auch Bcl-2 die Ausbildung der apoptotischen Morphologie nach Bestrahlung verhindern, schützt nur Bcl-2 vor  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch. Folglich wurde angenommen, dass Zellen, die das anti-apoptotische Protein exprimieren, über einen längeren Zeitraum einen Überlebensvorteil besitzen. Die Zellen können jedoch nicht nur aufgrund der schnellen Apoptose eliminiert werden, sondern können auch einen langsameren Tod aufgrund irreparabler DNA-Doppelstrangbrüche eingehen, der eher nekrotische Charakteristika aufweist. Außerdem wurde bei einigen Zelltypen der sogenannte mitotische Tod beschrieben, bei dem die Zellen überhaupt nicht sterben, sondern lediglich aufhören zu proliferieren. Deshalb wurde über einen Zeitraum von bis zu 9 Tagen mit Hilfe der Propidiumiodid-Ausschlussfärbung untersucht, ob Bcl-2-überexprimierende Zellen die Bestrahlung von 10 Gy überleben oder an den Folgen der DNA-Doppelstrangbrüche sterben. Im Gegensatz zu zVAD-FMK verlängerte Bcl-2 das Überleben nach Bestrahlung in den ersten Tagen. Im Verlauf der Zeit gleichen sich die Raten der toten Zellen aneinander an, da auch Bcl-2-überexprimierende Zellen zunehmend starben (Abbildung 23A).



**Abbildung 23: Einfluß von Bcl-2 auf langfristiges Überleben nach Bestrahlung und auf die Strahlensensitivität.** Das Überleben dieser Bcl-2-überexprimierenden Zellen sowie der Kontrollzellen von H. Walczak wurde mit Hilfe der PI-Ausschlußfärbung analysiert. Die Strahlensensitivität wurde mittels eines Klonogenitätstests bestimmt. A) Bcl-2 verlängert das Überleben der Zellen nach Bestrahlung, verhindert letztendlich aber nicht den strahleninduzierten Zelltod. Der Caspaseninhibitor zVAD-FMK (20  $\mu\text{M}$ ) verlängert dagegen weder das kurzfristige noch das längerfristige Überleben. B) Obwohl Zellen, die Bcl-2 überexprimieren, kurzfristig einen Überlebensvorteil besitzen, beeinflusst das anti-apoptotische Protein nicht die Strahlensensitivität. Die Daten repräsentieren jeweils einen von drei unabhängigen Versuchen.



**Abbildung 24: Einfluß von Bcl-2/WT, Bcl-2/MT und Bcl-2/ER auf die Strahlensensitivität.**

Zur Bestimmung der Strahlensensitivität der Jurkat-Zellen, die mit den verschiedenen Bcl-2-Konstrukten transfiziert wurden, wurde ein klonogener Test durchgeführt. Wie an der flacher verlaufenden negativen Steigung sichtbar ist, zeigen Zellen, die diese Bcl-2-Konstrukte exprimieren, eine erhöhte Strahlenresistenz verglichen mit den Vektor-Kontrollzellen. Die Daten repräsentieren einen von drei unabhängigen Versuchen.

Die Auswirkung dieses Überlebensvorteils auf die Strahlensensitivität wurde in einem weiteren Versuch analysiert. Hierfür wurden die Bcl-2-überexprimierenden Zellen, bzw. die mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen, in verschiedenen Dichten ausgesät und mit unterschiedlicher Dosis bestrahlt. Durch Vergleich der Klonogenität der bestrahlten mit der der unbestrahlten Zellen wurde die Überlebensfraktion SF (Surviving Fraction) bestimmt, die auf 1 normiert wurde. Die Steigung der Kurven spiegelt die Strahlensensitivität wider: je steiler die Kurve, desto sensibler ist die Zelllinie. Wie Abbildung 23B jedoch entnommen werden kann, korreliert Bcl-2-Expression trotz der Protektion vor Apoptose nicht mit erhöhter Strahlenresistenz. Sowohl Bcl-2-exprimierende Jurkat-Zellen als auch die Kontrollzellen zeigten beide eine vergleichbare Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung.

Die Untersuchungen zum Langzeitüberleben und Radiosensitivität wurden bisher mit Zellen durchgeführt, die uns freundlicherweise von H. Walczak (DKFZ, Heidelberg) überlassen wurden. Um den beobachteten Effekt zu reproduzieren und den Einfluß der subzellulären Lokalisation zu analysieren, wurden die Experimente mit Jurkat-Zellen, die von unserer Gruppe mit den verschiedenen oben beschriebenen Bcl-2-Konstrukten oder dem Kontrollvektor transfiziert wurden, wiederholt. Wie bereits in vorangehenden Experimenten gezeigt werden konnte, blockierten Bcl-2/WT, Bcl-2/MT und Bcl-2/ER strahleninduzierte Apoptose genauso effektiv wie die Bcl-2-überexprimierende Zellen von H. Walczak, zeigten aber in Gegensatz zu diesen eine signifikant erhöhte Radioresistenz nach Bestrahlung (Abbildung 24).

Diese Versuche lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Bcl-2-Expression nicht unbedingt mit Radiosensitivität korrelieren muss.

## 7 DISKUSSION

### 7.1 Caspase-8 und Bid: essentielle Promotoren der strahleninduzierten Apoptose?

#### 7.1.1 Zwei Wege in die Apoptose

Apoptotische Signaltransduktion nach DNA-Schädigung und Rezeptorstimulierung wird im Hinblick auf die dafür notwendigen Faktoren kontrovers diskutiert. Ergebnisse unserer Studien deuten darauf hin, dass nach Bestrahlung und Rezeptoraktivierung unterschiedliche Wege zur Aktivierung von Caspase-8 und Bid führen. Während Caspase-8- und Bid-Prozessierung durch Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> nach Stimulierung von CD95 lediglich verzögert wurde, wurde die Spaltung der beiden Moleküle nach Bestrahlung komplett blockiert.

Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> gehören zu den anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie, die den programmierten Zelltod auf mitochondrialer Ebene regulieren. Dort verhindern sie den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials sowie die damit assoziierte Freisetzung von pro-apoptotischen Molekülen aus dem Intermembranraum ins Zytosol, wo diese dann helfen, die Caspasenkaskade zu aktivieren (Du *et al.*, 2000; Hengartner & Horvitz, 1994; Kluck *et al.*, 1997; Verhagen *et al.*, 2000). Aufgrund der Messung der mitochondrialen Integrität mit dem potentiometrischen Farbstoff TMRE konnte gezeigt werden, dass Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotential nach Bestrahlung vollständig inhibieren, nach Rezeptorstimulierung aber nur leicht verzögern. Diese Ergebnisse festigen die Vermutung, dass Apoptose nach Bestrahlung auf der mitochondrialen Ebene kontrolliert wird und die Prozessierung von Caspase-8 sowie anderer Caspasen sekundär zur mitochondrialen Schädigung stattfindet. Dagegen erfolgt bei der Rezeptorvermittelten Apoptose die Schädigung der Mitochondrien sekundär zu Caspase-8-Aktivierung.

#### 7.1.2 Caspase-8: eine Initiatorcaspase?

Für die unterschiedlichen Wege, die zur Caspase-8- und Bid-Aktivierung führen, sprechen ebenfalls die Untersuchungen an Caspase-8-negativen Jurkat-Zellen. Caspase-8 ist in der Lage, die meisten anderen Caspasen zu prozessieren (Srinivasula

*et al.*, 1996). Aufgrund ihrer großen Prodomäne mit zwei hintereinander angeordneten DEDs wird sie zu den Initiatorcaspasen gezählt, die direkt am Rezeptorkomplex aktiviert werden kann (Muzio *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1997; Nicholson & Thornberry, 1997). Die Rolle der Caspase-8 nach Aktivierung des Zelltodrezeptors CD95 wurde von mehreren Gruppen beschrieben (Kischkel *et al.*, 1995; Muzio *et al.*, 1996). Sowohl Caspase-8 defiziente Jurkat-Zellen als auch Fibroblasten aus Caspase-8<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigen nach diesem Stimulus eine Apoptoseresistenz (Juo *et al.*, 1998; Varfolomeev *et al.*, 1998). Während Caspase-8 nach Vernetzung des Zelltodrezeptors CD95 mit einem agonistischen Antikörper für den programmierten Zelltod essentiell war, verlief die Apoptoseinduktion in Caspase-8-negativen Zellen nach Bestrahlung jedoch nur schwach verzögert. Demnach fungiert Caspase-8 in der CD95-induzierten Apoptose eindeutig als apikale Caspase, nach Bestrahlung wird sie dagegen sekundär aktiviert. Die Einordnung der Caspasen aufgrund ihrer langen Prodomänen in Initiatorcaspasen ist demnach nicht allgemeingültig, sondern hängt vom jeweiligen Stimulus ab.

Mehrere Gruppen verfolgten die Hypothese, dass Apoptose nach DNA-Schädigung über Zelltodrezeptoren vermittelt wird (Friesen *et al.*, 1996; Fulda *et al.*, 1998; Herr *et al.*, 1997). Weil Caspase-8 in unserem Zellsystem nicht als Initiatorcaspase fungiert, scheint ebenso die Notwendigkeit der Rezeptoraktivierung durch Hochregulierung des CD95L auf der Zelloberfläche für diesen Weg eher unwahrscheinlich. Vermutlich ist die Expression nur eine Folge des zellulären Stress' und für den programmierten Zelltod nicht entscheidend.

### 7.1.3 Rolle von Bid

Bid wurde als ein pro-apoptotisches Molekül der Bcl-2-Familie identifiziert, das nach Spaltung durch Caspase-8 zum Mitochondrium translokalisiert und dort  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch und Cytochrom c-Freisetzung induziert (Li *et al.*, 1998b; Luo *et al.*, 1998). Weil Bid essentiell für die elektrophysiologische Änderungen am Mitochondrium nach Rezeptoraktivierung ist, könnte dieser Faktor hypothetisch eine vergleichbare Rolle in der strahleninduzierten Apoptose spielen. Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, konnte Bid-Prozessierung in Jurkat-Zellen nach Exposition gegenüber  $\gamma$ -Strahlung durch Bcl-2-Überexpression blockiert werden. Somit ist Bid in dieser Signaltransduktion unterhalb der mitochondrialen Schädigung anzusiedeln und ist demnach nicht relevant für den  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch. Im Gegensatz dazu konnte

nach CD95-Stimulierung Bidspaltung auch in Bcl-2-überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Letztere Beobachtung stimmt mit der anderer Gruppen überein, dass CD95-induzierte Apoptose in der Signaltransduktion unterhalb der Bidspaltung durch Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> beeinflusst wird (Li *et al.*, 1998b; Luo *et al.*, 1998). Die verzögerte Bid-Prozessierung in Bcl-2-überexprimierenden Zellen kann durch die Blockade des mitochondrialen Weges erklärt werden: neben der direkten Spaltung durch Caspase-8, die am Rezeptorkomplex aktiviert wurde, kann Bid auch über eine positive Feedbackschleife, die den mitochondrialen Weg einbezieht und die Caspasenaktivierung beschleunigt, aktiviert werden (siehe Abbildung 24).

#### 7.1.4 Kontrolle der strahleninduzierten Apoptose auf mitochondrialer Ebene

Änderungen der mitochondrialen Homeostase können nicht nur in apoptotischen, sondern auch in nekrotischen Zellen beobachtet werden (Vander Heiden *et al.*, 1997). In manchen Zellsystemen wurde dagegen gezeigt, dass das mitochondriale Membranpotential nach verschiedenen Stimuli als Folge der Caspasenaktivierung zusammenbricht (Bossy-Wetzel *et al.*, 1998; Marzo *et al.*, 1998c; Steemans *et al.*, 1998). Ebenso führten die Untersuchungen der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien ins Zytosol zu kontroversen Ergebnissen. Während einige Gruppen mitochondriale Änderungen erst viel später nach Cytochrom c-Freisetzung und Caspasenaktivierung beobachteten, stellten andere Gruppen fest, dass  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch und Cytochrom c-Freisetzung nahezu simultan erfolgen (Heiskanen *et al.*, 1999; Shimizu & Tsujimoto, 2000).

In unserem Zellsystem konnte nachgewiesen werden, dass Caspasenaktivierung und die Manifestation der apoptotischen Morphologie nach Bestrahlung sekundär zu mitochondrialer Schädigung erfolgt und durch Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> komplett blockiert werden kann, wohingegen die Inhibition der Caspasen mit zVAD-FMK die apoptotische Morphologie unterdrückt, aber den  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch nicht beeinflusst.

#### 7.1.5 Der mitochondriale Weg nach CD95-Stimulierung

In bezug auf die Notwendigkeit des mitochondrialen Weges in der CD95-induzierten Apoptose werden unterschiedliche Modelle kontrovers diskutiert. Dazu wurde bereits durch die Beschreibung von Typ I- und Typ II-Zellen Stellung bezogen. In Typ I-Zellen wird demnach eine große Menge von Caspase-8 am Rezeptorkomplex akti-

viert, die ausreichend für die Prozessierung weiterer Caspasen, insbesondere Caspase-3, ist. In Typ II-Zellen wird jedoch nur eine geringe Menge von Caspase-8 gespalten, sodass ein verstärkendes Signal über den mitochondrialen Weg gebraucht wird. In dieser Arbeit wurden Jurkat-Lymphoma als typische Typ II-Zellen beschrieben (Scaffidi *et al.*, 1998). Der Anteil der apoptotischen Jurkat-Zellen nach CD95-Stimulierung wurde durch Bcl-2-Überexpression in diesen Versuchen signifikant reduziert. Im Gegensatz dazu konnte von uns und anderen Gruppen gezeigt werden, dass Apoptose in Bcl-2- und Bcl-x<sub>L</sub>-überexprimierenden Jurkat-Zellen nicht blockiert sondern lediglich leicht verzögert wird. 24 h nach Vernetzung des Zelltodrezeptors mit einem agonistischen Antikörper waren nahezu alle Zellen apoptotisch, unabhängig davon, ob sie die protektiven Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> exprimierten. Trotz reduzierter Prozessierung der Procaspase war die aktivierte Menge von Caspase-8 anscheinend ausreichend, um die Exekutionsphase der Apoptose einzuleiten. Diese Beobachtung, die auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden konnte, deutet darauf hin, dass der mitochondriale Weg zumindest in Jurkat-Zellen nicht essentiell ist, sondern nur der Verstärkung des apoptotischen Signals dient (Engels *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000). Demnach müssten diese Zellen in die Typ I-Kategorie eingeordnet werden. Es ist nicht auszuschließen, dass in anderen Zellsystem eine Eingruppierung in Typ II durchaus sinnvoll scheint. Bid-defiziente Hepatozyten sind resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose (Yin *et al.*, 1999). Da CD95-induzierte Apoptose in einigen Hepatomzellen auch durch Bcl-2 komplett blockiert werden kann, scheint der mitochondriale Weg in einigen anderen Systemen größere Bedeutung zu besitzen (Lamboley *et al.*, 2000).

