

Funktionelle Studien zur Hemmung der Apoptose in mitotischen Zellen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von

Yves Matthess
aus Wittenberg

Frankfurt am Main 2010
(D30)

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

Dekanin: Frau Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

Gutachter: Herr Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn und Herr Prof. Dr. K. Strebhardt

Datum der Disputation:

Zusammenfassung.....	5
1.EINLEITUNG.....	6
1.1.Apoptose.....	6
1.2.Signalwege der Apoptose.....	6
1.3.Intrinsische Apoptose.....	6
1.4.Extrinsische Apoptose.....	6
1.5.Struktur und Funktion von Procaspase"8.....	7
1.6.Nicht'apoptotische Funktionen von Procaspase"8.....	7
1.7.Negative Regulation der Apoptose	8
1.8.Plk1, eine bedeutende Zellzyklus-Kinase.....	8
1.9.Cdk1 Cyclin B1, Initiator der Mitose.....	9
Aufgabenstellung.....	10
2.MATERIAL UND METHODEN.....	11
2.1.Chemikalien.....	11
2.2.Antikörper.....	11
2.3.Lösungen und Puffer.....	11
2.4.Kultivierung eukaryontischer Zellen.....	17
2.5.Transfektion eukaryontischer Zellen.....	17
2.6.Synchronisation von Zellen.....	17
2.7.Analyse der Zellzyklusphasen mittels Propidiumiodid.....	17
3.1.Generierung stabiler Zelllinien.....	18
3.2. SDS Gelelektrophorese	18
3.3. Coimmunpräzipitation.....	18

3.4. Kinase Assay.....	18
3.5. Phosphoaminosäureanalyse.....	18
3.6. Präparation von Plasmid-DNA für den Restriktionsverdau.....	18
3.7.Präparation von Plasmid DNA.....	18
3.8.Isolierung von Nukleinsäuren durch modifizierte Phenol Chloroform Extraktion.....	19
3.9.Isolierung humaner chromosomaler DNA.....	19
3.10.Polymerase"Kettenreaktion.....	19
3.11.Standard Klonierungsprozedur.....	19
3.12.RNA Isolation.....	19
3.13.Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....	19
3.14.Transformation von Bakterienzellen.....	19
3.15.Präparation von GST Fusionsproteinen.....	20
3.16.GST Pull Down.....	20
3.17.Bioinformatische Methoden.....	20
3.18.Sonstige Software.....	21
4.Ergebnisse.....	22
4.1.Die potentielle Cdk1/Cyclin B1-Phosphorylierungsstelle in Procaspase-8.....	22
4.2.Die Fas/CD95-Rezeptor vermittelte Apoptose wird in der Mitose blockiert.	22
4.3.Cdk1/Cyclin B1 phosphoryliert Procaspase-8 an Ser 387 in vitro...23	
4.4.Cdk1/Cyclin B1 bindet an die DE Domäne von Procaspase-8 in vitro und in vivo.....	24
4.5.Der Phospho-Antikörper pAB-Casp8/S387 erkennt spezifisch phosphorylierte Procaspase-8.....	24
4.6.Procaspase-8 wird während der Mitose in vivo phosphoryliert.....	25

4.7.Knockdown von Cyclin B1 verringert die Phosphorylierung an Ser 387 und verstärkt extrinsische Apoptose nach Fas Stimulation	26
4.8.Cdk1/Cyclin B1 reguliert die Aktivierung/Prozessierung von Procaspase 8 während der Mitose.....	26
5.Diskussion.....	29
5.1.Mitotische Krebszellen schützen sich gegen Apoptose.....	29
5.2.Direkte Bindung und Phosphorylierung von Procaspase"8 durch mitotische Kinasen.....	29
5.3.Die Phosphorylierung von Procaspase"8 als neuartiger Schutzmechanismus zu Beginn der Mitose.....	29
5.4.Durch die Hemmung der Aktivierung der Procaspase 8 schützt sich die Krebszelle vor extrinsischer Apoptose.....	30

ZUSAMMENFASSUNG

Die Zelle repliziert ihre DNA während der S-Phase und segregiert sie dann später in der M Phase des Zellzykluses. Kommt es während dieser Prozesse zu DNA Schädigungen, arretiert die Zelle den Zellzyklus mit Hilfe spezifischer Kontrollmechanismen und versucht den Schaden zu beheben. Der DNA Kontrollpunkt wird bei DNA Schädigungen aktiviert, um mit Hilfe der DNA Reparatur den Schaden zu beheben und somit dafür zu sorgen, dass die DNA fehlerfrei repliziert werden kann. Der zweite Zellzyklus Kontrollpunkt, der Spindel Kontrollpunkt, stellt sicher, dass die Chromosomen während der M Phase unter gleicher Spannung innerhalb der Äquatorialplatte der Metaphase Spindel angeordnet sind. Kann in der Zeit, in der der Zellzyklus Kontrollpunkt aktiv ist, der Schaden nicht behoben werden, so wird Apoptose ausgelöst und die Zelle wird aus dem Zellverband entfernt. Krebszellen haben Strategien entwickelt, Zellzyklus Kontrollpunkte zu umgehen und darüber hinaus normalen Mechanismen der Apoptose zu entkommen. Die genauen molekularen Vorgänge der Deregulierung der Apoptose sind weitestgehend unaufgeklärt. Procaspase 8 ist ein wichtiges Schlüsselenzym des extrinsischen Apoptose Signalweges. Der extrinsische Signalweg wird extrazellulär über die Bindung von Liganden an ihre korrespondierenden Rezeptoren ausgelöst. In dieser Studie wird gezeigt, dass Procaspase 8 an Ser-387 in vitro als auch in vivo von Cdk1/Cyclin B1 phosphoryliert wird. Darüber hinaus zeigt diese Phosphorylierungsstelle die typische Struktur einer Bindungsstelle für Plk1, einer weiteren mitotischen Kinase. Die Interaktion von Procaspase 8 mit Cdk1/Cyclin B1 wird über die DE Domäne („death-effector-domain“ DED) von Procaspase 8 vermittelt. Wird Procaspase 8 an Ser 387 zu Alanin (S387A) mutiert, so wird die Phosphorylierung durch Cdk1/Cyclin B1 fast vollständig verhindert. Wird zudem diese Mutante (S387A) in humanen Krebszellen überexprimiert, so hemmt dies die Apoptose nach Stimulation des Fas Rezeptors. Wird umgekehrt Cyclin B1 mittels RNA Interferenz depletiert und dadurch Cdk1 nicht aktiviert, wird extrinsische Apoptose verstärkt. Diese Studie zeigt erstmals

eine gezielte Inhibierung des extrinsischen Apoptose Signalweges durch mitotische Kinasen und schlägt ein Modell vor, in dem Serin/Threonin Kinasen extrinsische Apoptose inhibieren und somit der Tumorzelle ermöglichen, der Apoptose zu entkommen. Darüber hinaus wird ein neuartiger Mechanismus der Inhibition der autokatalytischen Spaltung von Procaspase 8 durch eine mitotische Kinase gezeigt.

1. EINLEITUNG

1.1. Apoptose

Apoptose (programmierter Zelltod) ist ein genau regulierter Prozess bei dem während der Embryonalentwicklung oder während der Zellhomöostase mehrzellige Organismen ihre geschädigten oder nicht mehr benötigten Zellen beseitigen (1). Geht eine Zelle in die Apoptose, so ist dieser Prozess charakterisiert durch eine Reihe morphologischer Merkmale wie dem sogenannten „Blebbing“ (Abschnüren von Vesikeln), dem Auflösen der Zellmembran, dem Verlust der Adhärenz, dem Zellschrumpfen, der Kernfragmentierung und der DNA-Fragmentierung. Deregulation der Apoptose kann zu unterschiedlichen pathogenen Prozessen wie Autoimmunerkrankungen, Neurodegeneration oder Tumorprogression führen (2-4). Bereits Anfang dieses Jahrtausends beschrieben Douglas Hanahan und Robert A. Weinberg sechs fundamentale Eigenschaften die Tumorzellen charakterisieren und vom Normalgewebe unterscheiden:

- *Selbstversorgung mit Wachstumssignalen*
- *Unempfindlichkeit gegen Anti-Wachstumssignalen*
- *Gewebsinvasion und Metastasierung*
- *Unbegrenzte Teilung (Verlust der Seneszenz)*
- *Anhaltende Angiogenese*
- *Fähigkeit der Apoptose zu entkommen*

Einen Zusammenhang zwischen gesteigerter Proliferation und der Deregulierung von Apoptose wurde zudem schon in den Anfängen der Krebsforschung postuliert (5, 6). Daher sind insbesondere fehlerhafte apoptotische Signalwege ein Charakteristikum von Tumorzellen.

1.2. Signalwege der Apoptose

Je nachdem ob es sich um ein intrazelluläres oder extrazelluläres Signal, welches Apoptose auslöst, handelt, wird zwischen dem intrinsischen (mitochondrial) und dem extrinsischen (Rezeptor-vermittelt) Signalweg unterschieden. In beiden Fällen kommt es zur Aktivierung einer ganz bestimmten Familie von Proteasen, den Caspasen („cysteinyl aspartate specific protease“). Die einzelnen Caspasen, 16 beim Menschen, sind in der Evolution hoch konserviert und darüber hinaus findet man innerhalb der verschiedenen humanen Caspasen viele homologe Bereiche. Caspasen liegen in der Zelle als inaktive Proenzyme (Zymogene) vor, welche nach einem apoptotischem Stimulus aktiviert werden und anschließend verschiedene zelluläre Substrate proteolytisch spalten.

1.3. Intrinsische Apoptose

Der mitochondriale Apoptose Signalweg ist gekennzeichnet durch das Entlassen mitochondrialer Signalmoleküle aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytoplasma (Abbildung 1-1). Das Schlüsselprotein in diesem Prozess ist Cytochrom c, welches an APAF-1 im Zytoplasma bindet. Dadurch wird Caspase-9, eine Initiator-Caspase aktiviert und es kommt zur Ausbildung eines Multiproteinkomplexes bestehend aus Procaspase 9, Cytochrom c sowie APAF1 („apoptotic-protease-activating factor“), welcher als Apoptosom bezeichnet wird (7-9). Dieser Prozess führt zur Spaltung weiterer Caspasen (10), welche verschiedene zelluläre Proteine, wie zum Beispiel: PARP, Gelsolin, Aktin und Fodrin spalten und somit die Apoptose einleiten. Neben der Aktivierung des mitochondrialen Signalweges durch das Apoptosom kann der intrinsische Apoptose Signalweg gleichfalls durch den Apoptose Promotor Smac/DIABLO („second mitochondria derived activator of caspase“) ausgelöst werden.

1.4. Extrinsische Apoptose

Dagegen kommt es innerhalb des extrinsischen Apoptose Signalweges durch die Stimulation der Rezeptoren der TNF Familie („tumor necrosis factor“), wie z.B. FAS (Apo 1/CD95) oder TRAIL, zur Aktivierung der Initiator Caspase Procaspase 8 (11) (Abbildung 1-1). Nach der Bindung des Liganden (Fas oder Trail) trimerisiert der Rezeptor und initiiert dadurch die intrazelluläre apoptotische Signalkaskade (12-14). Aktivierung des Fas-Rezeptors durch die Bindung des Fas-Liganden führt zur Ausbildung des "DISC" ("death-inducing-signaling-complex"). Hierbei wird zunächst das zytosolische Adapterprotein FADD („FAS associated death domain protein“) und anschließend Procaspase-8 an den Fas Rezeptor rekrutiert (15-17). Die Bindung von FADD und Procaspase-8 erfolgt über die in beiden Proteinen homologe DE Domäne (DED, „death effector domain“) (Abbildung 1-1). Durch die Rekrutierung hoher Konzentrationen von Procaspase-8 Molekülen an den Rezeptor kommt es zur Autoaktivierung der Procaspase-8 ("induced-proximity-model") (15).

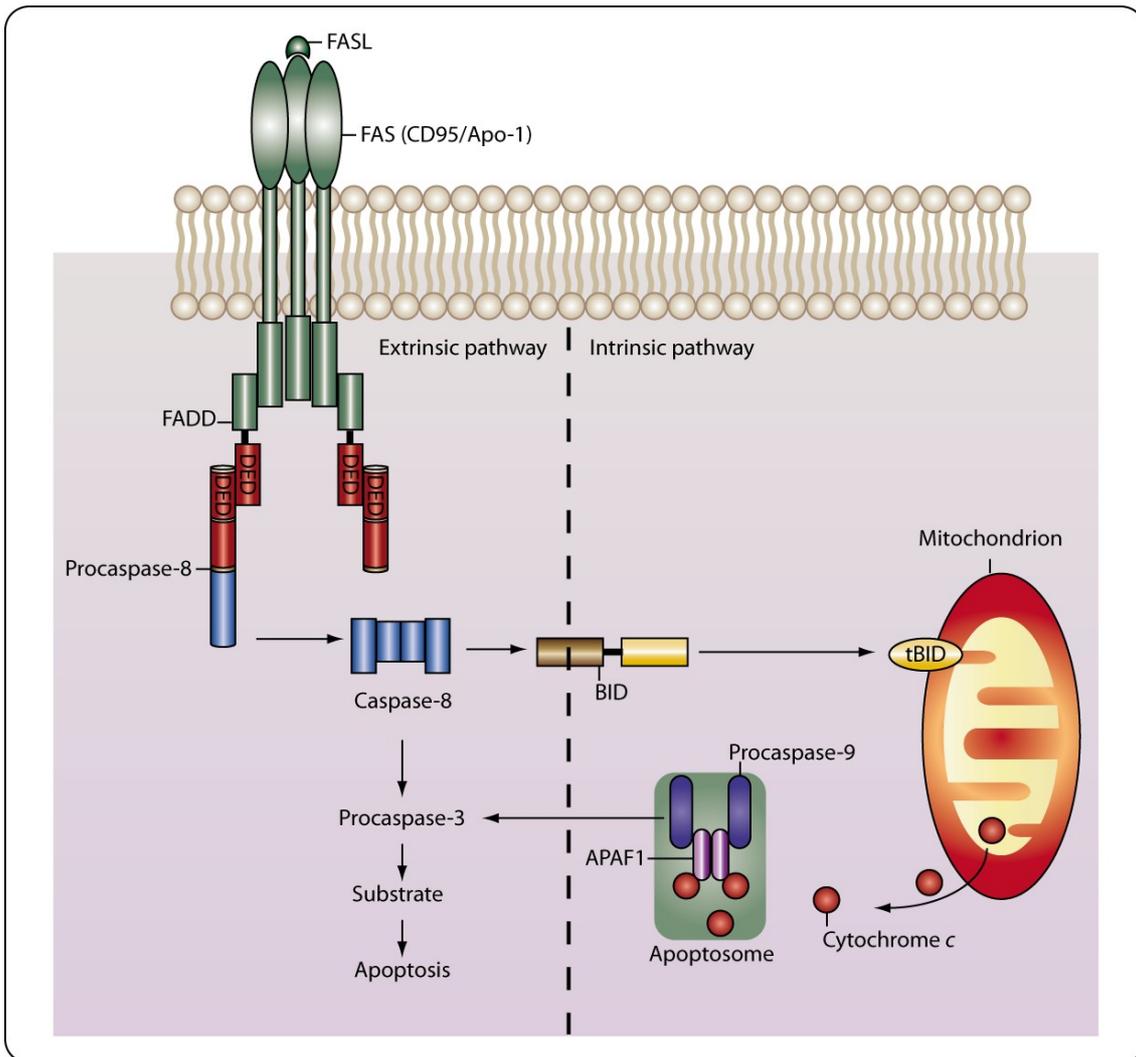


Abbildung 1". Signalwege der Apoptose.