Kürzlich wurde ein weiteres Protein namens Smac/DIABLO beschrieben, das nach mitochondrialer Schädigung aus dem Intermembranraum freigesetzt wird (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000). Smac/DIABLO ist in der Lage, XIAP zu neutralisieren. Wie bereits beschrieben kann dieses Mitglied der IAP-Proteinfamilie prozessierte Caspase-3 sowie Caspase-9 inhibieren (Deveraux *et al.*, 1999). In Zellen, die XIAP auf einem hohen Niveau exprimieren, würde nach CD95-Stimulierung ausreichende Menge aktiver Caspase-8 generiert werden, die anschließend Caspase-3 prozessieren könnte, aber die gespaltene Caspase-3 wäre aufgrund der Interaktion mit XIAP nicht aktiv. Der mitochondriale Weg, der zur Freisetzung von Smac/DIABLO führt, wäre notwendig, um die Inhibition von Caspase-3 aufzuheben. Die unterschiedliche

Expression von XIAP könnte demnach die ungleiche Rolle der Mitochondrien in Typ I- und Typ II-Zellen nach Stimulierung des Zelltodrezeptors erklären (Green, 2000).

## 7.2 Die Notwendigkeit der PT-Pore

Die Öffnung der PT-Pore wurde als ein wichtiges Ereignis in der Apoptoseinduktion über CD95 und den TNF-Rezeptor 1 beschrieben (Adachi *et al.*, 1997; Pastorino *et al.*, 1996). Die Rolle dieses Kanals nach Exposition der Zellen gegenüber ionisierender Strahlung blieb jedoch zu klären. Es wurde gezeigt, dass CsA die Öffnung der PT-Pore durch Bindung an Cyclophilin D, einem an ANT assoziierten Matrixprotein, hemmen kann (Novgorodov *et al.*, 1991; Petronilli *et al.*, 1994). Weiterhin waren mit CsA behandelte Zellen resistent gegenüber Apoptose, die durch  $\text{TNF}\alpha$  initiiert wurde (Bradham *et al.*, 1998; Pastorino *et al.*, 1996). Unsere Ergebnisse zeigen dagegen keinen Einfluss von CsA auf den apoptotischen Verlauf oder  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch. Für diese Beobachtung kommen mehrere Interpretationen in Frage. Zunächst scheint dieser Kanal nicht essentiell für den programmierten Zelltod nach Bestrahlung zu sein. Unterstützt wird diese Annahme durch ein Experiment an p53-überexprimierenden HeLa-Zellen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Tumorsuppressor p53 in der Lage ist, Apoptose auf einem Weg auszulösen, der kein zytosolisches Cytochrom c benötigt, aber durch Bcl-2 blockiert werden kann (Li *et al.*, 1999). Weiterhin ist denkbar, dass alternative Poren nach Bestrahlung geöffnet werden. Ein potentieller Kandidat ist das pro-apoptotische Protein Bax, das in artifiziellen Membranen Kanäle formieren kann (Antonsson *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 2000). Zum anderen kann die Existenz einer PT-Pore, die durch CsA nicht reguliert werden kann, in humanen Zellen nicht ausgeschlossen werden. Hierfür spricht eine Untersuchung an CsA-insensitiven PT-Poren in Mitochondrien von Hefen (Jung *et al.*, 1997). In der phylogenetischen Entwicklung könnten solche Kanäle erhalten worden sein. Weiterhin wird in vielen humanen Tumoren die Isoform ANT-2 überexprimiert (Barath *et al.*, 1999). Jedoch nur ANT-1, aber nicht ANT-2, kann bei Überexpression Apoptose induzieren (Bauer *et al.*, 1999). Eine antagonistische, CsA-unabhängige Wirkung von ANT-2 kann in unserem Zellsystem nicht ausgeschlossen werden.

Veröffentlichungen neueren Datums weisen darauf hin, dass p53 außer Bax weitere pro-apoptotische Proteine heraufregeln kann, u.a. das apoptoseinduzierende Protein p53AIP1 sowie die Mitglieder der Bcl-2-Familie, die nur die BH3-Domäne besitzen, Noxa und Puma (Nakano & Vousden, 2001; Oda *et al.*, 2000a; Oda *et al.*, 2000b; Yu

*et al.*, 2001). Alle drei Proteine verursachen wie Bax bei Überexpression  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch. Der Mechanismus, der zur Potentialänderung durch diese Proteine führt, muss jedoch noch näher untersucht werden.

Es ist ergänzend anzumerken, dass die  $\Delta\Psi_m$ -Messungen mit dem potentiometrischen Farbstoff TMRE durchgeführt wurden, der in intakten Mitochondrien akkumuliert, da der üblicherweise früher gebrauchte Farbstoff Rhodamin-123 zu Messartefakten führen kann (Metivier *et al.*, 1998). Die erhöhte TMRE-Aufnahme nach Bestrahlung, nicht aber nach CD95-Stimulierung, deutet auf eine Hyperpolarisation der Mitochondrien hin, die auch nach Wachstumsfaktorentzug nach Rhodamin-123-Färbung beschrieben wurde (Vander Heiden *et al.*, 1997). Denkbar ist aber auch eine verstärkte Aufnahme des Farbstoffs aufgrund einer mitochondrialen Schwellung und der Expansion der mitochondrialen Matrix. Da die mitochondriale Integrität nach Bestrahlung durch Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> aufrecht erhalten wird, steht dies im Einklang mit der Beobachtung, dass diese anti-apoptischen Proteine nicht nur  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch verhindern, sondern auch die vorangehende TMRE-Akkumulation in Mitochondrien reduzieren.

### 7.3 Bedeutung der subzellulären Bcl-2-Lokalisation

#### 7.3.1 Bcl-2 in unterschiedlicher subzellulärer Lokalisierung

Das Onkogen Bcl-2 wird an der zytosolischen Seite der äußeren Mitochondrienmembran sowie an endoplasmatischen und nukleären Membranen exprimiert (Chen-Levy & Cleary, 1990; Chen-Levy *et al.*, 1989; Krajewski *et al.*, 1993). Bisher durchgeführte Experimente konzentrierten sich auf die Funktion von Bcl-2 am Mitochondrium, die Bedeutung der Bcl-2-Lokalisation an anderen subzellulären Kompartimenten ist jedoch nur unzureichend untersucht worden. Hinweise auf einen Schutzmechanismus außerhalb der Mitochondrien wurden bereits durch Untersuchungen des zu Bcl-2 homologen Proteins E1B-19K erhalten. Dieses adenovirale Protein, das an perinukleären und zytoplasmatischen Membranen, aber nicht am Mitochondrium lokalisiert ist, inhibierte Apoptose, die durch Expression von Bik/Nbk ausgelöst wurde, genauso gut wie humanes Bcl-2 (Han *et al.*, 1996).

Um die Rolle des Onkogens im Hinblick auf seine zelluläre Verteilung näher zu beleuchten, wurde Bcl-2 spezifisch am ER, am Mitochondrium, als Wildtyp, bzw. diffus ohne die Transmembrandomäne in Jurkat-Zellen exprimiert. Die Ergebnisse der vor-

gelegten Arbeit belegen, dass nicht nur mitochondriales, sondern auch endoplasmatisches Bcl-2 mit vergleichbarer Effizienz protektiv gegenüber strahleninduzierter Apoptose, Caspasenaktivierung und  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch wirkt. Nach Stimulierung der Zelltodrezeptoren mit 100 ng/ml des agonistischen Antikörpers CH11 oder TRAIL konnte dagegen keine Protektion durch Bcl-2 festgestellt werden. Mitochondriales Bcl-2 verzögerte aber die Potentialänderung am Mitochondrium am stärksten, während endoplasmatisches Bcl-2 in diesem Fall nur einen marginalen Effekt zeigte. Die hier gezeigten Daten beruhen auf Arbeiten mit stabilen *Pool*-Transfektanten. Da bei einer *Pool*-Transfektion keine Selektion einzelner Klone vorgenommen wurde, ist das Expressionsniveau in den einzelnen transfizierten Zellen heterogen. Die unterschiedliche Hintergrundaktivierung von Caspasen könnte somit auf die inhomogene Bcl-2-Expression zurückgeführt werden. Die Wiederholung der Experimente an mehreren selektionierten Klonen bestätigte jedoch die Ergebnisse, die mit den *Pool*-Transfektanten erzielt wurden (Daten nicht gezeigt).

Die Verwendung der Bcl-2-Konstrukte in anderen Studien führte in manchen Fällen zu anderen Resultaten. Während mitochondrial exprimiertes und Wildtyp-Bcl-2, aber nicht endoplasmatisches Bcl-2, epitheliale MDCK-Zellen vor Apoptoseinduktion nach Serumentzug schützten, war Bcl-2/ER in Rat-1/Myc-Zellen der potentere Apoptoseinhibitor (Zhu *et al.*, 1996). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass endoplasmatisches Bcl-2 das Überleben nach Behandlung von embryonalen Ratten-Fibroblasten Staurosporin mit vergleichbarer Effizienz verlängert wie Bcl-2/WT (Hacki *et al.*, 2000).

Weiterhin wird deutlich, dass die Membranverankerung essentiell für die Funktion dieses Proteins ist. Die Deletion der Transmembrandomäne führte zum vollständigen Verlust des Apoptoseschutzes nach Exposition der Zellen gegenüber ionisierender Strahlung. Auch andere Arbeitsgruppen belegten die Notwendigkeit der Membranverankerung für die Bcl-2-vermittelte Funktion (Froesch *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 1994). Im Widerspruch dazu steht die Aussage von Borner *et al.*, die eine protektive Wirkung eines nicht verankerten Bcl-2-Proteins in Neuronen nach Wachstumsfaktorentzug oder TNF $\alpha$ -Stimulierung nachweisen konnten (Borner *et al.*, 1994). Dies wirft die Frage auf, ob Bcl-2 bei Lokalisation an anderen intrazellulären Membranen, z.B. an Lysosomen oder an der Plasmamembran, immer noch seine protektive Eigenschaft behält.

### 7.3.2 Endoplasmatisch-mitochondriale Interaktionen

Die Daten dieser Arbeit implizieren eine Interaktion („*Crosstalk*“) zwischen Mitochondrium und ER nach Bestrahlung. Dieser *Crosstalk* ist oberhalb des  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruchs anzusetzen, da endoplasmatisches Bcl-2 die Potentialänderung am Mitochondrium vergleichbar gut verhindert wie mitochondrial lokalisiertes Bcl-2.

Mehrere Modelle können eine solche Kommunikation zwischen den beiden Kompartimenten erklären. Zum einen könnte ER-Stress Moleküle freisetzen, die eine apoptotische Kaskade initiieren, die schließlich auch zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt. Ein potentieller Kandidat wäre Caspase-12, die nach Behandlung der Zellen mit Tunicamycin, Brefeldin A oder Thapsigargin aktiviert wird (Nakagawa *et al.*, 2000). Tunicamycin, ein Inhibitor des ER→Golgi-Transports, und Brefeldin A, das N-Glykosylierung unterbindet, induzieren beide ER-Stress durch Proteinhäufung im ER, während Thapsigargin durch Hemmung der Calcium-ATPase SERCA zur vollständigen Entleerung des Calciumspeichers führt. Ebenso wurde von uns beobachtet, dass Bcl-2/ER und Bcl-2/MT Apoptose nach ER-Stress-Induktion mit diesen drei Inhibitoren reduzieren (Daten wurden hier nicht gezeigt). In diesem Zusammenhang wurde bereits beschrieben, dass endoplasmatisches Bcl-2 den Zelltod blockieren kann, der durch Tunicamycin oder Brefeldin A ausgelöst wurde, obwohl die Rolle des mitochondrialen Bcl-2 nicht untersucht wurde (Hacki *et al.*, 2000). Nach Bestrahlung war aber nur eine geringe Caspase-12-Prozessierung sichtbar, die durch LEHD-FMK blockiert werden konnte. Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass Bestrahlung in Caspase-9-negativen Zellen keine Apoptose initiiert, legen nahe, dass Caspase-9 als Initiatorcaspase fungiert, während Caspase-12 nach Bestrahlung sekundär zu dieser gespalten wird.

Ein weiterer Weg der Kommunikation zwischen dem Mitochondrium und ER könnte über Calciumströme erfolgen, da beide Organellen Calcium mit hoher Kapazität speichern können (Pozzan & Rizzuto, 2000). Aus dem ER freigesetztes Calcium kann durch Mitochondrien aufgenommen werden (Arnaudeau *et al.*, 2001). Dadurch wird eine lang andauernde Erhöhung des zytosolischen Calciumspiegels verhindert, die zur Aktivierung von intrazellulären Calcium-abhängigen Endonukleasen führen kann. Durch die Komplexbildung freier zytosolischer  $Ca^{2+}$ -Ionen mit dem Chelator AM-BAPTA wurde DNA-Fragmentierung in bestrahlten Ly-Zellen unterdrückt (Voehringer *et al.*, 1997), während eine andere Gruppe nur marginale Effekte in der MOLT-4-Lymphomazelllinie beobachten konnte (Takahashi *et al.*, 1999). Der Gebrauch von

Calciumkomplexbildnern ist jedoch problematisch, da ein Entzug der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zur Calciumdepletion in anderen Kompartimenten führen kann. Um eine genaue Aussage über den Einfluss veränderter Calciumniveaus im Zytosol und anderer Organellen zu machen, ist die Entwicklung präziserer Messtechniken notwendig.

Bcl-2 ist in der Lage, die Calciumhomeostase am Mitochondrium und ER zu beeinflussen. Hier liegen allerdings widersprüchliche Ergebnisse vor: während die eine Gruppe eine durch Bcl-2-Überexpression beschleunigte Aufnahme des zytosolischen Calcium am ER zeigte (Baffy *et al.*, 1993), beobachteten andere eine Bcl-2-abhängige Reduktion der freien endoplasmatischen Calciumkonzentration (Foyouzi-Youssefi *et al.*, 2000; Pinton *et al.*, 2000). Zusätzlich wurde von einer weiteren Gruppe beschrieben, dass Bcl-2 eine Calciumdepletion im ER-Speicher verhindern kann (He *et al.*, 1997). Durch welche Mechanismen Bcl-2 intrazelluläre Calciumspiegel kontrolliert bleibt unklar. Die Insertion des zytosolischen Bax in die mitochondriale Membran jedoch ist ein wichtiger Schritt im Zelltodprogramm, der durch Depletion des ER-Calciumspeichers verstärkt wird (Pan *et al.*, 2001). Alternativ wäre aufgrund der Homologie des Bcl-2 zu Poren bildenden bakteriellen Toxinen die Formierung von Ionenkanälen denkbar. Weiterhin könnte Bcl-2 andere Moleküle direkt oder indirekt beeinflussen, z.B. die Calcium-ATPase SERCA, den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor oder auch Bim. Bcl-2 kann die SERCA-Expression heraufregulieren. Eine direkte Interaktion von Bcl-2 mit dieser Calcium-ATPase konnte in Immunpräzipitationsstudien nachgewiesen werden (Kuo *et al.*, 1998). Der  $\text{IP}_3$ -Rezeptor ist ein Liganden-abhängiger Kanal, durch den Calcium aus dem ER-Speicher nach Bindung des *second messengers*  $\text{IP}_3$  freigesetzt wird. Bim, ein Protein mit einer BH3-Domäne, das unter normalen Umständen am Dyneinkomplex lokalisiert ist, wechselt nach verschiedenen apoptotischen Stimuli zum Mitochondrium, um dort seine pro-apoptotische Wirkung zu entfalten (Bouillet *et al.*, 1999). Lymphozyten von Bim<sup>-/-</sup>-Mäusen sind indessen apoptoseresistent nach kapazitativem Calciumeinstrom durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophore.

Trotz der eben diskutierten Experimente fehlen immer noch Daten zur Beantwortung der Frage, ob und wie ionisierende Strahlung die intrazelluläre Calciumverteilung reguliert. Allerdings existieren Hinweise auf Proteine, die die Ionenhomeostase nach Bestrahlung regeln können. U.a. konnte gezeigt werden, dass  $\text{IP}_3$ -Rezeptor 1, der die Calcium-Antwort nach TCR-Stimulierung auslöst, auch ein kritischer Faktor in strahleninduzierter Apoptose ist (Jayaraman & Marks, 1997). Außerdem scheint die Tyro-

sinkinase Lck ebenfalls nicht nur für die Calciumfreisetzung aus dem ER nach TCR-Aktivierung, sondern auch für die Prozessierung der Caspasen nach Bestrahlung essentiell zu sein (Belka *et al.*, 1999b; Duplay *et al.*, 1996; Straus & Weiss, 1992). Folglich ist es durchaus denkbar, dass  $\gamma$ -Strahlung eine Änderung lokaler intrazellulärer Calciumkonzentrationen bewirkt, welche durch Bcl-2 gegenreguliert werden könnten.

### 7.3.3 Verschiedene Möglichkeiten der Bcl-2-Aktion

Bcl-2 kann den programmierten Zelltod auf verschiedenen Ebenen blockieren (Abbildung 24). Zum einen können Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> mit pro-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie assoziieren und diese dadurch neutralisieren. Überexpression von Bcl-2 verhindert einen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, der durch Bax-ähnliche Proteine oder durch solche mit nur einer BH3-Domäne induziert wird. Gegen diese wechselseitige 1:1-Titration spricht indessen die Tatsache, dass nur wenige Bim-Moleküle in der Zelle ausreichen, um Apoptose einzuleiten, während wesentlich mehr Bcl-2-Moleküle notwendig sind, um diesen tödlichen Effekt aufzuheben (Bouillet *et al.*, 1999). Weiter gibt es Hinweise, dass Heterodimerisierung nicht notwendig ist für die protektiven Eigenschaften von Bcl-2, wohingegen BH3-Proteine ihr todbringendes Potential notwendigerweise durch direkte Interaktion mit Bcl-2 entwickeln (Adams & Cory, 1998; Kelekar *et al.*, 1997). Es wurden Bcl-x<sub>L</sub>-Mutanten hergestellt, die nicht mehr Bax binden konnten, aber trotzdem mitochondriale Potentialänderungen verhindern konnten, die durch das pro-apoptotische Molekül initiiert wurden (Minn *et al.*, 1999). Dies führt zu der Annahme weiterer durch Bcl-2 kontrollierter Wirkmechanismen. U.a. wurde in Bcl-2-überexprimierenden HeLa-Zellen ein erhöhter Glutathionspiegel detektiert, der möglicherweise durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verursachte nukleäre Schäden reduzieren könnte (Mirkovic *et al.*, 1997). Erst kürzlich veröffentlichte Experimente an Bax/Bak-doppelt negativen Zellen lassen aber auch eine alternative Erklärung zu (Zong *et al.*, 2001): hier wurde beschrieben, dass die Neutralisation der anti-apoptotischen Bcl-2-, bzw. Bcl-x<sub>L</sub>-Aktivität durch die konstitutiv aktiven BH3-Proteine Bim<sub>S</sub>, eine Splicevariante von Bim, und Bad3A, in dem die drei Phosphorylierungsstellen zu Alanin mutiert wurden, nur in Gegenwart von Bax oder Bak zum Zelltod führen. Demnach würden BH3-Proteine Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> sequestrieren, damit Bax-ähnliche Proteine ihre zerstörerische Wirkung entfalten könnten. Im Gegensatz dazu schlug eine weitere Arbeitsgruppe vor, dass

die BH3-Proteine Bid, Bim, Bad und Noxa direkt Bax-ähnliche Proteine aktivieren. Diese Aktivität könnte durch Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> neutralisiert werden (Cheng *et al.*, 2001). Weiterhin können Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub>, wie bereits oben beschrieben, durch Hemmung der PT-Pore mitochondriale Potentialänderungen verhindern, wohingegen Bax die Kanalbildung fördert. Am Mitochondrium und am ER könnten diese Proteine selbst spezifische Poren bilden. Diese Fähigkeit wurde in künstlichen Membranen nachgewiesen, in denen die Proteine über einen breiten pH-Bereich Ionen mit unterschiedlicher Selektivität leiteten. Die Ionenleitfähigkeit der Kanäle war unterdessen bei einem pH-Wert zwischen 4 und 6 optimal (Minn *et al.*, 1997; Schendel *et al.*, 1997). Die zusätzliche Beobachtung, dass Homo- und Heterodimerisierung dieser Proteine im sauren Milieu stabilisiert wurde (Xie *et al.*, 1998), führte zu der Hypothese einer schrittweise ablaufenden Oligomerisierung und Porenbildung mit unterschiedlicher Ionenleitfähigkeit während des intrazellulären pH-Abfalls in apoptotischen Zellen. Unter physiologischen Bedingungen konnte dagegen die Bildung eines Kanals durch Bcl-2 nicht nachgewiesen werden (Murphy *et al.*, 2001).

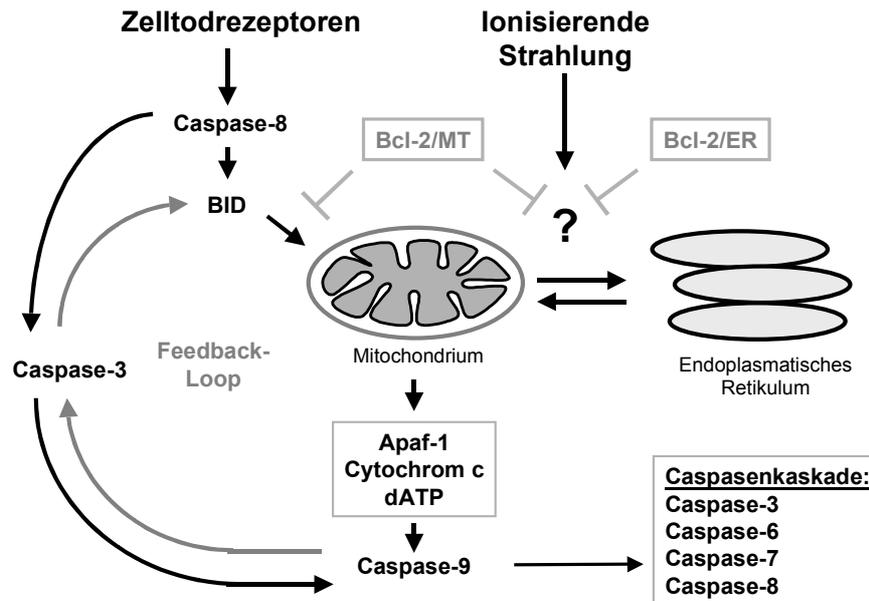
Schließlich wurde gezeigt, dass Bcl-2 nach Mikroinjektion von Cytochrom c ins Zytosol die Zellen vor Apoptoseinduktion schützte. In der apoptotischen Signaltransduktion des *C. elegans* sequestriert das Bcl-2-Homolog Ced-9 Ced-4 am Mitochondrium und verhindert so eine Assoziation des Apaf-1-Homologs mit Ced-3 (Zong *et al.*, 2001). Tatsächlich wurde eine direkte Interaktion zwischen Bcl-x<sub>L</sub> und Apaf-1 in Ko-präzitationsstudien festgestellt (Pan *et al.*, 1998b), die jedoch von anderen Gruppen nach detaillierteren Untersuchungen ausgeschlossen wurde (Hausmann *et al.*, 2000; Moriishi *et al.*, 1999). Es ist nicht unwahrscheinlich, dass das humane Adapterprotein auf andere Weise aktiviert wird als das des Invertebraten, da Unterschiede bereits in der Struktur beider Proteine vorhanden sind. Apaf-1 besitzt neben einer CARD-Domäne und einer ATPase-Domäne, die Ced-4 ebenfalls hat, zusätzlich eine C-terminale Tryptophan- und Aspartat-reiche Sequenz (WD40 Repeats). Außerdem ist für die Ced-4-Aktivierung eine Interaktion des BH3-Proteins Egl-1 mit Ced-9, aber keine Cytochrom c-Freisetzung notwendig, während Apaf-1 erst nach Bindung von Cytochrom c Caspase-9 rekrutieren kann. Kürzlich wurde allerdings publiziert, dass Bcl-2-Überexpression indirekt eine subzelluläre Umverteilung von Apaf-1, das zytosolisch und am Golgi-Apparat lokalisiert ist, zu perinukleären Membranen in NIH-3T3-Fibroblasten, aber nicht in muriner B-Zelllinie WEHI-231 bewirkte (Ruiz-Vela *et*

*al.*, 2001). Diese Umverteilung ist möglicherweise ein wichtiger Prozess, der zur Verhinderung der Caspasenaktivierung führen könnte.

Bislang konnte die Frage, welche dieser Funktionen wichtig für die Regulation der strahleninduzierten Apoptose sind, nicht eindeutig geklärt werden. Die große Vielfalt der Mitglieder der Bcl-2-Protein-Familie erschweren die Untersuchungen, da viele von ihnen in ähnlicher Weise wirken können. Mit Sicherheit hängt die Effektivität einzelner Proteine von ihrem Expressionsniveau ab, die von Zelltyp zu Zelltyp stark differieren kann. Moleküle, die nur die BH3-Domäne besitzen, könnten außerdem als Stress-Sensoren agieren, die in Abhängigkeit vom jeweiligen Stimulus aktiviert werden könnten (Huang & Strasser, 2000; Strasser *et al.*, 2000). Letztendlich könnte die Funktion von Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> selbst durch Caspasen-vermittelte Proteolyse dieser Moleküle gesteuert werden (Clem *et al.*, 1998; Kirsch *et al.*, 1999). Durch die Spaltung würden diese anti-apoptotischen Proteine in potente Mediatoren des programmierten Zelltods umgewandelt werden. Dieser Mechanismus ist für die Apoptoseinduktion nach Bestrahlung jedoch nicht essentiell, da Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> selbst die Aktivierung der Caspasen verhindern.