Schematische Darstellung des Rezeptor-vermittelten (extrinsisch) und des mitochondrialen (intrinsisch) Signalweges der Apoptose. Apoptose wird entweder durch Trimerisierung des Todesrezeptors mit seinem Liganden (hier gezeigt: FasR-FasL Komplex) oder durch Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien induziert. Nach Bindung des Fas-Liganden an den Fas/CD95-Rezeptor kommt es zur Rekrutierung des Adapterproteins FADD (Fas-Associated-Death-Domain) und Procaspase 8 an den Rezeptor und zur anschließenden Aktivierung der Caspasen-Kaskade. Wird nach intrazellulärem apoptotischen Stimulus Cytochrom c ausgeschüttet, bildet sich das aus APAF-1 („apoptotic protease-activating factor 1“), Cytochrom c und Caspase-9 komplexierte Apoptosom. Nach Spaltung von Bid durch Caspase 8 kann der

intrinsische Signalweg zusätzlich induziert und dadurch der extrinsische Signalweg verstärkt werden.

1.5. Struktur und Funktion von Procaspase⁸

Das Procaspase 8 Gen (Genbank/Gen ID: 841) besteht aus 11 Exons, welche auf dem langen Arm von Chromosom 2 (2q33-34) lokalisiert sind (18). Die mRNA umfasst nach heutigen Erkenntnissen einen Bereich von 2,9 kb. Die kodierende Sequenz entspricht einem Protein bestehend aus 479 Aminosäuren und einer Masse von 55 kD. Bis heute wurden 9 Isoformen (Procaspase 8/a-i) von Procaspase 8 beschrieben, wobei in den meisten Zellen die 2 charakteristischen Isoformen (Procaspase 8a und Procaspase 8b) exprimiert werden (19). Innerhalb des aminoterminalen Bereiches von Procaspase 8 (Aminosäure 1-216) befinden sich zwei Struktur motive, die sogenannten „DE Domänen“ („death effector domain“ DED). Die Hauptfunktion dieser Domänen ist die homophile Interaktion mit DE Domänen anderer Proteine (20). Die Interaktion von Procaspase 8 am Fas Rezeptor wird daher über die DE Domäne des Adapterproteins FADD („FAS-associating death domain-containing protein“) vermittelt (Abbildung 1-1). Der carboxyterminale Bereich (Aminosäure 216-479) von Procaspase 8 umfasst das katalytische Zentrum des Enzyms. Hier befinden sich die zwei katalytischen Untereinheiten p10 und p18 (Abbildung 1-2). Nach apoptotischen Stimuli spaltet sich Procaspase 8 an definierten Asp-X Stellen selbst (Autoproteolyse), wodurch sich je zwei der beiden Untereinheiten p10 und p18 zu einem Heterotetramer formieren und somit von der DE Domäne dissoziieren (Abbildung 1 1 und Abbildung 1-2). Röntgenbeugungsanalysen konnten für Caspase-1, Caspase-2, Caspase-3, Caspase 7, Caspase-8 und Caspase-9 die Formation als Heterotetramer bestätigen (21). Die beiden katalytischen Untereinheiten, p10 und p18, liegen innerhalb des Heterodimers in einer antiparallelen Konformation vor. Dadurch befinden sich beide katalytische Zentren (His-317 und Cys 360) an entgegengesetzten Enden des Heterotetramers (Abbildung 1 2).

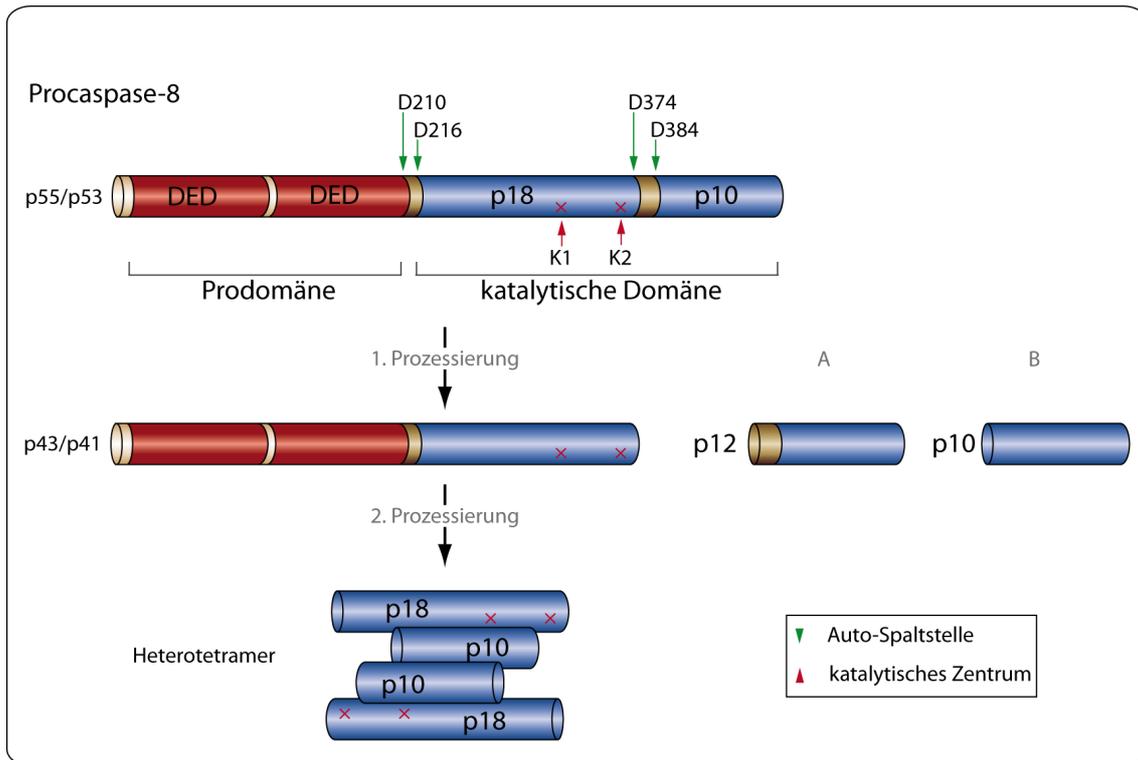


Abbildung 1². Schema der Auto-Prozessierung von Procaspase⁸.

Nach apoptotischen Stimuli findet die Aktivierung der Procaspase 8 durch Autoprozessierung zur katalytisch aktiven Caspase 8 am Rezeptor-Komplex statt. Die aminoterminalen Prodomäne von Procaspase 8 besteht hauptsächlich aus 2 DE Domänen („death-effector-domain“). Der carboxyterminale Bereich besteht dagegen aus den 2 katalytisch aktiven Subdomänen p18 und p10. Im ersten Schritt der Prozessierung spaltet sich Procaspase 8 an Asp-374 was zum Intermediat p12 führt, welches jedoch sofort durch Spaltung an Asp-384 zu p10 prozessiert wird. Der zweite Schritt der Prozessierung umfasst die Spaltung an Asp-216. Hierdurch wird die Untereinheit p18 von der Prodomäne von Caspase 8 gespalten und es bilden sich 2 Heterodimere welche wiederum zu einem Heterotetramere assemblieren. Nachdem sich das katalytisch aktive Heterotetramer ausgebildet hat, dissoziiert die aktive Caspase 8 vom Rezeptor in das Cytosol.

Procaspase 8 ist eine Cystein-Aspartat-spezifische Protease welche ihre Substrate an einem Muster aus 4 Aminosäuren erkennt ([L/V]-E-X-D). Interessanterweise stimmt dieses Muster mit der Spaltstelle zwischen den katalytischen Untereinheiten weiterer Initiator-Caspasen überein. (22, 23)

In der Zelle liegt Procaspase-8 als katalytisch-inaktives Vorläuferenzym (Zymogen) vor, bis es nach einem apoptotischen Stimulus sich autoproteolytisch aktiviert und somit die Apoptose auslöst. Nach Stimulierung von Rezeptoren (Fas/CD95-R; TRAIL-R; TNF-R) der TNFR-Familie („tumor-necrosis-factor-receptor“) durch ihre Liganden, trimerisiert der Rezeptor und Procaspase-8 wird durch Oligomerisation an diesem Rezeptor-Komplex aktiviert (24) (Abbildung 1-1). Dieses Ereignis vermittelt homophile Protein Interaktionen mit der DE Domäne des Adapterproteins FADD. Zudem interagieren die DE Domänen von FADD und FLIP („FLICE-like inhibitory protein“) mit dem Rezeptor und es kommt zur Ausbildung eines Apoptose-induzierenden Multiproteinkomplexes, dem sogenannten „DISC“ („death-inducing signaling complex“). Durch die Rekrutierung von Procaspase 8 am Rezeptor kommt es zur Autoaktivierung von Procaspase-8 nach dem sogenannten „induced proximity model“. Hohe lokale Konzentration von Caspase-8 Molekülen am DISC führen zu deren autoproteolytischen Spaltung (15, 23, 25, 26). In vitro Studien haben gezeigt, dass insbesondere die Ausbildung von Dimeren aus der p18-Untereinheit und der p10 Untereinheit zu proteolytisch aktiven Komplexen führt. Interessant ist zudem, dass die aktive sowie die inaktive Form der Caspase-8 unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen (26). Dies ist in Bezug auf unterschiedliche Funktionen von Procaspase 8 von Relevanz, da katalytisch inaktive Procaspase 8 nicht-apoptotische Funktionen ausübt.

Zusätzlich zum Modell der Autoaktivierung von Procaspase 8 zeigen neueste Studien, dass weitere Faktoren zur vollständigen und dauerhaften Aktivierung von Procaspase 8 notwendig sind. RIP1 („receptor-interacting-protein 1“), eine Serin/Threonin Kinase, wird nach Fas Ligation am DISC rekrutiert und verstärkt dadurch die Aktivierung von Procaspase 8 sowie weiterer Caspasen in T Lymphozyten (27). Ein neuartiger Mechanismus der Regulierung von

Procaspase 8 ist die Ubiquitinierung der Protease. Das Heterodimer von Procaspase 8 ist nach der Dissoziation vom DISC zu instabil, um längere Zeit im Cytosol zu verbleiben (28, 29). Cullin 3, eine E3 Ubiquitin Ligase, polyubiquitiniert Procaspase 8 am DISC. Daraufhin bindet das Ubiquitin Bindeprotein p62 und der Komplex transloziert in das Cytosol (30). Dadurch wird die Protease Aktivität über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten und somit durch das Ubiquitin System positiv reguliert.

1.6. Nicht"apoptotische Funktionen von Procaspase"8

Neue Ergebnisse deuten darauf hin, dass Procaspase 8, neben den bekannten apoptotischen Funktionen, verschiedene nicht apoptotische Funktionen besitzt. Eine dieser Funktionen ist die Aufrechterhaltung der Homöostase durch die Regulierung der Menge von Interleukin 2 zur Kontrolle der Zellproliferation in Lymphozyten (31, 32). Zudem bestimmt die subzelluläre Lokalisation der katalytisch aktiven Procaspase 8 darüber, ob entweder die Apoptose oder die Proliferation reguliert wird (33). Eine weitere wichtige Funktion von Procaspase 8 ist die Rolle während der Zelladhäsion, der Zellmigration und der Metastasierung (Abbildung 1 3). In gesunden Geweben stehen Zellen über Verbindungen mit der extrazellulären Matrix (ECM) in Kontakt. Diese Kontakte werden von den Integrinen, einer Familie von Zelladhäsions Rezeptoren, vermittelt. Verlieren Zellen diese Kontakte („unligated integrins“), so kommt es zur Apoptose (34). Dabei wird Procaspase 8 zu den Integrinen rekrutiert, dort aktiviert und es kommt zu einem Todesrezeptor unabhängigen Zelltod („integrin-mediated-death“, IMD). Zudem konnte nach Blockade der Zelladhäsion, katalytisch aktive Caspase 8 in einem DISC ähnlichen Komplex zusammen mit beta3 Integrin an der Innenseite der Zellmembran humaner Epithelzellen lokalisiert werden (35). Weitere Studien konnten belegen, dass vor allem in Neuroblastomen die Aggressivität und das Metastasierungsverhalten dieser Tumore durch Deletion oder Suppression von Procaspase 8 deutlich verstärkt

wurde (36). Durch die Deaktivierung der Procaspase-8 wird der Integrin-vermittelte Zelltod blockiert und die Tumorzelle kann besser migrieren. Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus von Procaspase 8 während der Migration haben ergeben, dass während der Migration bei Krebszellen, Procaspase 8 negativ reguliert wird (37). Insbesondere scheint hier die Phosphorylierung an Tyr-380 durch Src-Kinase („Sarcoma“, Src) eine entscheidende Rolle zu spielen (38). Die Phosphorylierung an von Procaspase 8 an Tyr-380 durch Src Kinase führt zur Inaktivierung der katalytischen Aktivität von Procaspase 8.