#### 7.4 Modell der Apoptoseinduktion

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente beweisen das Modell zweier getrennter Wege in den programmierten Zelltod. Wie der schematischen Darstellung in Abbildung 24 entnommen werden kann, induziert ionisierende Strahlung einen oder mehrere bisher nicht identifizierte Faktoren, die eine endoplasmatisch-mitochondriale Interaktion beeinflussen. Wird die Homeostase an einem dieser Organellen gestört, hat dies den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und die Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum zur Folge. Im Zytosol bindet Cytochrom c mit dATP an Apaf-1, welches die Procaspase-9 zum Apoptosomkomplex rekrutiert. Durch die örtliche Konzentrierung dieses Zymogens kommt es zur Autoproteolyse von Caspase-9. Diese Initiatorcaspase ist anschließend in der Lage, weitere Caspasen in einer Kaskade zu aktivieren. In einer Feedbackschleife kann Caspase-3 durch Bidspaltung die mitochondriale Schädigung beschleunigen und das apoptotische Signal verstärken. Im Gegensatz dazu findet Caspasenaktivierung nach Stimulierung der Zelltodrezeptoren direkt an dem Rezeptorkomplex (DISC) statt. Trimerisierung, bzw. Oligomerisierung, von CD95 führt zur



**Abbildung 24: Modell der apoptotischen Signaltransduktion.** Stimulierung der Zelltodrezeptoren führt zur direkten Aktivierung von Caspasen. Initial wird Caspase-8 am Rezeptorkomplex autoproteolytisch aktiviert, die anschließend Caspase-3 und diese weitere Caspasen prozessieren kann. Alternativ kann Caspase-8 Bid spalten und über den mitochondrialen Weg die Caspasenkaskade aktivieren. Mitochondriales Bcl-2 kann den letzteren Weg blockieren. Nach Bestrahlung kommt es zu einem *Crosstalk* zwischen dem Mitochondrium und dem ER. Die Störung der Homeostase dieser Organellen resultiert im  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch. Die daraus resultierende Freisetzung von Cytochrom c führt im Zytosol zur Rekrutierung von Proapoptase-9 zum oligomeren Komplex namens Apoptosom. Nach der Spaltung der Initiatorcaspase an diesem aus Apaf-1, Cytochrom c und dATP bestehenden Komplex werden Effektorcaspasen aktiviert. Bcl-2 schützt sowohl in der mitochondrialen als auch in der endoplasmatischen Position vor Apoptose, die durch ionisierende Strahlung induziert wurde. Über eine Feedbackschleife kann die mitochondriale Schädigung sowohl nach Bestrahlung als auch nach Stimulierung der Zelltodrezeptoren beschleunigt werden.

Rekrutierung von Procaspase-8 über das Adaptermolekül FADD zum DISC und zur Autoproteolyse dieser Initiatorcaspase. Die aktive Caspase-8 kann anschließend direkt oder indirekt durch Bidspaltung über den mitochondrialen Weg, der Caspase-9-Prozessierung involviert, Caspase-3 aktivieren. Durch Aufrechterhaltung der Integrität können Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> die mitochondriale Schädigung verhindern. Die Überexpression dieser beiden Moleküle führt deshalb lediglich zu einer schwachen Verzögerung der Apoptose nach Rezeptorstimulation, jedoch zu einer vollständigen Blockade nach Bestrahlung. Kompliziert wird das Verständnis der Apoptoseregulation nach Bestrahlung durch die endoplasmatisch-mitochondriale Interaktion, die der mitochondrialen Schädigung vorangeht. Dieser *Crosstalk* zwischen dem ER und dem Mitochondrium wird nicht nur durch mitochondrial, sondern auch durch endoplasmatisch lokalisiertes Bcl-2 beeinflusst. Die Expression des protektiven Moleküls am ER inhibiert Apoptose nach Bestrahlung genauso effizient wie seine Expression am Mitochondrium.

Dieses Modell kann auch auf Zellen übertragen werden, die mit UV-Licht bestrahlt wurden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, waren embryonale Stammzellen und Fibroblasten aus Caspase-9<sup>-/-</sup>-Mäusen resistent, während Thymozyten und Splenozyten dieser Mäuse sensitiv gegenüber Apoptoseinduktion nach UV-Bestrahlung waren (Hakem *et al.*, 1998). Diese scheinbare Diskrepanz wird durch die Beobachtung erklärbar, die belegt, dass UV-Strahlung zur direkten CD95-Aktivierung aufgrund einer Konformationsänderung führt (Rehemtulla *et al.*, 1997). Thymozyten und Splenozyten, die den Zelltodrezeptor an der Zelloberfläche exprimieren, sind nach diesem tödlichen Stimulus in der Lage, Caspasen direkt zu aktivieren, während Zellen, die den Rezeptor nicht exprimieren, Apoptose über den mitochondrialen Weg einleiten.

### 7.5 Bcl-2-vermittelte Radioresistenz

Apoptose wird in drei Phasen unterteilt: in die Initiationsphase, die Entscheidungsphase und die Degradationsphase (Slee *et al.*, 1999a). Der Weg des programmierten Zelltods nach Bestrahlung wird wahrscheinlich durch geschädigte DNA initiiert. Die mögliche Aktivierung von Bax, Noxa oder Puma durch den Tumorsuppressor p53 sowie die Öffnung der PT-Pore werden der Entscheidungsphase zugeordnet, während aktivierte Caspasen für die Degradierung der Zelle in der letzten Phase verantwortlich sind.

In den hier diskutierten Experimenten wurden Bcl-2-Überexpression und der Caspaseninhibitor zVAD-FMK dazu verwendet, um die Auswirkungen einerseits der frühen (Initiations-/Entscheidungsphase) und andererseits der späten Phase (Degradationsphase) auf das Überleben der Zellen zu analysieren. Bisherige Ergebnisse deuteten auf eine Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub>-abhängige Blockierung der mitochondrialen Potentialänderung nach Bestrahlung in der Entscheidungsphase hin, wohingegen der Pan-Caspaseninhibitor zVAD-FMK bei einer Konzentration von 20 µM die Ausbildung der apoptotischen Morphologie verhinderte, aber keinen Einfluss auf das kurzfristige Überleben der Zellen ausübte. Die Analyse der Zellvitalität mit Hilfe der PI-Ausschlußfärbung über mehrere Tage zeigten aber, dass auch eine Bcl-2-Überexpression die Zellen längerfristig vor dem Sterben nicht bewahrte, das Überleben in den ersten Tagen nach Bestrahlung hingegen deutlich verlängert wurde.

Eine Begründung für den längerfristig fehlenden Schutz ist nicht leicht zu finden. Unreparierte Doppelstrangbrüche initiieren nach der geläufigen Auffassung die apoptotische Maschinerie in bestrahlten Zellen. Blockierung der Signaltransduktion auf der

mitochondrialen Ebene inhibiert die Apoptose, aber die nicht behobenen DNA-Schäden existieren weiterhin und könnten in der nächsten Mitose nach Akkumulierung von Folgeschäden einen Zelltod ohne die Ausbildung einer typisch apoptotischen Morphologie einleiten. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass bestrahlte Bcl-2-überexprimierenden Jurkat-Zellen sich nach ein bis zwei Wochen zu Riesenzellen mit einem abnormalen DNA-Gehalt entwickeln (eigene Beobachtungen). Alternativ könnten andere Signaltransduktionswege initiiert worden sein, die zu einem langsameren Zelltod führen. Ein potentieller Kandidat ist AIF, der nach seiner Freisetzung aus dem mitochondrialen Intermembranraum DNA-Degradierung in hochmolekulare Fragmente induziert (Lorenzo *et al.*, 1999). Die subzelluläre Umverteilung kann durch Bcl-2 blockiert werden, die Aktivität des einmal freigesetzten Proteins jedoch nicht (Susin *et al.*, 1999). Eine weitere Erklärung liefert die Beobachtung von Li *et al.*, dass p53 die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies stimuliert, deren Akkumulierung zur mitochondrialen Schädigung führt (Li *et al.*, 1999). Bcl-2 verhindert den Zusammenbruch des Membranpotentials in den ersten 48 h, hat aber keinen Einfluß auf die Generierung dieser reaktiven Sauerstoffspezies, die die Zelle auf einem langsameren, nicht durch Bcl-2 kontrollierten Weg schädigen können.

Während viele Arbeiten zu der durch den Tumorsuppressor p53 modulierten Strahlensensitivität erschienen (Brown & Wouters, 1999), wurden bisher nur wenige zur Regulierung dieser durch Bcl-2 veröffentlicht. Unsere Experimente zeigten keine Änderung des klonogenen Überlebens im Hinblick auf die Bcl-2-Expression in den von H. Walczak erhaltenen Zellen, wohingegen die von uns mit verschiedenen Bcl-2-Konstrukten transfizierten Zellen (Bcl-2/WT, Bcl-2/MT und Bcl-2/ER) sehr wohl eine reduzierte Radiosensitivität aufwiesen, obwohl Bcl-2 in allen Zellen Apoptose mit vergleichbarer Effektivität inhibierte.

1997 untersuchten Kyprianou und seine Mitarbeiter zwei Prostatakrebszelllinien im Hinblick auf die Apoptoserate und Klonogenität (Kyprianou *et al.*, 1997). Während Apoptoseinduktion, die nach 72 h bei etwa 40% lag, durch Bcl-2 blockiert wurde, konnte kein Einfluß auf die Strahlensensitivität gemessen werden. Eine weitere Gruppe konnte an Bcl-x<sub>L</sub>-überexprimierenden Jurkat-Zellen keine Verbesserung des klonogenen Überlebens nach Bestrahlung feststellen (Rehemtulla *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu konnte eine erhöhte Radioresistenz in Bcl-2-überexprimierenden Lymphom-Zellen aus p53-defizienten Mäusen nachgewiesen werden (Strasser *et al.*,

1994). Apoptoseinduktion in Vergleichszellen, die kein erhöhtes Bcl-2-Niveau aufwiesen, zeigten eine Rate von 62% nach 48 h. Zur gleichen Schlussfolgerung gelangte eine weitere Arbeitsgruppe nach Analysen in Zelllinien mit spontan aufgetretener Bcl-2-Überexpression (Mirkovic *et al.*, 1997). In 80% der Kontrollzellen wurde DNA-Degradierung bereits 4 h nach Bestrahlung mit 5 Gy detektiert. Somit waren die hier verwendeten Zellen auffallend sensitiv gegenüber Apoptoseinduktion.

In allen beschriebenen Studien war Bcl-2 imstande, Apoptoseinduktion zu verhindern. Die Gruppen arbeiteten aber mit verschiedenen Zellsystemen, in denen apoptotische Wege mit unterschiedlichen Kinetiken aktiviert wurden. In einer weiteren Arbeit wurde zwischen früher Apoptose vor der ersten Mitose nach Bestrahlung und einer späten Apoptose nach mehreren Zellteilungen durch Anhäufung von chromosomalen Abnormalitäten differenziert. In diesem Zusammenhang wurde der Einfluß der frühen Apoptose auf die Klonogenität der Zellen beschrieben (Dewey *et al.*, 1995). Dies könnte die unterschiedliche Auswirkung der Bcl-2-Überexpression auf die Strahlenempfindlichkeit zwischen verschiedenen Zelllinien, aber nicht unserer beiden Jurkat-Zellsysteme erklären.

Ebenso wurden heterogene Ergebnisse in einer großen Anzahl klinischer Studien erzielt. Eine Bcl-2-Überexpression nach immunhistochemischen Kriterien konnte in Tumoren von 35-50% aller Tumorpatienten gesehen werden. Aufgrund der starken protektiven Eigenschaft wurde vermutet, dass Bcl-2 die Ansprechbarkeit insbesondere auf die Strahlen- und Chemo-Therapie reduziert, den Behandlungserfolg senkt und das Überleben der Patienten verkürzt. Gleich in mehreren klinischen Studien sollte deshalb die Rolle des anti-apoptotischen Proteins als prognostischer Faktor in Betracht gezogen werden. Jedoch konnte generell keine prognostische Relevanz einer Bcl-2-Überexpression festgestellt werden. Indessen wurden bei einigen Tumorentitäten gewisse Tendenzen nach Auswertung vieler Studien beobachtet. Während beim Mammakarzinom in einigen Fällen ein erhöhtes Bcl-2-Niveau mit einer besseren Prognose korreliert wurde (Elkhuizen *et al.*, 2000; Jager *et al.*, 2000; Silvestrini *et al.*, 1996), wurde eine Bcl-2-Überexpression in Leukämien und malignen Lymphomen sowie in Uterus- und Blasenkarzinomen ungünstig bewertet (Bylund *et al.*, 1998; Gore *et al.*, 1998; Pillai *et al.*, 1999; Rajkumar *et al.*, 1998; Seiter *et al.*, 2000). In anderen Studien konnte dagegen keine Tendenz abgeleitet werden (Bell *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 1998; Joensuu *et al.*, 1994; Kopp *et al.*, 1998; Newcomb *et al.*, 1998).

Die Heterogenität der *in vitro*- und der klinischen Untersuchungen könnte durch die Betrachtung der verschiedenen Funktionen des protektiven Moleküls erklärt werden. Das anti-apoptotische Molekül Bcl-2 kann den Eintritt der Zellen in die G1-Phase verzögern (Borner, 1996; Mazel *et al.*, 1996; Vairo *et al.*, 2000). Außerdem verhindert das am Threonin 56 phosphorylierte Bcl-2 die Zellzyklusprogression in der G2/M-Phase (Xu *et al.*, 2000). Dieser inhibitorische Effekt auf den Zellzyklus könnte den Nachteil der reduzierten Apoptose ausgleichen oder überlagern.

Weiterhin könnten in Tumoren neben Bcl-2 weitere nicht untersuchte, homologe Proteine, u.a. Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w und A1, verstärkt exprimiert sein, die einen anti-apoptotischen Effekt auch in Abwesenheit von Bcl-2 ausüben, bzw. andere pro-apoptotische Proteine, wie z.B. Bax, deletiert worden sein. Der genetische Hintergrund könnte in der Tat ebenso wichtig für die unterschiedlichen Ergebnisse der *in vitro*-Zellsysteme sein, da möglicherweise erst eine Kombination von Bcl-2 mit einem oder mehreren anderen Proteinen über einen wirklichen Überlebensvorteil entscheidet. So wurde an Mäusen gezeigt, dass Bcl-2 alleine ein schwach transformierendes Onkogen ist, aber in Kombination mit anderen Onkogenen, wie z.B. c-Myc, starke synergistische Effekte in der Tumorgenese aufweist (Jager *et al.*, 1997; Strasser *et al.*, 1990).

Dass eine Apoptosesensitivität, die unseren beiden Bcl-2-überexprimierenden Systemen vergleichbar war, nicht unbedingt mit Radiosensitivität korreliert, ist vermutlich gleichfalls auf den verschiedenen genetischen Hintergrund der Zellen zurückzuführen. Obwohl sie von der selben Zelllinie stammen, können nach Behandlung mit Antibiotika oder durch lange Kultivierung Zellen mit einem zusätzlichen Überlebensvorteil selektioniert worden sein. Wie unsere beiden Jurkat-Zellsysteme zeigten, kann dies zu verschiedenen Aussagen im Hinblick auf die Bcl-2-vermittelte Radioresistenz führen.

Durch die Analyse mehrerer Faktoren, die zur Tumorentstehung führen, oder ganzer Proteingruppen könnte in Zukunft eine bessere Prognose in Hinblick auf das Überleben und die Ansprechbarkeit der Therapie erzielt werden.

## 8 AUSBLICK

Bcl-2 ist eines der am besten beschriebenen Onkogene. Seine Funktion am ER ist bisher unzureichend untersucht. Es gibt Hinweise, dass Bcl-2 die Calciumhomeostase am ER und am Mitochondrium beeinflussen kann (Baffy *et al.*, 1993; Foyouzi-Youssefi *et al.*, 2000; He *et al.*, 1997; Kuo *et al.*, 1998). Die Bedeutung der Calciumsignale und ihre Regulierung durch Bcl-2 während der apoptotischen Signaltransduktion soll der Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten sein. Für diesen Zweck sollen Calcium-bindende fluoreszierende Proteine gezielt im Mitochondrium, am ER oder zytosolisch exprimiert werden. Solche als „Cameleons“ bezeichneten, gelb fluoreszierenden Proteine wurden bereits zur Bestimmung der absoluten Calciumkonzentration im Mitochondrium und ER verwendet (Arnaudeau *et al.*, 2001). Diese Indikatoren, die auf Calmodulin, ein Calcium-bindendes Protein, und auf dem grün fluoreszierenden Protein GFP basieren, wurden von Tsien *et al.* entwickelt (Miyawaki *et al.*, 1999; Miyawaki *et al.*, 1997). Bindung von Calcium an diese Cameleons führt zur Veränderung ihrer Fluoreszenzeigenschaften, die durch Messung der Emission bei geeigneter Wellenlänge detektiert werden. Durch eingeführte Mutationen in der Calcium-bindenden Domäne der Calmodulin-Untereinheit wurden veränderte Affinitäten zu Calcium erzeugt. Dies erlaubt die Messung des Calciumgehaltes in verschiedenen Konzentrationsbereichen.

Fluoreszenzmikroskopische Analysen von Jurkat-Zellen, die diese Calciumindikatoren exprimieren, würden einen Aufschluß über die zelluläre Calciumverteilung nach Bestrahlung liefern.

Die hier durchgeführten Experimente zur Bestimmung der Bcl-2-vermittelten Radioresistenz führten zu keiner eindeutigen Aussage. Die von uns transfizierten Zellen, die Bcl-2 am ER, Mitochondrium oder als Wildtyp überexprimierten, wiesen eine erhöhte Radioresistenz auf, wohingegen die Zellen von H. Walczak in ihrer Strahlenempfindlichkeit durch Bcl-2-Expression nicht verändert wurden. Die Ursache für diesen Unterschied ist vermutlich auf den unterschiedlichen genetischen Hintergrund zurückzuführen, der durch Selektion mit Antibiotika und längere Kultivierung entstehen kann. Um dies auszuschließen, sind die verschiedenen Bcl-2-Varianten bereits in Vektoren mit Tetracyclin-induzierbaren Promotoren kloniert worden. Zur Zeit sind zwei verschiedene durch Tetracyclin regulierbare Systeme der Firma Clontech auf



## 9 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die Erforschung der Signaltransduktionswege nach Exposition der Jurkat-Zellen gegenüber ionisierender Strahlung.

Es wurde gezeigt, dass Caspasen, die Effektoren der apoptotischen Kaskade, sekundär zu mitochondrialen Schäden aktiviert werden. Caspase-8 fungiert in diesem Fall nicht wie bisher angenommen als Initiatorcaspase sondern wird durch andere Caspasen aktiviert. Weiterhin ist Caspase-8 zwar nicht essentiell für strahleninduzierte Apoptose, jedoch für Apoptose nach Stimulierung des Zelltodrezeptors CD95 unerlässlich. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte eine essentielle Involvierung der Zelltodrezeptoren in strahleninduzierte Apoptose ausgeschlossen werden. Außerdem konnte die initiale Induktion von mitochondrialen Potentialänderungen durch das proapoptische Molekül Bid, ein Substrat von Caspase-8, nach Bestrahlung ausgeschlossen werden, da die Aktivierung des Proteins nur in Anwesenheit aktiver Caspasen erfolgte. Es konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass Bid in bestrahlten Zellen auf direktem oder indirektem Weg durch DEVD-spezifische Proteasen, z.B. Caspase-3 oder Caspase-7, unabhängig von Caspase-8 gespalten und aktiviert werden kann.

Diese Ergebnisse implizieren, dass die Aktivierung der Caspasenkaskade und der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nach Bestrahlung nicht durch Caspase-8 und Bid initiiert werden. Allerdings wirken diese Moleküle als Signalverstärker in einer Feedback-Schleife.

Die Rolle der PT-Pore für die strahleninduzierten Apoptose bleibt weiterhin umstritten. Dieser unspezifische, mitochondriale Kanal führt durch seine Öffnung nach verschiedenen apoptotischen Stimuli zur mitochondrialer Schwellung und schließlich zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) mit drauf folgender Cytochrom c-Freisetzung ins Zytosol sowie Caspasenaktivierung. Eine Blockierung der PT-Pore mit Cyclosporin A zeigte indessen keine Auswirkung auf die Apoptoseinduktion nach Bestrahlung. Es konnte jedoch die Existenz einer Cyclosporin A-insensitiven Pore nicht ausgeschlossen werden.

Das Onkogen Bcl-2 ist in verschiedenen intrazellulären Membranen verankert. In einem Zellsystem, in dem Bcl-2 als Wildtyp, gezielt am Mitochondrium, am ER oder ohne die Transmembrandomäne zytosolisch exprimiert wurde, konnte gezeigt werden, dass Bcl-2 am ER genauso effizient Apoptose, mitochondriale Schädigung und Caspasenaktivierung nach Bestrahlung verhinderte wie der Wildtyp oder mitochondriales Bcl-2. Der Verlust der Membranverankerung führte dagegen zum vollständigen Verlust der protektiven Wirkung. Im Gegensatz dazu konnte keines der Bcl-2-Konstrukte Apoptose nach Stimulierung von CD95 oder mit TRAIL blockieren. Jedoch verzögerten Wildtyp-Bcl-2 und mitochondriales Bcl-2 hier die Caspasenprozessierung und die mitochondriale Schädigung.

Abschließend wurde festgestellt, dass die anti-apoptotische Funktion von Bcl-2 nicht zwangsläufig mit einem verbesserten Überleben nach Bestrahlung korrelieren muß. Die Radiosensitivität hängt wahrscheinlich vielmehr von der Expression unbekannter Faktoren ab, die von Zellsystem zu Zellsystem differieren können.

## 10 LITERATUR

- Adachi, S., Cross, A.R., Babior, B.M. & Gottlieb, R.A. (1997). Bcl-2 and the outer mitochondrial membrane in the inactivation of cytochrome c during Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, **272**, 21878-82.
- Adams, J.M. & Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, **281**, 1322-6.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. & Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, **87**, 171.
- Ambrosini, G., Adida, C. & Altieri, D.C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, **3**, 917-21.
- Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J.J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R. & Martinou, J.C. (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*, **277**, 370-2.
- Arnaudeau, S., Kelley, W.L., Walsh, J.V., Jr. & Demaurex, N. (2001). Mitochondria recycle Ca(2+) to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions. *J Biol Chem*, **276**, 29430-9.
- Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, **281**, 1305-8.
- Baffy, G., Miyashita, T., Williamson, J.R. & Reed, J.C. (1993). Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J Biol Chem*, **268**, 6511-9.
- Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L. & Korsmeyer, S.J. (1985). Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell*, **41**, 899-906.
- Barath, P., Albert-Fournier, B., Luciakova, K. & Nelson, B.D. (1999). Characterization of a silencer element and purification of a silencer protein that negatively regulates the human adenine nucleotide translocator 2 promoter. *J Biol Chem*, **274**, 3378-84.
- Bauer, M.K., Schubert, A., Rocks, O. & Grimm, S. (1999). Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *J Cell Biol*, **147**, 1493-502.
- Belka, C., Heinrich, V., Marini, P., Faltin, H., Schulze-Osthoff, K., Bamberg, M. & Budach, W. (1999a). Ionizing radiation and the activation of caspase-8 in highly apoptosis-sensitive lymphoma cells. *Int J Radiat Biol*, **75**, 1257-64.
- Belka, C., Marini, P., Budach, W., Schulze-Osthoff, K., Lang, F., Gulbins, E. & Bamberg, M. (1998). Radiation-induced apoptosis in human lymphocytes and lymphoma cells critically relies on the up-regulation of CD95/Fas/APO-1 ligand. *Radiat Res*, **149**, 588-95.
- Belka, C., Marini, P., Lepple-Wienhues, A., Budach, W., Jekle, A., Los, M., Lang, F., Schulze-Osthoff, K., Gulbins, E. & Bamberg, M. (1999b). The tyrosine kinase lck is required for CD95-independent caspase-8 activation and apoptosis in response to ionizing radiation. *Oncogene*, **18**, 4983-92.
- Bell, J.G., Minnick, A., Reid, G.C., Judis, J. & Brownell, M. (1997). Relationship of nonstaging pathological risk factors to lymph node metastasis and recurrence in clinical stage I endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, **66**, 388-92.
- Bertin, J., Armstrong, R.C., Otilie, S., Martin, D.A., Wang, Y., Banks, S., Wang, G.H., Senkevich, T.G., Alnemri, E.S., Moss, B., Lenardo, M.J., Tomaselli, K.J. & Cohen, J.I. (1997). Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1172-6.
- Blanchard, H., Kodandapani, L., Mittl, P.R., Marco, S.D., Krebs, J.F., Wu, J.C., Tomaselli, K.J. & Grutter, M.G. (1999). The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure Fold Des*, **7**, 1125-33.
- Bodmer, J.L., Burns, K., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Thome, M., Bornand, T., Hahne, M., Schroter, M., Becker, K., Wilson, A., French, L.E., Browning, J.L., MacDonald, H.R. & Tschopp, J. (1997). TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas(Apo-1/CD95). *Immunity*, **6**, 79-88.
- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G. & Thompson, C.B. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, **74**, 597-608.

- Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M.A., Lindsten, T. & Thompson, C.B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*, **3**, 87-98.
- Boone, E., Vanden Berghe, T., Van Loo, G., De Wilde, G., De Wael, N., Vercammen, D., Fiers, W., Haegeman, G. & Vandenabeele, P. (2000). Structure/Function analysis of p55 tumor necrosis factor receptor and fas-associated death domain. Effect on necrosis in L929sA cells. *J Biol Chem*, **275**, 37596-603.
- Borner, C. (1996). Diminished cell proliferation associated with the death-protective activity of Bcl-2. *J Biol Chem*, **271**, 12695-8.
- Borner, C., Martinou, I., Mattmann, C., Irmeler, M., Schaerer, E., Martinou, J.C. & Tschopp, J. (1994). The protein bcl-2 alpha does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis. *J Cell Biol*, **126**, 1059-68.
- Bossy-Wetzler, E., Newmeyer, D.D. & Green, D.R. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J*, **17**, 37-49.
- Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D.C., Tarlinton, D.M., Kay, T.W., Kontgen, F., Adams, J.M. & Strasser, A. (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science*, **286**, 1735-8.
- Boyd, J.M., Gallo, G.J., Elangovan, B., Houghton, A.B., Malstrom, S., Avery, B.J., Ebb, R.G., Subramanian, T., Chittenden, T., Lutz, R.J. & et al. (1995). Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene*, **11**, 1921-8.
- Bradham, C.A., Qian, T., Streetz, K., Trautwein, C., Brenner, D.A. & Lemasters, J.J. (1998). The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release. *Mol Cell Biol*, **18**, 6353-64.
- Brenner, C., Cadiou, H., Vieira, H.L., Zamzami, N., Marzo, I., Xie, Z., Leber, B., Andrews, D., Duclohier, H., Reed, J.C. & Kroemer, G. (2000). Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene*, **19**, 329-36.
- Brockhaus, M., Schoenfeld, H.J., Schlaeger, E.J., Hunziker, W., Lesslauer, W. & Loetscher, H. (1990). Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 3127-31.
- Brown, J.M. & Wouters, B.G. (1999). Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res*, **59**, 1391-9.
- Brustovetsky, N. & Klingenberg, M. (1996). Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca<sup>2+</sup>. *Biochemistry*, **35**, 8483-8.
- Bylund, A., Stattin, P., Widmark, A. & Bergh, A. (1998). Predictive value of bcl-2 immunoreactivity in prostate cancer patients treated with radiotherapy. *Radiother Oncol*, **49**, 143-8.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N. & Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 3666-70.
- Chaudhary, P.M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J. & Hood, L. (1997). Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity*, **7**, 821-30.
- Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T. & Korsmeyer, S.J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, **8**, 705-11.
- Chen-Levy, Z. & Cleary, M.L. (1990). Membrane topology of the Bcl-2 proto-oncogenic protein demonstrated in vitro. *J Biol Chem*, **265**, 4929-33.
- Chen-Levy, Z., Nourse, J. & Cleary, M.L. (1989). The bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(14;18) translocation. *Mol Cell Biol*, **9**, 701-10.
- Chinnaiyan, A.M., Chaudhary, D., O'Rourke, K., Koonin, E.V. & Dixit, V.M. (1997a). Role of CED-4 in the activation of CED-3. *Nature*, **388**, 728-9.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Lane, B.R. & Dixit, V.M. (1997b). Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science*, **275**, 1122-6.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M. & Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, **81**, 505-12.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Yu, G.L., Lyons, R.H., Garg, M., Duan, D.R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J. & Dixit, V.M. (1996). Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science*, **274**, 990-2.
- Chittenden, T., Harrington, E.A., O'Connor, R., Flemington, C., Lutz, R.J., Evan, G.I. & Guild, B.C. (1995). Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature*, **374**, 733-6.