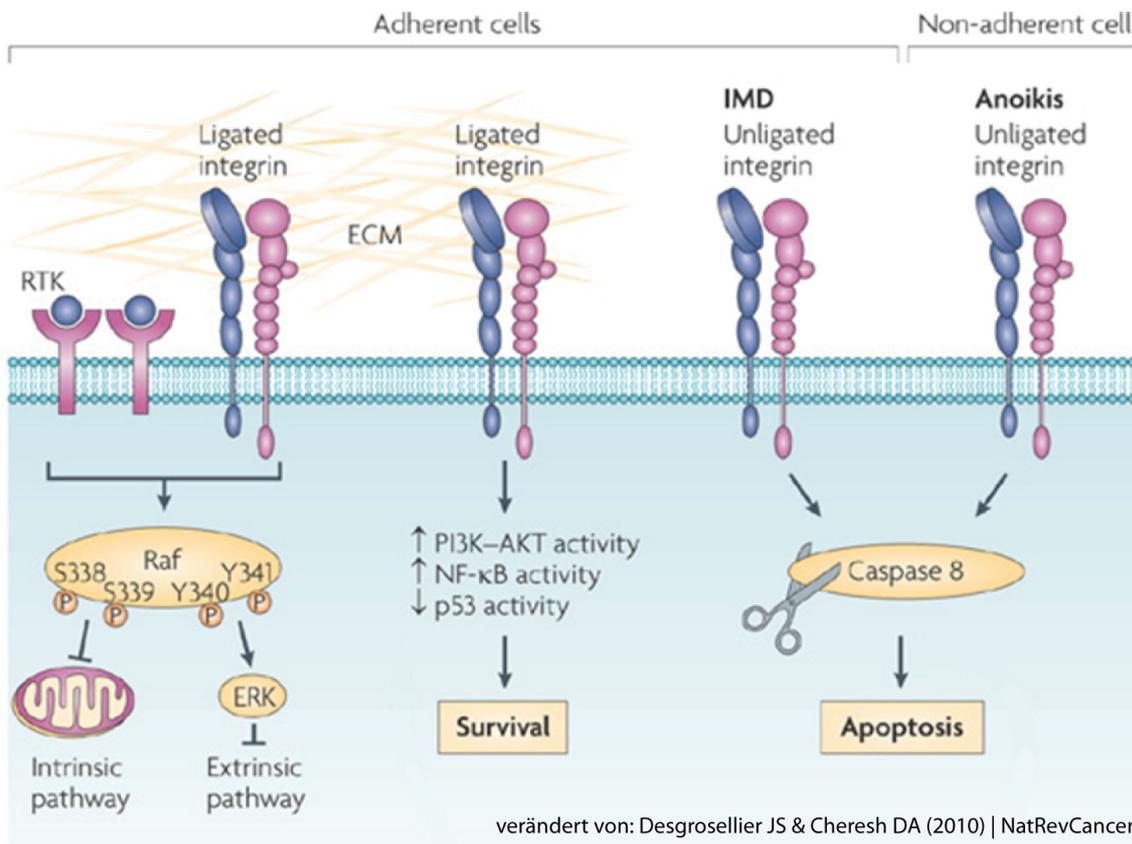


Abbildung 1 3. Integrin-vermittelte Signalwege der Zelladhäsion.

Innerhalb der Integrin-vermittelten Signalwege der Zelladhäsion kommt es entweder zum Wachstum oder zum Zelltod, je nach Status der Verbindungen zwischen den Integrinen und Zellmatrixproteinen.

Während die Integrine mit Zellmatrixproteinen verbunden sind, kommt es über posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung von Raf) zur Hemmung der intrinsischen sowie der extrinsischen Apoptose.

Im Gegensatz dazu führen nicht oder falsch-verbundene Integrine zur Spaltung von Procaspase 8 und damit zum Zelltod. Diese Integrin-vermittelte Form der Apoptose wird auch Anoikis genannt.

Da in vielen Tumoren Src-Kinase konstitutiv aktiv ist, stellt sich die Frage, ob Tumorzellen Strategien entwickelt haben, Kinasen zu ihrem Vorteil umzuprogrammieren und der Apoptose zu entkommen. Aktuelle Studien zur Rolle von Procaspase⁸ bei der Regulierung von Migration und Metastasierung identifizieren Procaspase⁸ in einem Multiprotein-Netzwerk mit PI3-Kinase, Rab5 und Src-Kinase (39-42).

Eine weitere, erst kürzlich entdeckte, nicht-apoptotische Funktion von Procaspase 8, ist der Einfluss auf die Zelldifferenzierung. Die alleinige Überexpression der DE Domäne von Procaspase 8 führt in Neuroblastomzellen zu verschiedenen mitotischen Defekten: Strukturveränderungen an den Mikrotubuli, Zellen mit mehreren Zellkernen und schließlich zum Zellzyklusarrest. Daraus resultiert eine verlangsamte Proliferationsrate sowie geringeres Tumorwachstum (43). Die katalytische Subdomäne von Procaspase 8 (p18+p10) spielt hierbei jedoch keine Rolle. Im Gegenteil, Lys-156, das in der DE Domäne zu finden ist, scheint diese antiproliferative Funktion zu vermitteln (43, 44). Da es sich hierbei offensichtlich um eine Stelle zur Ubiquitinierung handelt, stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob die E3-Ubiquitin Ligase Cullin3 oder eine andere Ubiquitin Ligase Procaspase 8 an dieser Stelle ubiquitiniert.

Die Störung der verschiedenen Funktionen wie Zelltod, Zellhomöostase, Zelladhäsion und Zellmigration sind charakteristisch für Tumorzellen. Die Mutationen des Caspase 8 Gens in Tumoren deuten zudem darauf hin, dass die unterschiedlichen Mechanismen der Inaktivierung von Procaspase 8 ursächliche

Faktoren auf dem Weg zur onkogenen Transformation sind. Können Tumorzellen durch verschiedene Mechanismen die apoptotische Funktion von Procaspase 8 gezielt inhibieren?

1.7. Negative Regulation der Apoptose

Ein Hauptmerkmal von Tumorzellen ist die Deregulierung der Apoptose, selbst nach Stimulation mit proapoptotischen Substanzen (4). Einer der möglichen Mechanismen, der Apoptose zu entkommen, ist die Inaktivierung von Procaspase 8 durch Gen Mutationen, Promoter Methylierungen, alternatives Spleißen oder posttranslationale Modifikationen(45-50). Bei Tumoren des Magens, des Darms und des Hals/Nacken Bereiches konnten Mutationen im Caspase 8 Gen identifiziert werden. Diese Mutationen führen zu einer dominant-negativen Form von Procaspase 8, die sich nach Rekrutierung an den Todesrezeptor nicht mehr spalten lässt. Somit wird durch Inhibierung der Autokatalyse die Rezeptor-vermittelte Apoptose blockiert. Insbesondere Mutationen beim Neuroblastom führen zum Funktionsverlust von Procaspase 8 und begünstigen zudem die Metastasierung dieser Tumorzellen (51-55). Deshalb wird vorgeschlagen, entweder die Caspase 8 Expression, die beta3 Integrin Expression oder beides speziell im Neuroblastom wieder zu reaktivieren (56). Versuche mit Procaspase 8 defizienten murinen Fibroblasten zeigen, dass diese Zellen dazu in der Lage sind, tumorigene Eigenschaften zu erlangen. (57) Insbesondere Procaspase 8^{-/-} Knockout Zellen entwickeln im Tiermodell Tumoren. Diese Studien zeigen, dass Procaspase 8 tumorsuppressive Eigenschaften besitzt. Ähnliche Mechanismen zur Inaktivierung Apoptose-auslösender Proteine zeichnen sich bei weiteren Initiator Caspasen ab. Die Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges ist assoziiert mit einem Schutz der Zellen vor Apoptose (58, 59). Zudem wurde gezeigt, dass durch die Phosphorylierung von Procaspase-9 an Thr 125 durch MAPK1 (Erk2) der intrinsische Apoptoseweg in Tumorzellen gehemmt wird (60). Die Phosphorylierung von Procaspase 9 an Thr 125 durch

MAPK1 findet während des Zellzyklus in der G1/S-Phase statt, wohingegen Thr 125 in der Mitose von einer weiteren Kinase reguliert wird. In arretierten mitotischen Zellen phosphoryliert Cdk1/Cyclin B1 Procaspase-9 an Thr 125 und sorgt somit für eine Verschiebung der Balance in Richtung anti apoptotischer Signaltransduktion. Wenn Thr-125 zu Alanin (T125A) mutiert und anschließend in Mitose arretierten Zellen überexprimiert wird, so gehen diese Zellen schneller in die Apoptose im Vergleich zu den Zellen, welche den Procaspase 9 Wildtyp überexprimieren (61). Somit wurde erstmals eine direkte Verbindung zwischen dem intrinsischen apoptotischen Signalweg und dem Zellzyklus hergestellt.