- Choi, S.S., Park, I.C., Yun, J.W., Sung, Y.C., Hong, S.I. & Shin, H.S. (1995). A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene*, **11**, 1693-8.
- Clem, R.J., Cheng, E.H., Karp, C.L., Kirsch, D.G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M.B., Griffin, D.E., Earnshaw, W.C., Veluona, M.A. & Hardwick, J.M. (1998). Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 554-9.
- Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, **326**, 1-16.
- Conradt, B. & Horvitz, H.R. (1998). The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell*, **93**, 519-29.
- Costa, A., Licitra, L., Veneroni, S., Daidone, M.G., Grandi, C., Cavina, R., Molinari, R. & Silvestrini, R. (1998). Biological markers as indicators of pathological response to primary chemotherapy in oral-cavity cancers. *Int J Cancer*, **79**, 619-23.
- Costantini, P., Jacotot, E., Decaudin, D. & Kroemer, G. (2000). Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, **92**, 1042-53.
- Crompton, M., Virji, S. & Ward, J.M. (1998). Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem*, **258**, 729-35.
- Cryns, V. & Yuan, J. (1998). Proteases to die for. *Genes Dev*, **12**, 1551-70.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. & Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, **91**, 231-41.
- de Jong, D., Voetdijk, B.M., Van Ommen, G.J., Kluin-Nelemans, J.C., Beverstock, G.C. & Kluin, P.M. (1989). Translocation t(14;18) in B cell lymphomas as a cause for defective immunoglobulin production. *J Exp Med*, **169**, 613-24.
- Degli-Esposti, M.A., Dougall, W.C., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Smith, C.A. & 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**, 813-20.
- Degli-Esposti, M.A., Smolak, P.J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C.P., DuBose, R.F., Goodwin, R.G. & Smith, C.A. (1997b). Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med*, **186**, 1165-70.
- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R. & Nunez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*, **278**, 687-9.
- Deveraux, Q.L., Leo, E., Stennicke, H.R., Welsh, K., Salvesen, G.S. & Reed, J.C. (1999). Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *Embo J*, **18**, 5242-51.
- Deveraux, Q.L. & Reed, J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 239-52.
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. & Reed, J.C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, **388**, 300-4.
- Dewey, W.C., Ling, C.C. & Meyn, R.E. (1995). Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **33**, 781-96.
- Dimmeler, S., Breitschopf, K., Haendeler, J. & Zeiher, A.M. (1999). Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J Exp Med*, **189**, 1815-22.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, **102**, 33-42.
- Duckett, C.S., Nava, V.E., Gedrich, R.W., Clem, R.J., Van Dongen, J.L., Gilfillan, M.C., Shiels, H., Hardwick, J.M. & Thompson, C.B. (1996). A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *Embo J*, **15**, 2685-94.
- Duplay, P., Alcover, A., Fargeas, C., Sekaly, R.P. & Branton, P.E. (1996). An activated epidermal growth factor receptor/Lck chimera restores early T cell receptor-mediated calcium response in a CD45-deficient T cell line. *J Biol Chem*, **271**, 17896-902.
- Duriez, P.J., Wong, F., Dorovini-Zis, K., Shahidi, R. & Karsan, A. (2000). A1 functions at the mitochondria to delay endothelial apoptosis in response to tumor necrosis factor. *J Biol Chem*, **275**, 18099-107.
- Eberstadt, M., Huang, B., Chen, Z., Meadows, R.P., Ng, S.C., Zheng, L., Lenardo, M.J. & Fesik, S.W. (1998). NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature*, **392**, 941-5.
- Elkhuizen, P.H., van Slooten, H.J., Clahsen, P.C., Hermans, J., van de Velde, C.J., van den Broek, L.C. & van de Vijver, M.J. (2000). High local recurrence risk after breast-conserving therapy in node-negative premenopausal breast cancer patients is greatly reduced by one course of

- perioperative chemotherapy: A European Organization for Research and Treatment of Cancer Breast Cancer Cooperative Group Study. *J Clin Oncol*, **18**, 1075-83.
- Ellis, H.M. & Horvitz, H.R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, **44**, 817-29.
- Engels, I.H., Stepczynska, A., Stroh, C., Lauber, K., Berg, C., Schwenzler, R., Wajant, H., Janicke, R.U., Porter, A.G., Belka, C., Gregor, M., Schulze-Osthoff, K. & Wesselborg, S. (2000). Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene*, **19**, 4563-73.
- Fadok, V.A. & Henson, P.M. (1998). Apoptosis: getting rid of the bodies. *Curr Biol*, **8**, R693-5.
- Farrow, S.N., White, J.H., Martinou, I., Raven, T., Pun, K.T., Grinham, C.J., Martinou, J.C. & Brown, R. (1995). Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature*, **374**, 731-3.
- Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R.C., Krebs, J., Srinivasula, S.M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L.C., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G. & Alnemri, E.S. (1996). In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7464-9.
- Ferrari, D., Stepczynska, A., Los, M., Wesselborg, S. & Schulze-Osthoff, K. (1998). Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis. *J Exp Med*, **188**, 979-84.
- Fiers, W., Beyaert, R., Boone, E., Cornelis, S., Declercq, W., Decoster, E., Denecker, G., Depuydt, B., De Valck, D., De Wilde, G., Goossens, V., Grooten, J., Haegeman, G., Heyninck, K., Penning, L., Plaisance, S., Vancompernelle, K., Van Criekinge, W., Vandenabeele, P., Vanden Berghe, W., Van de Craen, M., Vandevoorde, V. & Vercammen, D. (1995). TNF-induced intracellular signaling leading to gene induction or to cytotoxicity by necrosis or by apoptosis. *J Inflamm*, **47**, 67-75.
- Foyouzi-Youssefi, R., Arnaudeau, S., Borner, C., Kelley, W.L., Tschopp, J., Lew, D.P., Demaurex, N. & Krause, K.H. (2000). Bcl-2 decreases the free Ca<sup>2+</sup> concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5723-8.
- Friesen, C., Herr, I., Krammer, P.H. & Debatin, K.M. (1996). Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med*, **2**, 574-7.
- Froesch, B.A., Aime-Sempe, C., Leber, B., Andrews, D. & Reed, J.C. (1999). Inhibition of p53 transcriptional activity by Bcl-2 requires its membrane-anchoring domain. *J Biol Chem*, **274**, 6469-75.
- Fulda, S., Scaffidi, C., Pietsch, T., Krammer, P.H., Peter, M.E. & Debatin, K.M. (1998). Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells. *Cell Death Differ*, **5**, 884-93.
- Garcia, I., Miyazaki, Y., Araki, K., Araki, M., Lucas, R., Grau, G.E., Milon, G., Belkaid, Y., Montixi, C., Lesslauer, W. & et al. (1995). Transgenic mice expressing high levels of soluble TNF-R1 fusion protein are protected from lethal septic shock and cerebral malaria, and are highly sensitive to *Listeria monocytogenes* and *Leishmania major* infections. *Eur J Immunol*, **25**, 2401-7.
- Gibson, L., Holmgreen, S.P., Huang, D.C., Bernard, O., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sutherland, G.R., Baker, E., Adams, J.M. & Cory, S. (1996). bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene*, **13**, 665-75.
- Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V., Arnold, E., Varfolomeev, E.E., Brodianskii, V.M. & Wallach, D. (1997). CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *J Biol Chem*, **272**, 19641-4.
- Gonzalez-Garcia, M., Perez-Ballester, R., Ding, L., Duan, L., Boise, L.H., Thompson, C.B. & Nunez, G. (1994). bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development*, **120**, 3033-42.
- Goping, I.S., Gross, A., Lavoie, J.N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., Korsmeyer, S.J. & Shore, G.C. (1998). Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol*, **143**, 207-15.
- Gore, S.D., Rowinsky, E.K., Miller, C.B., Griffin, C., Chen, T.L., Borowitz, M., Donehower, R.C., Burks, K.L., Armstrong, D.K., Burke, P.J., Grever, M.R. & Kaufmann, S.H. (1998). A phase II "window" study of topotecan in untreated patients with high risk adult acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*, **4**, 2677-89.
- Green, D.R. (1998). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*, **94**, 695-8.
- Green, D.R. (2000). Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell*, **102**, 1-4.
- Green, M.H., Arlett, C.F., Cole, J., Harcourt, S.A., Priestley, A., Waugh, A.P., Stephens, G., Beare, D.M., Brown, N.A. & Shun-Shin, G.A. (1991). Comparative human cellular radiosensitivity: III. Gamma-radiation survival of cultured skin fibroblasts and resting T-lymphocytes from the peripheral blood of the same individual. *Int J Radiat Biol*, **59**, 749-65.
- Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R. & Ferguson, T.A. (1995). Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*, **270**, 1189-92.

- Gross, A., Jockel, J., Wei, M.C. & Korsmeyer, S.J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo J*, **17**, 3878-85.
- Hacki, J., Egger, L., Monney, L., Conus, S., Rosse, T., Fellay, I. & Borner, C. (2000). Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene*, **19**, 2286-95.
- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G.S., Henderson, J.T., Woo, M., Soengas, M.S., Elia, A., de la Pompa, J.L., Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S.A., Lowe, S.W., Penninger, J.M. & Mak, T.W. (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*, **94**, 339-52.
- Han, D.K., Chaudhary, P.M., Wright, M.E., Friedman, C., Trask, B.J., Riedel, R.T., Baskin, D.G., Schwartz, S.M. & Hood, L. (1997). MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11333-8.
- Han, J., Sabbatini, P. & White, E. (1996). Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K. *Mol Cell Biol*, **16**, 5857-64.
- Hausmann, G., O'Reilly, L.A., van Driel, R., Beaumont, J.G., Strasser, A., Adams, J.M. & Huang, D.C. (2000). Pro-apoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-x(L). *J Cell Biol*, **149**, 623-34.
- He, H., Lam, M., McCormick, T.S. & Distelhorst, C.W. (1997). Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by Bcl-2. *J Cell Biol*, **138**, 1219-28.
- Hegde, R., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E.S. (1998). Bik, a BH3-containing mouse protein that interacts with Bcl-2 and Bcl-xL, is a potent death agonist. *J Biol Chem*, **273**, 7783-6.
- Heiskanen, K.M., Bhat, M.B., Wang, H.W., Ma, J. & Nieminen, A.L. (1999). Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells. *J Biol Chem*, **274**, 5654-8.
- Hengartner, M.O., Ellis, R.E. & Horvitz, H.R. (1992). *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature*, **356**, 494-9.
- Hengartner, M.O. & Horvitz, H.R. (1994). *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell*, **76**, 665-76.
- Herr, I., Wilhelm, D., Bohler, T., Angel, P. & Debatin, K.M. (1997). Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. *Embo J*, **16**, 6200-8.
- Hirata, H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, K. & Sasaki, M. (1998). Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med*, **187**, 587-600.
- Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G. & Goeddel, D.V. (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*, **84**, 299-308.
- Hsu, S.Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M. & Hsueh, A.J. (1997). Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12401-6.
- Hsu, S.Y., Lin, P. & Hsueh, A.J. (1998). BOD (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members. *Mol Endocrinol*, **12**, 1432-40.
- Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R. & Dixit, V.M. (1997). I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **272**, 17255-7.
- Huang, D.C., Adams, J.M. & Cory, S. (1998). The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *Embo J*, **17**, 1029-39.
- Huang, D.C., Hahne, M., Schroeter, M., Frei, K., Fontana, A., Villunger, A., Newton, K., Tschopp, J. & Strasser, A. (1999). Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-x(L). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14871-6.
- Huang, D.C., O'Reilly, L.A., Strasser, A. & Cory, S. (1997). The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *Embo J*, **16**, 4628-38.
- Huang, D.C. & Strasser, A. (2000). BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*, **103**, 839-42.
- Huang, D.C., Tschopp, J. & Strasser, A. (2000). Bcl-2 does not inhibit cell death induced by the physiological Fas ligand: implications for the existence of type I and type II cells. *Cell Death Differ*, **7**, 754-5.
- Inohara, N., Ding, L., Chen, S. & Nunez, G. (1997a). harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *Embo J*, **16**, 1686-94.

- Inohara, N., Gourley, T.S., Carrio, R., Muniz, M., Merino, J., Garcia, I., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S. & Nunez, G. (1998). Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death. *J Biol Chem*, **273**, 32479-86.
- Inohara, N., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S. & Nunez, G. (1997b). CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10717-22.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E. & Tschopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, **388**, 190-5.
- Ito, T., Deng, X., Carr, B. & May, W.S. (1997). Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J Biol Chem*, **272**, 11671-3.
- Itoh, N. & Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem*, **268**, 10932-7.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. & Nagata, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, **66**, 233-43.
- Jager, J.J., Jansen, R.L., Arends, J.W., Joosten-Achjanie, S., Volovics, L., Schouten, L.J., De Jong, J.M., Meyenfeldt, M.F. & Blijham, G.H. (2000). Anti-apoptotic phenotype is associated with decreased locoregional recurrence rate in breast cancer. *Anticancer Res*, **20**, 1269-75.
- Jager, R., Herzer, U., Schenkel, J. & Weiher, H. (1997). Overexpression of Bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-myc-induced tumorigenesis of the mammary gland in transgenic mice. *Oncogene*, **15**, 1787-95.
- Jayaraman, T. & Marks, A.R. (1997). T cells deficient in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are resistant to apoptosis. *Mol Cell Biol*, **17**, 3005-12.
- Joensuu, H., Pykkanen, L. & Toikkanen, S. (1994). Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. *Am J Pathol*, **145**, 1191-8.
- Jung, D.W., Bradshaw, P.C. & Pfeiffer, D.R. (1997). Properties of a cyclosporin-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria. *J Biol Chem*, **272**, 21104-12.
- Juo, P., Kuo, C.J., Yuan, J. & Blenis, J. (1998). Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol*, **8**, 1001-8.
- Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. & Reed, J.C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 4997-5002.
- Kelekar, A., Chang, B.S., Harlan, J.E., Fesik, S.W. & Thompson, C.B. (1997). Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL. *Mol Cell Biol*, **17**, 7040-6.
- Kerr, J.F. (1971). Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol*, **105**, 13-20.
- Kerr, J.F. (1972). Shrinkage necrosis of adrenal cortical cells. *J Pathol*, **107**, 217-9.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239-57.
- Kiefer, M.C., Brauer, M.J., Powers, V.C., Wu, J.J., Umansky, S.R., Tomei, L.D. & Barr, P.J. (1995). Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature*, **374**, 736-9.
- Kirsch, D.G., Doseff, A., Chau, B.N., Lim, D.S., de Souza-Pinto, N.C., Hansford, R., Kastan, M.B., Lazebnik, Y.A. & Hardwick, J.M. (1999). Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J Biol Chem*, **274**, 21155-61.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. & Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J*, **14**, 5579-88.
- Kitada, S., Krajewski, S., Miyashita, T., Krajewska, M. & Reed, J.C. (1996). Gamma-radiation induces upregulation of Bax protein and apoptosis in radiosensitive cells in vivo. *Oncogene*, **12**, 187-92.
- Kitson, J., Raven, T., Jiang, Y.P., Goeddel, D.V., Giles, K.M., Pun, K.T., Grinham, C.J., Brown, R. & Farrow, S.N. (1996). A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature*, **384**, 372-5.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzler, E., Green, D.R. & Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, **275**, 1132-6.
- Kluck, R.M., Esposti, M.D., Perkins, G., Renken, C., Kuwana, T., Bossy-Wetzler, E., Goldberg, M., Allen, T., Barber, M.J., Green, D.R. & Newmeyer, D.D. (1999). The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. *J Cell Biol*, **147**, 809-22.
- Kondo, T., Suda, T., Fukuyama, H., Adachi, M. & Nagata, S. (1997). Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nat Med*, **3**, 409-13.