Weitere Arbeiten haben gezeigt, dass der extrinsische Signalweg durch Stress induzierte Kinasen der p38 MAPK Familie („mitogen-activated-protein-kinase“; p38 α und p38 δ), gehemmt wird (62). Die Phosphorylierung von Procaspase-8 an Ser-150 durch p38 MAPK inhibiert Procaspase-8. Die Mutation zu von Ser-150 zu Alanin hingegen führt zu p38 MAPK unabhängigen Apoptose. Zusätzliche Hinweise für die Hypothese der Regulierbarkeit apoptotischer Signalmoleküle durch Kinasen lieferten Studien, in denen Procaspase 8 als neues Substrat von Src-Kinase, einer in vielen Tumoren konstitutiv aktivierten Tyrosin Kinase, identifiziert wurde (63). Hier konnte gezeigt werden, dass das aktivierte Proto-Onkogen Src, Procaspase-8 an Tyr-380 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung findet innerhalb der Verbindungsregion zwischen der großen und der kleinen katalytischen Untereinheit von Procaspase 8 statt. Die zelluläre Funktion dieser Interaktion ist die negative Beeinflussung der Prozessierung von Procaspase 8. Zusammenfassend stellt sich daher die Frage, ob neben den bekannten Kinasen zusätzlich Zellzyklus Kinasen regulierend in den extrinsischen Apoptose Signalweg eingreifen. Darüber hinaus könnte die Beantwortung dieser Fragestellung erklären, warum es in unterschiedlichen Tumorentitäten zu einer gezielten Deregulierung der Apoptose kommt.

1.8. *Plk1, eine bedeutende Zellzyklus-Kinase*

In aktuellen Forschungsarbeiten erlangt *Plk1* („polo like kinase“) als Schlüsselenzym bei der Regulation des Zellzyklus in Kooperation mit *Cdk1/Cyclin B1* eine immer größere Bedeutung. *Plk1* ist eine Serin/Threonin Kinase, die aus einer aminoterminalen Kinase-Domäne und einer carboxyterminalen Polo-Box-Domäne (PBD) besteht. *Plk1* besteht aus 603 Aminosäuren mit einer Größe von 66 kD (Abbildung 1 2).

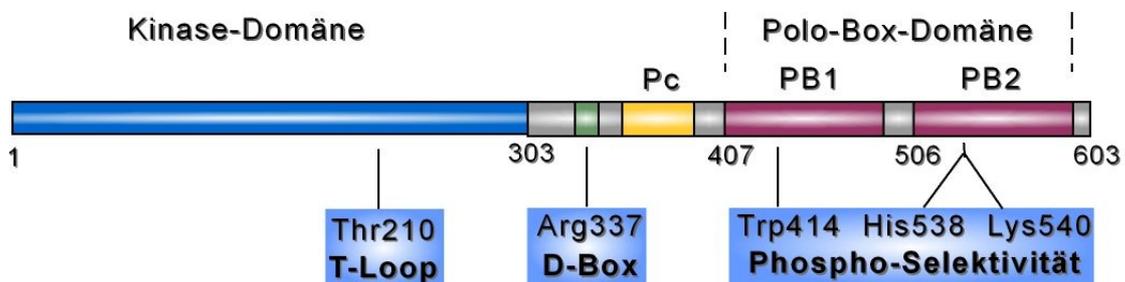


Abbildung 1". Strukturelle Eigenschaften der Polo-like Kinase 1.

Polo like Kinasen bestehen strukturell aus zwei Teilen, der aminoterminalen Kinase Domäne (blau) und der carboxyterminalen Polo Box Domäne (PBD). Wie hier an *Plk1* gezeigt, enthält die PBD zwei Polo Boxen (PB -> PB1 und PB2). Die Kinase Domäne ist über eine Verbindungsregion, der Polo Box Cap (gelb)(Pc), mit der PBD verbunden. Die für die Phosphopeptidbindung essentiellen Aminosäuren (Trp 414, His 538, Lys 540) (blaue Box, Phospho-Selektivität) befinden sich innerhalb der Polo Boxen. Innerhalb der Kinase Domäne befindet sich der zur Aktivierung von *Plk1* benötigte T Loop (blaue Box, T-Loop). Das D Box Motiv (blaue Box, D-Box) ist für die Degradierung von *Plk1* durch den APC/C („anaphase promoting complex/cyclosome“) essentiell.

Plk1 ist während der Mitose an der Regulation verschiedener Prozesse beteiligt: Regulation der Centrosomenreifung, Aufbau der Mitosespindel, Trennung der Chromatiden, Inaktivierung von Inhibitoren des (APC/C) sowie Steuerung der Cytokinese (64, 65). Die zeitlich koordinierte Lokalisation von Plk1 an verschiedenen Zellstrukturen wie der Mitose-Spindel, den Centrosomen und den Kinetochoren während der Mitose basiert auf dem sogenannten „Priming“ Mechanismus, bei dem die Polo-Box-Domäne von Plk1 eine wichtige Rolle spielt (66-69). Plk1 bindet über die PB Domäne an seine Substrate wenn diese an der Bindungsstelle („docking-site“) phosphoryliert sind (Abbildung 1-3). Ausgehend von der Kinase, welche diesen ersten Phosphorylierungsschritt durchführt, werden zwei Varianten des „Priming“ Mechanismus unterschieden. Bei der sogenannten „non-selfpriming“ Variante wird das potentielle Plk1 Substrat von einer weiteren Kinase zuvor phosphoryliert bis dann Plk1 über seine PB Domäne an diese Stelle bindet und das Substrat an weiteren Stellen phosphoryliert (Abbildung 1-3, linke Seite). Die „non-selfpriming“ Variante liegt Studien zugrunde die zeigen, dass Plk1 Substrate in den meisten Fällen von Cdk1/Cyclin B1 oder CaM Kinase I („calcium/calmodulin-dependent protein kinase“) vorphosphoryliert werden (70). Die Abfolge der Aminosäuresequenz der PBD Bindungsstelle entspricht bei den meisten Substraten dem Muster S-pS/pT-P/X (Abbildung 1-3). Bei dem Modell der „selfpriming“ Variante phosphoryliert Plk1 seine Bindestelle selbst und kreierte somit selbst die Bindestelle (71) (Abbildung 1 3, rechte Seite). Die Konsensussequenz für die Phosphorylierungsstelle der verschiedenen Plk1 Substrate konnte durch Peptid Bindungsstudien genauer spezifiziert werden. Das optimale Bindungspeptid von Plk 1 lautet demnach: LGEDQAAEEISDDLLES[S/T]LSDEDE („plktide“) (72). Es wird postuliert, dass Plk1 erst durch den „Priming“ Mechanismus seine unterschiedlichen mitotischen Funktionen ausüben kann (70, 73-75).

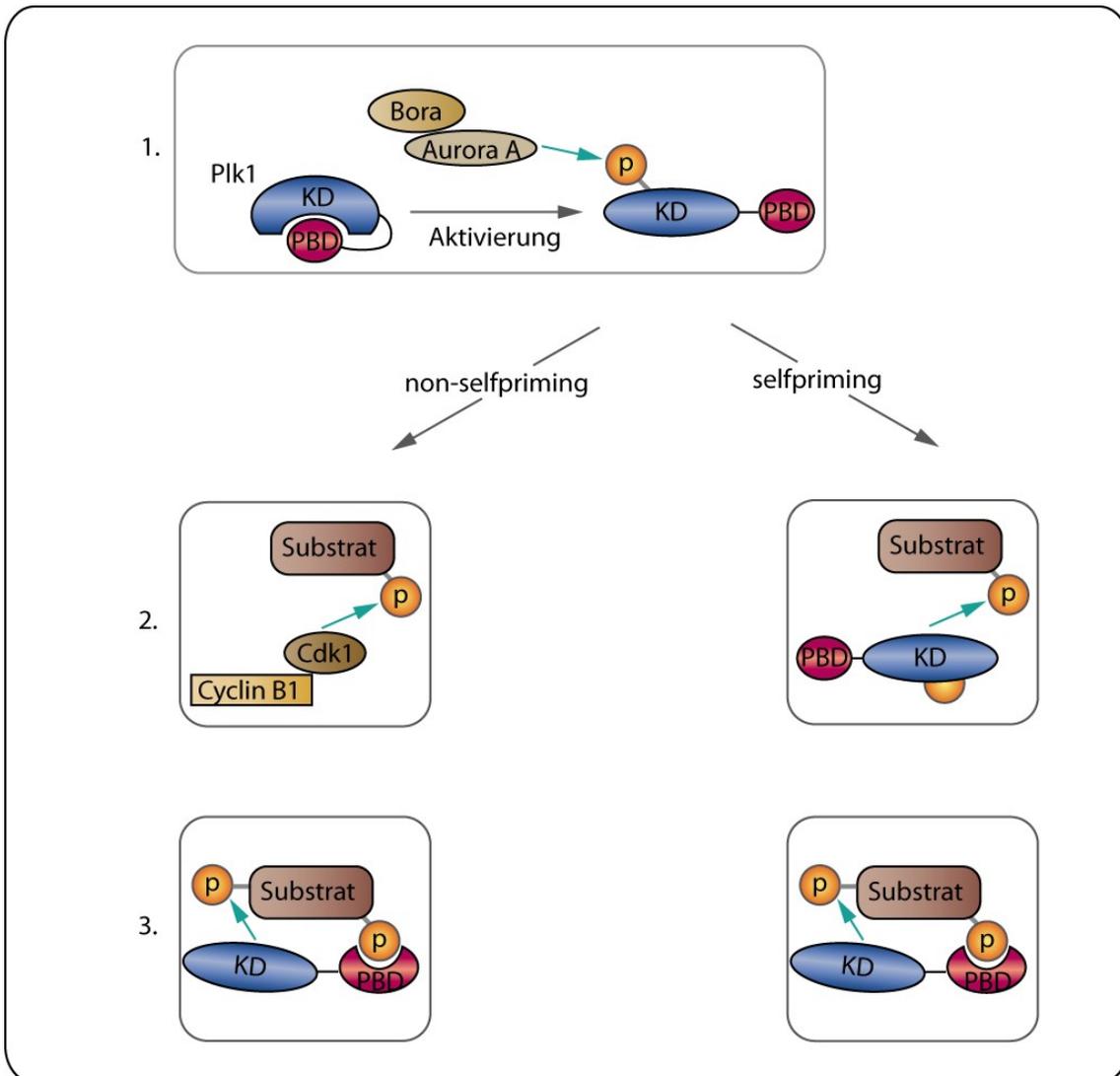


Abbildung 1". Mechanismus der Wechselwirkung von Plk1 mit seinen Substraten.

Im ersten Schritt wird Plk1 durch den Aurora Bora Komplex an Thr-210 phosphoryliert und damit aktiviert. Innerhalb der „non selfpriming“ Variante (linke Seite) phosphoryliert wie hier gezeigt Cdk1 Cyclin B1 das Plk1 Substrat, bindet dann an diese Stelle und phosphoryliert das Substrat an weiteren Stellen. Bei der „self priming“ Variante phosphoryliert Plk1 seine Bindestelle selbst, bindet dort und phosphoryliert weitere Stellen. Das Muster der Plk1 Bindestelle ist S S/T P/X. Das Muster der Phosphorylierungsstelle hingegen ist D/E-X-pS/pT-Φ-X-D/E (Φ=hydrophobe Aminosäure; x=beliebige Aminosäure).

Die in jüngsten Studien identifizierten „Priming“-Kinasen sind Cdk1/Cyclin B1 (68) und p42 MAPK1/Erk2 („extracellular signal regulated kinase 2“) (76). Zusätzlich konnten CaM Kinase II (77) sowie Plk1 selbst als „Priming“-Kinasen identifiziert werden (78). Außer dem Muster für die Docking-Seite (S S/T P/X) konnte auch ein Konsensus-Muster (D/E-X-pS/pT- Φ -X-D/E) für die Stellen postuliert werden, an denen Plk1 seine Substrate phosphoryliert (79, 80).

1.9. Cdk1 Cyclin B1, Initiator der Mitose

Der Hauptregulator für den Eintritt in die Mitose ist der sogenannte „maturation promoting factor“ (MPF). Der MPF besteht aus einer regulatorischen Untereinheit, dem Cyclin B1, sowie aus einer katalytischen Untereinheit, der „cyclin dependent kinase“ (Cdk1). Wie der Name schon sagt, braucht Cdk1 zur Aktivierung sein regulatorisches Cyclin, das zu Beginn der Mitose exprimiert wird (Abbildung 1-4). Volle Aktivierung wird zudem durch die Dephosphorylierung der inhibitorischen Phosphate innerhalb von Cdk1, Thr-14 und Tyr-15, durch die Phosphatase Cdc25C am G₂/M Übergang erreicht. Plk1 erfüllt hierbei eine entscheidende Rolle, da es zum einen dazu beiträgt, die inhibitorischen Kinasen Wee1 und Myt1 zu inaktivieren und zum anderen die Phosphatase Cdc25C zu aktivieren (Abbildung 1 4).

Aktiver Cdk1/Cyclin B1 Komplex phosphoryliert über 70 Proteine und reguliert damit verschiedene Funktionen innerhalb der Mitose wie die Centrosomenreifung, die Separation der Centrosomen, die Fragmentierung des Golgi Apparates, die Degradierung der Kernhülle und die Kondensation der Chromosomen (81). Zudem reguliert Cdk1/Cyclin B1 die Replikation, die Mikrotubuli Dynamik, die Translation, die Ubiquitinierung sowie die Apoptose während der G₂/M Phase. Die Deaktivierung des MPF erfolgt mittels Ubiquitinierung von Cyclin B1 und anschließender Degradierung durch den APC („anaphase-promoting-complex“) in der Anaphase der Mitose.

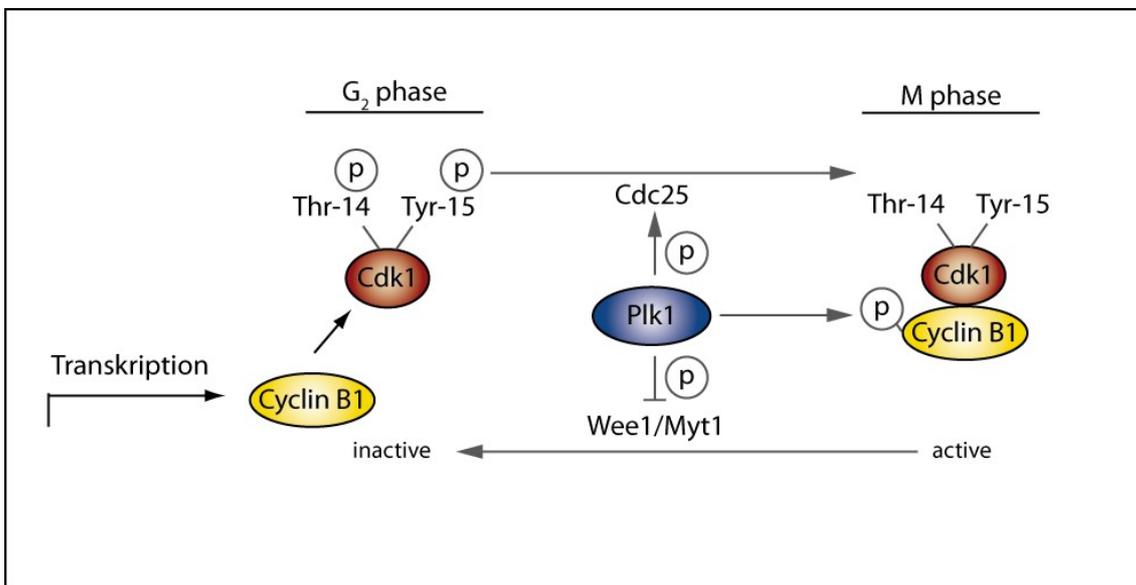


Abbildung 1 4. Aktivierung des MPF am G₂/M Übergang.