- Kopp, R., Kramling, H.J., Cramer, C., Diebold, J., Baretton, G. & Schildberg, F.W. (1998). [Prognostic significance of apoptosis inducers/inhibitors in stomach carcinoma with/without adjuvant intra-operative radiotherapy (IORT)]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd*, **115**, 1360-2.
- Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P. & Craig, R.W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 3516-20.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W. & Reed, J.C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res*, **53**, 4701-14.
- Kuo, T.H., Kim, H.R., Zhu, L., Yu, Y., Lin, H.M. & Tsang, W. (1998). Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump by Bcl-2. *Oncogene*, **17**, 1903-10.
- Kyprianou, N., King, E.D., Bradbury, D. & Rhee, J.G. (1997). bcl-2 over-expression delays radiation-induced apoptosis without affecting the clonogenic survival of human prostate cancer cells. *Int J Cancer*, **70**, 341-8.
- Lamboley, C., Bringuier, A.F. & Feldmann, G. (2000). Apoptotic behaviour of hepatic and extra-hepatic tumor cell lines differs after Fas stimulation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **46**, 13-28.
- Lawrence, D., Shahrokh, Z., Marsters, S., Achilles, K., Shih, D., Mounho, B., Hillan, K., Totpal, K., DeForge, L., Schow, P., Hooley, J., Sherwood, S., Pai, R., Leung, S., Khan, L., Gliniak, B., Bussiere, J., Smith, C.A., Strom, S.S., Kelley, S., Fox, J.A., Thomas, D. & Ashkenazi, A. (2001). Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med*, **7**, 383-5.
- Lee, M.S., Blick, M.B., Pathak, S., Trujillo, J.M., Butler, J.J., Katz, R.L., McLaughlin, P., Hagemester, F.B., Velasquez, W.S., Goodacre, A. & et al. (1987). The gene located at chromosome 18 band q21 is rearranged in uncultured diffuse lymphomas as well as follicular lymphomas. *Blood*, **70**, 90-5.
- Li, F., Ambrosini, G., Chu, E.Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P.C. & Altieri, D.C. (1998a). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, **396**, 580-4.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. & Yuan, J. (1998b). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, **94**, 491-501.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479-89.
- Li, P.F., Dietz, R. & von Harsdorf, R. (1999). p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *Embo J*, **18**, 6027-36.
- Liepinsh, E., Ilag, L.L., Otting, G. & Ibanez, C.F. (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *Embo J*, **16**, 4999-5005.
- Lin, E.Y., Orlofsky, A., Wang, H.G., Reed, J.C. & Prystowsky, M.B. (1996). A1, a Bcl-2 family member, prolongs cell survival and permits myeloid differentiation. *Blood*, **87**, 983-92.
- Lorenzo, H.K., Susin, S.A., Penninger, J. & Kroemer, G. (1999). Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ*, **6**, 516-24.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **94**, 481-90.
- MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S.M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G.M. & Alnemri, E.S. (1997). Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem*, **272**, 25417-20.
- Margolin, N., Raybuck, S.A., Wilson, K.P., Chen, W., Fox, T., Gu, Y. & Livingston, D.J. (1997). Substrate and inhibitor specificity of interleukin-1 beta-converting enzyme and related caspases. *J Biol Chem*, **272**, 7223-8.
- Marino, M.W., Dunn, A., Grail, D., Inglese, M., Noguchi, Y., Richards, E., Jungbluth, A., Wada, H., Moore, M., Williamson, B., Basu, S. & Old, L.J. (1997). Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8093-8.
- Marsters, S.A., Sheridan, J.P., Donahue, C.J., Pitti, R.M., Gray, C.L., Goddard, A.D., Bauer, K.D. & Ashkenazi, A. (1996). Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa B. *Curr Biol*, **6**, 1669-76.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L., Prevost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C. & Kroemer, G. (1998a). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*, **281**, 2027-31.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S.A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z.H., Reed, J.C. & Kroemer, G. (1998b). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med*, **187**, 1261-71.

- Marzo, I., Susin, S.A., Petit, P.X., Ravagnan, L., Brenner, C., Larochette, N., Zamzami, N. & Kroemer, G. (1998c). Caspases disrupt mitochondrial membrane barrier function. *FEBS Lett*, **427**, 198-202.
- Mazel, S., Burtrum, D. & Petrie, H.T. (1996). Regulation of cell division cycle progression by bcl-2 expression: a potential mechanism for inhibition of programmed cell death. *J Exp Med*, **183**, 2219-26.
- McDonnell, T.J., Nunez, G., Platt, F.M., Hockenberry, D., London, L., McKearn, J.P. & Korsmeyer, S.J. (1990). Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B-cell population. *Mol Cell Biol*, **10**, 1901-7.
- McGeehan, G.M., Becherer, J.D., Bast, R.C., Jr., Boyer, C.M., Champion, B., Connolly, K.M., Conway, J.G., Furdon, P., Karp, S., Kidao, S. & et al. (1994). Regulation of tumour necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature*, **370**, 558-61.
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H. & Peter, M.E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J*, **16**, 2794-804.
- Metivier, D., Dallaporta, B., Zamzami, N., Larochette, N., Susin, S.A., Marzo, I. & Kroemer, G. (1998). Cytofluorometric detection of mitochondrial alterations in early CD95/Fas/APO-1-triggered apoptosis of Jurkat T lymphoma cells. Comparison of seven mitochondrion-specific fluorochromes. *Immunol Lett*, **61**, 157-63.
- Minn, A.J., Kettlun, C.S., Liang, H., Kelekar, A., Vander Heiden, M.G., Chang, B.S., Fesik, S.W., Fill, M. & Thompson, C.B. (1999). Bcl-xL regulates apoptosis by heterodimerization-dependent and -independent mechanisms. *Embo J*, **18**, 632-43.
- Minn, A.J., Velez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M. & Thompson, C.B. (1997). Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, **385**, 353-7.
- Mirkovic, N., Voehringer, D.W., Story, M.D., McConkey, D.J., McDonnell, T.J. & Meyn, R.E. (1997). Resistance to radiation-induced apoptosis in Bcl-2-expressing cells is reversed by depleting cellular thiols. *Oncogene*, **15**, 1461-70.
- Mittl, P.R., Di Marco, S., Krebs, J.F., Bai, X., Karanewsky, D.S., Priestle, J.P., Tomaselli, K.J. & Grutter, M.G. (1997). Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone. *J Biol Chem*, **272**, 6539-47.
- Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwig, E.A. & Yuan, J. (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell*, **75**, 653-60.
- Miyashita, T. & Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. *Cell*, **80**, 293-9.
- Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R. & Tsien, R.Y. (1999). Dynamic and quantitative Ca<sup>2+</sup> measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2135-40.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M. & Tsien, R.Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, **388**, 882-7.
- Mohler, K.M., Sleath, P.R., Fitzner, J.N., Cerretti, D.P., Alderson, M., Kerwar, S.S., Torrance, D.S., Otten-Evans, C., Greenstreet, T., Weerawarna, K. & et al. (1994). Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing. *Nature*, **370**, 218-20.
- Mongkolsapaya, J., Cowper, A.E., Xu, X.N., Morris, G., McMichael, A.J., Bell, J.I. & 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.
- Moriishi, K., Huang, D.C., Cory, S. & Adams, J.M. (1999). Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9683-8.
- Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettlesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., Ng, S.L. & Fesik, S.W. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*, **381**, 335-41.
- Murphy, K.M., Streips, U.N. & Lock, R.B. (1999). Bax membrane insertion during Fas(CD95)-induced apoptosis precedes cytochrome c release and is inhibited by Bcl-2. *Oncogene*, **18**, 5991-9.
- Murphy, R.C., Schneider, E. & Kinnally, K.W. (2001). Overexpression of Bcl-2 suppresses the calcium activation of a mitochondrial megachannel. *FEBS Lett*, **497**, 73-6.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. & Dixit, V.M. (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**, 817-27.
- Muzio, M., Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. (1997). FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J Biol Chem*, **272**, 2952-6.

- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem*, **273**, 2926-30.
- Nagata, S. (1998). Human autoimmune lymphoproliferative syndrome, a defect in the apoptosis-inducing Fas receptor: a lesson from the mouse model. *J Hum Genet*, **43**, 2-8.
- Nagata, S. (2000). Steering anti-cancer drugs away from the TRAIL. *Nat Med*, **6**, 502-3.
- Nagata, S. & Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science*, **267**, 1449-56.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A. & Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, **403**, 98-103.
- Nakano, K. & Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, **7**, 683-94.
- Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., Matsuda, H. & Tsujimoto, Y. (1998). Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14681-6.
- Newcomb, E.W., Cohen, H., Lee, S.R., Bhalla, S.K., Bloom, J., Hayes, R.L. & Miller, D.C. (1998). Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes [see comment]. *Brain Pathol*, **8**, 655-67.
- Nguyen, M., Branton, P.E., Walton, P.A., Oltvai, Z.N., Korsmeyer, S.J. & Shore, G.C. (1994). Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus. *J Biol Chem*, **269**, 16521-4.
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A. & et al. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, **376**, 37-43.
- Nicholson, D.W. & Thornberry, N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*, **22**, 299-306.
- Novgorodov, S.A., Gudiz, T.I., Jung, D.W. & Brierley, G.P. (1991). The nonspecific inner membrane pore of liver mitochondria: modulation of cyclosporin sensitivity by ADP at carboxyatractyloside-sensitive and insensitive sites. *Biochem Biophys Res Commun*, **180**, 33-8.
- O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L.A., Hausmann, G., Adams, J.M., Cory, S. & Huang, D.C. (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *Embo J*, **17**, 384-95.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. & Tanaka, N. (2000a). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, **288**, 1053-8.
- Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y. & Taya, Y. (2000b). p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*, **102**, 849-62.
- Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B.C. & et al. (1992). Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem*, **267**, 10709-15.
- Oltvai, Z.N., Millman, C.L. & Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, **74**, 609-19.
- Pan, G., Bauer, J.H., Haridas, V., Wang, S., Liu, D., Yu, G., Vincenz, C., Aggarwal, B.B., Ni, J. & Dixit, V.M. (1998a). Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett*, **431**, 351-6.
- Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A.M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J. & Dixit, V.M. (1997). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*, **276**, 111-3.
- Pan, G., O'Rourke, K. & Dixit, V.M. (1998b). Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem*, **273**, 5841-5.
- Pan, Z., Bhat, M.B., Nieminen, A.L. & Ma, J. (2001). Synergistic movements of Ca(2+) and Bax in cells undergoing apoptosis. *J Biol Chem*, **276**, 32257-63.
- Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V. & Kollias, G. (1996). Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med*, **184**, 1397-411.
- Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Grell, M., Pfizenmaier, K., Bluethmann, H. & Kollias, G. (1997). Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kDa receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6319-23.
- Pastorino, J.G., Simbula, G., Yamamoto, K., Glascott, P.A., Jr., Rothman, R.J. & Farber, J.L. (1996). The cytotoxicity of tumor necrosis factor depends on induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem*, **271**, 29792-8.

- Peter, M.E., Kischkel, F.C., Scheuerpflug, C.G., Medema, J.P., Debatin, K.M. & Krammer, P.H. (1997). Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signaling complex. *Eur J Immunol*, **27**, 1207-12.
- Petronilli, V., Nicolli, A., Costantini, P., Colonna, R. & Bernardi, P. (1994). Regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A. *Biochim Biophys Acta*, **1187**, 255-9.
- Petros, A.M., Medek, A., Nettesheim, D.G., Kim, D.H., Yoon, H.S., Swift, K., Matayoshi, E.D., Oltersdorf, T. & Fesik, S.W. (2001). Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3012-7.
- Pillai, M.R., Jayaprakash, P.G. & Nair, M.K. (1999). bcl-2 immunoreactivity but not p53 accumulation associated with tumour response to radiotherapy in cervical carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, **125**, 55-60.
- Pinton, P., Ferrari, D., Magalhaes, P., Schulze-Osthoff, K., Di Virgilio, F., Pozzan, T. & Rizzuto, R. (2000). Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J Cell Biol*, **148**, 857-62.
- Pozzan, T. & Rizzuto, R. (2000). High tide of calcium in mitochondria. *Nat Cell Biol*, **2**, E25-7.
- Rajkumar, T., Rajan, S., Baruah, R.K., Majhi, U., Selvaluxmi, G. & Vasanthan, A. (1998). Prognostic significance of Bcl-2 and p53 protein expression in stage IIB and IIIB squamous cell carcinoma of the cervix. *Eur J Gynaecol Oncol*, **19**, 556-60.
- Rehemtulla, A., Hamilton, A.C., Taneja, N., Fridman, J., Juan, T.S., Maybaum, J. & Chinnaiyan, A. (1999). A caspase-resistant form of Bcl-X(L), but not wild type Bcl-X(L), promotes clonogenic survival after ionizing radiation. *Neoplasia*, **1**, 63-70.
- Rehemtulla, A., Hamilton, C.A., Chinnaiyan, A.M. & Dixit, V.M. (1997). Ultraviolet radiation-induced apoptosis is mediated by activation of CD-95 (Fas/APO-1). *J Biol Chem*, **272**, 25783-6.
- Rotonda, J., Nicholson, D.W., Fazil, K.M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Ruel, R., Vaillancourt, J.P., Thornberry, N.A. & Becker, J.W. (1996). The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol*, **3**, 619-25.
- Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. & Reed, J.C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J*, **16**, 6914-25.
- Roy, N., Mahadevan, M.S., McLean, M., Shutler, G., Yaraghi, Z., Farahani, R., Baird, S., Besner-Johnston, A., Lefebvre, C., Kang, X. & et al. (1995). The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell*, **80**, 167-78.
- Ruck, A., Dolder, M., Wallimann, T. & Brdiczka, D. (1998). Reconstituted adenine nucleotide translocase forms a channel for small molecules comparable to the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett*, **426**, 97-101.
- Ruiz-Vela, A., Albar, J.P. & Martinez, C.A. (2001). Apaf-1 localization is modulated indirectly by Bcl-2 expression. *FEBS Lett*, **501**, 79-83.
- Ruvolo, P.P., Deng, X., Carr, B.K. & May, W.S. (1998). A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol Chem*, **273**, 25436-42.
- Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, **391**, 96-9.
- Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., Thompson, C.B. & Fesik, S.W. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, **275**, 983-6.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. & Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J*, **17**, 1675-87.
- Schendel, S.L., Xie, Z., Montal, M.O., Matsuyama, S., Montal, M. & Reed, J.C. (1997). Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5113-8.
- Schneider, P., Thome, M., Burns, K., Bodmer, J.L., Hofmann, K., Kataoka, T., Holler, N. & Tschopp, J. (1997). TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity*, **7**, 831-6.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. & Peter, M.E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*, **254**, 439-59.
- Screaton, G.R., Xu, X.N., Olsen, A.L., Cowper, A.E., Tan, R., McMichael, A.J. & Bell, J.I. (1997). LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4615-9.
- Seiter, K., Feldman, E.J., Dorota Halicka, H., Deptala, A., Traganos, F., Burke, H.B., Hoang, A., Goff, H., Pozzuoli, M., Kancherla, R., Darzynkiewicz, Z. & Ahmed, T. (2000). Clinical and laboratory

- evaluation of all-trans retinoic acid modulation of chemotherapy in patients with acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*, **108**, 40-7.
- Shimizu, S., Ide, T., Yanagida, T. & Tsujimoto, Y. (2000a). Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J Biol Chem*, **275**, 12321-5.
- Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T. & Tsujimoto, Y. (2000b). BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3100-5.
- Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, **399**, 483-7.
- Shimizu, S. & Tsujimoto, Y. (2000). Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 577-82.
- Shu, H.B., Halpin, D.R. & Goeddel, D.V. (1997). Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity*, **6**, 751-63.
- Silvestrini, R., Benini, E., Veneroni, S., Daidone, M.G., Tomasic, G., Squicciarini, P. & Salvadori, B. (1996). p53 and bcl-2 expression correlates with clinical outcome in a series of node-positive breast cancer patients. *J Clin Oncol*, **14**, 1604-10.
- Slee, E.A., Adrain, C. & Martin, S.J. (1999a). Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ*, **6**, 1067-74.
- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R. & Martin, S.J. (1999b). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*, **144**, 281-92.
- Smith, C.A., Farrah, T. & Goodwin, R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*, **76**, 959-62.
- Song, Q., Kuang, Y., Dixit, V.M. & Vincenz, C. (1999). Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *Embo J*, **18**, 167-78.
- Spector, M.S., Desnoyers, S., Hoepfner, D.J. & Hengartner, M.O. (1997). Interaction between the *C. elegans* cell-death regulators CED-9 and CED-4. *Nature*, **385**, 653-6.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G. & Alnemri, E.S. (1996). Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14486-91.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Otilie, S., Bullrich, F., Banks, S., Wang, Y., Fernandes-Alnemri, T., Croce, C.M., Litwack, G., Tomaselli, K.J., Armstrong, R.C. & Alnemri, E.S. (1997). FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **272**, 18542-5.
- Stemans, M., Goossens, V., Van de Craen, M., Van Herreweghe, F., Vancompernelle, K., De Vos, K., Vandenabeele, P. & Grooten, J. (1998). A caspase-activated factor (CAF) induces mitochondrial membrane depolarization and cytochrome c release by a nonproteolytic mechanism. *J Exp Med*, **188**, 2193-8.
- Strasser, A., Harris, A.W., Bath, M.L. & Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature*, **348**, 331-3.
- Strasser, A., Harris, A.W., Jacks, T. & Cory, S. (1994). DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell*, **79**, 329-39.
- Strasser, A., O'Connor, L. & Dixit, V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*, **69**, 217-45.
- Straus, D.B. & Weiss, A. (1992). Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell*, **70**, 585-93.
- Stroh, C. & Schulze-Osthoff, K. (1998). Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ*, **5**, 997-1000.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. & Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**, 441-6.
- Suzuki, M., Youle, R.J. & Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*, **103**, 645-54.
- Takahashi, K., Inanami, O. & Kuwabara, M. (1999). Effects of intracellular calcium chelator BAPTA-AM on radiation-induced apoptosis regulated by activation of SAPK/JNK and caspase-3 in MOLT-4 cells. *Int J Radiat Biol*, **75**, 1099-105.

- Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C.I., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Suda, T. & Nagata, S. (1994). Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell*, **76**, 969-76.
- Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H. & Goeddel, D.V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, **74**, 845-53.
- Tartaglia, L.A. & Goeddel, D.V. (1992). Two TNF receptors. *Immunol Today*, **13**, 151-3.
- Teague, T.K., Marrack, P., Kappler, J.W. & Vella, A.T. (1997). IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis. *J Immunol*, **158**, 5791-6.
- Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. (1995). Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell*, **81**, 801-9.
- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinel, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J.L., Schroter, M., Scaffidi, C., Krammer, P.H., Peter, M.E. & Tschopp, J. (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*, **386**, 517-21.
- Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science*, **281**, 1312-6.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. & Croce, C.M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, **228**, 1440-3.
- Uren, A.G., Pakusch, M., Hawkins, C.J., Puls, K.L. & Vaux, D.L. (1996). Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 4974-8.
- Vairo, G., Innes, K.M. & Adams, J.M. (1996). Bcl-2 has a cell cycle inhibitory function separable from its enhancement of cell survival. *Oncogene*, **13**, 1511-9.
- Vairo, G., Soos, T.J., Upton, T.M., Zalvide, J., DeCaprio, J.A., Ewen, M.E., Koff, A. & Adams, J.M. (2000). Bcl-2 retards cell cycle entry through p27(Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Mol Cell Biol*, **20**, 4745-53.
- Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T. & Thompson, C.B. (1997). Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*, **91**, 627-37.
- Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J.S., Mett, I.L., Rebrikov, D., Brodianski, V.M., Kemper, O.C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K.B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P. & Wallach, D. (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*, **9**, 267-76.
- Vaux, D.L., Cory, S. & Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, **335**, 440-2.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J. & Vaux, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, **102**, 43-53.
- Vincenz, C. & Dixit, V.M. (1997). Fas-associated death domain protein interleukin-1beta-converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling. *J Biol Chem*, **272**, 6578-83.
- Voehringer, D.W., Story, M.D., O'Neil, R.G. & Meyn, R.E. (1997). Modulating Ca<sup>2+</sup> in radiation-induced apoptosis suppresses DNA fragmentation but does not enhance clonogenic survival. *Int J Radiat Biol*, **71**, 237-43.
- von Freeden-Jeffry, U., Solvason, N., Howard, M. & Murray, R. (1997). The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity*, **7**, 147-54.
- 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., Goodwin, R.G. & Rauch, C.T. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *Embo J*, **16**, 5386-97.
- Wallach, D., Kovalenko, A.V., Varfolomeev, E.E. & Boldin, M.P. (1998). Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict. *Curr Opin Immunol*, **10**, 279-88.
- Wang, K., Yin, X.M., Chao, D.T., Milliman, C.L. & Korsmeyer, S.J. (1996). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev*, **10**, 2859-69.
- Wang, Z.Q., Stingl, L., Morrison, C., Jantsch, M., Los, M., Schulze-Osthoff, K. & Wagner, E.F. (1997). PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev*, **11**, 2347-58.

- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. & Nagata, S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, **356**, 314-7.
- Watt, W., Koeplinger, K.A., Mildner, A.M., Henrikson, R.L., Tomasselli, A.G. & Watenpaugh, K.D. (1999). The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure Fold Des*, **7**, 1135-43.
- Wesselborg, S., Engels, I.H., Rossmann, E., Los, M. & Schulze-Osthoff, K. (1999). Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction. *Blood*, **93**, 3053-63.
- Wilson, K.P., Black, J.A., Thomson, J.A., Kim, E.E., Griffith, J.P., Navia, M.A., Murcko, M.A., Chambers, S.P., Aldape, R.A., Raybuck, S.A. & et al. (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*, **370**, 270-5.
- Wu, D., Wallen, H.D., Inohara, N. & Nunez, G. (1997a). Interaction and regulation of the *Caenorhabditis elegans* death protease CED-3 by CED-4 and CED-9. *J Biol Chem*, **272**, 21449-54.
- Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald, E.R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R., Hamilton, S.R., Spinner, N.B., Markowitz, S., Wu, G. & el-Deiry, W.S. (1997b). KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet*, **17**, 141-3.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. & Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, **68**, 251-306.
- Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L. & Dunlop, D. (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol*, **142**, 67-77.
- Xie, Z., Schendel, S., Matsuyama, S. & Reed, J.C. (1998). Acidic pH promotes dimerization of Bcl-2 family proteins. *Biochemistry*, **37**, 6410-8.
- Xu, W., Longo, F.J., Wintermantel, M.R., Jiang, X., Clark, R.A. & DeLisle, S. (2000). Calreticulin modulates capacitative Ca<sup>2+</sup> influx by controlling the extent of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> store depletion. *J Biol Chem*, **275**, 36676-82.
- Xue, D. & Horvitz, H.R. (1997). *Caenorhabditis elegans* CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor. *Nature*, **390**, 305-8.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B. & Korsmeyer, S.J. (1995a). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, **80**, 285-91.
- Yang, T., Kozopas, K.M. & Craig, R.W. (1995b). The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J Cell Biol*, **128**, 1173-84.
- Yang, Y.L. & Li, X.M. (2000). The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res*, **10**, 169-77.
- Yin, X.M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A. & Korsmeyer, S.J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*, **400**, 886-91.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell*, **7**, 673-82.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. & Horvitz, H.R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, **75**, 641-52.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. & 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**, 619-28.
- Zhou, P., Chou, J., Olea, R.S., Yuan, J. & Wagner, G. (1999). Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase-9 CARD: a structural basis for specific adaptor/caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11265-70.
- Zhu, W., Cowie, A., Wasfy, G.W., Penn, L.Z., Leber, B. & Andrews, D.W. (1996). Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *Embo J*, **15**, 4130-41.
- Zong, W.X., Lindsten, T., Ross, A.J., MacGregor, G.R. & Thompson, C.B. (2001). BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev*, **15**, 1481-6.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. & Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, **90**, 405-13.

**Akademische Lehrer in alphabetischer Reihenfolge:**

Prof. Dr. B.J. Benecke

Prof. Dr. W. Budach

Prof. Dr. F.W. Falkenberg

Prof. Dr. H.J. Freund

Prof. Dr. mult. Dr. h.c. A. Haas

Prof. Dr. D. Hasselmann

Prof. Dr. Dr. Dr. med. habil. H. Hatt

Prof. Dr. R. Heumann

Prof. Dr. B. Hovemann

Prof. Dr. H.-J. Machulla

Prof. Dr. W. Sander

Prof. Dr. G.M. Schneider

Prof. Dr. W.S. Sheldrick

Prof. Dr. F. Stuhl

Prof. Dr. E. Träbert

Prof. Dr. E.W. Weiler

Prof. Dr. A. Wittinghofer

## Lebenslauf

Justine Rudner

geboren am 26.11.1972 in Gleiwitz/Polen

- |                 |   |
|-----------------|---|
| 1979            | Einschulung und Besuch der 1. Klasse in Groß-Strehlitz/Polen  |
| 1980            | Umsiedlung nach Deutschland   |
| 1980-1983       | Besuch der Grundschule in Düsseldorf  |
| 1983-1992       | Besuch des Städtischen Gymnasiums Gerresheim in Düsseldorf  |
| 06/1992         | Abschluß: allgemeine Hochschulreife   |
| 10/1992-09/1993 | Absolvierung des „Freiwilligen Sozialen Jahres“ im Malteserkrankenhaus in Bonn  |
| 1993-1998       | Studium der Biochemie an der Ruhruniversität in Bochum  |
| 10/1995         | Vordiplom   |
| 10/1997-09/1998 | Diplomarbeit am Lehrstuhl für Neurobiochemie bei Prof. Dr. R. Heumann<br>Thema: Charakterisierung der GFR $\alpha$ -1-Promotorregion sowie Klonierung und Expression von GFR $\alpha$ -3  |
| 09/1998         | Abschluß des Diplomstudiengangs Biochemie   |
| seit 10/1998    | Naturwissenschaftliche Dissertation in der Abteilung für Radioonkologie am Universitätsklinikum der Eberhard-Karls-Universität Tübingen bei Prof. Dr. M. Bamberg<br>Betreuer: Prof. Dr. W. Budach<br>Thema: Strahleninduzierte Apoptose: Mechanismen und Bedeutung für den klonogenen Zelltod |