Die zeitlich koordinierte Expression von Cyclin B1 führt dazu, dass der Level an Cyclin B1 am späten Ende der G₂ Phase und zu Beginn der Mitose sein Maximum erreicht und mit Cdk1 assoziiert (MPF). Zusätzlich wird der MPF durch Dephosphorylierung der inhibitorischen Phosphate von Cdc25C voll aktiviert, was durch Plk1 positiv verstärkt wird. Plk1 aktiviert CDC25 Phosphatasen und deaktiviert die beiden Cdk1 inhibitorischen Kinasen Wee1 und Myt1.

AUFGABENSTELLUNG

Um einen funktionellen Zusammenhang zwischen dem Zellzyklus und der Apoptose zu untersuchen, sollen zu Beginn dieser Studie, Bindungs- und Phosphorylierungsstellen von Zellzyklus-Kinasen in Caspasen, insbesondere in Procaspase 8, identifiziert werden. Im nächsten Schritt sollen verschiedene Subdomänen, das Gesamtprotein als auch funktionell relevante Punktmutanten auf der Basis der humanen Procaspase 8 cDNA generiert werden. Die unterschiedlichen Procaspase 8 Klone werden dann in Bakterien überexprimiert und anhand von Kinase-Assays soll untersucht werden, ob und an welchen Stellen Procaspase 8 durch Cdk1/Cyclin B1 phosphoryliert wird. Um die Bindung von Procaspase 8 mit Cdk1/Cyclin B1 zu studieren, sollen weitere Bindungsstudien sowie Immunpräzipitationen durchgeführt werden. Interaktionsstudien mit den einzelnen Subdomänen oder Mutanten von Procaspase 8 sollen die Bindestelle von Procaspase 8 mit Cdk1/Cyclin B1 möglichst genau identifizieren. Danach soll an humanen Zellen die Funktion und der Mechanismus dieser Interaktion anhand von Fas Ligation in unsynchronisierten als auch in mitotischen Tumorzellen genauer studiert werden.

Durch dieses Arbeitsprogramm soll der Zusammenhang von gesteigerter Proliferation und gestörter Apoptose in Krebszellen untersucht werden. Darüber hinaus soll die Frage beantwortet werden, ob die apoptotische Signalkaskade von Zellzyklus-Kinasen direkt beeinflusst werden kann.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Sigma Aldrich (Steinheim/Taufkirchen), Roth (Karlsruhe), AppliChem, (Darmstadt), Merck, (Darmstadt), Fluka (Buchs; Schweiz), PAA, (Linz; Österreich). Isotope wurden von Perkin Elmer (Bosten; USA) bezogen.

2.2. Antikörper

Monoklonale Antikörper gegen Fas/CD95 (CD95/Apo-1, clone 2R2, Calbiochem), β -Actin (clone AC-15, Sigma), FlagM2 (F1804, Sigma), Plk1 (clone 35 206, Millipore), phospho-histone H3 Ser10 (clone 3H10, Millipore), Plk1-NT (NT, Millipore), Plk1 (F-8, sc-17783, Santa Cruz), Cdk1 (17, sc-54, Santa Cruz), Cyclin B1 (GNS1, sc-245, Santa Cruz), GST (B-15, sc138, Santa Cruz), V5 (Invitrogen), PARP (46D11, Cell Signaling), Caspase-8 (1C12, Cell Signaling), Caspase-8 (clone 12F5, Alexxis,) und Caspase-8 (clone 9-1-3, BD Biosciences) wurden kommerziell bezogen. Die Antikörper wurden laut den Angaben der Hersteller verwendet. Monoklonale Antikörper gegen die katalytisch aktiven Untereinheiten von Caspase-8 (p18 -> clone C15; p10 -> clone C5) wurden freundlicherweise von Frau Dr. Inna Lavrik (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Um einen phosphospezifischen Antikörper gegen Serin-387 von Procaspase 8 zu generieren, wurden Kaninchen von der Firma Eurogentec gegen das Phospho Peptid YLEMDLSpSPQTRY immunisiert. Anschließend wurde der Phospho Antikörper affinitäts-aufgereinigt. Sekundäre HRP-gekoppelte Antikörper wurden von Santa Cruz bezogen.

2.3. Lösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Lösungen und Puffer wurden, autoklaviert (20 min bei 120°C und 2,0 bar) oder im Falle der Hitzeinstabilität sterilfiltriert.

Präparation von EDTA (0,5 M pH 8,0)

Unter ständigem Rühren wurden 186,1 g EDTA zu 800 ml H₂O zugegeben. Damit sich das EDTA löste, wurden 20 g NaOH Pellets zugegeben und der pH 8,0 mit 4M NaOH eingestellt.

TFB I Puffer

30 mM	Kaliumacetat
100 mM	RbCl
10 mM	CaCl ₂
50 mM	MnCl ₂
15% (v/v)	Glycerin

pH 5,8 mit CH₃COOH einstellen und steril filtrieren.

TFB II Puffer

10 mM	MOPS
75 mM	CaCl ₂
10 mM	RbCl
15% (v/v)	Glycerin

pH 6,5 mit NaOH einstellen und steril filtrieren.

1 % Agaroselösung

1 g	Agarose
1x	TAE
ad 100 ml	H ₂ O bidest.

50x TAE-Stammlösung

242 g	Tris base
57,1 ml	Essigsäure
100 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)

Ethidiumbromid-Färbelösung

1 µg/ml	EtBr in H ₂ O
---------	--------------------------

10x DNA-Probenpuffer

60%	Glycerin (v/v)
10 mM	EDTA
0,05%	Orange" G (w/v)

NENTG Puffer

<i>100 mM</i>	<i>NaCl</i>
<i>20 mM</i>	<i>Tris HCl pH 7,6</i>
<i>1 mM</i>	<i>EDTA</i>
<i>0,5%</i>	<i>NP⁴⁰</i>
<i>10%</i>	<i>Glycerol</i>

MSKAT Puffer

<i>2 M</i>	<i>Natriumacetat</i>
<i>0,4 M</i>	<i>Tris HCl pH 8,0</i>
<i>33 mM</i>	<i>KCl</i>
<i>20 mM</i>	<i>Ammoniumsulfat</i>
<i>4 mM</i>	<i>MgCl₂</i>

NP⁴⁰ Lysepuffer

<i>50 mM</i>	<i>Tris HCl pH 7,5</i>
<i>150 mM</i>	<i>NaCl</i>
<i>10%</i>	<i>Glycerol</i>
<i>1% (v/v)</i>	<i>NP-40</i>
<i>50 mM</i>	<i>NaF</i>
<i>50 mM</i>	<i>β Glycerophosphat</i>
<i>1x</i>	<i>Complete Proteaseⁱⁿhibitor (Roche)</i>

2x SDS Laemmli Puffer

4%	<i>SDS</i>
20%	<i>Glycerol</i>
125 mM	<i>Tris HCl pH 6,8</i>
0,004%	<i>Orange"G</i>
10%	<i>β-Mercaptoethanol</i>

Laufpuffer

1,4% (w/v)	<i>Glycin</i>
0,3% (w/v)	<i>Tris-base</i>
0,2% (w/v)	<i>SDS</i>

Blotting-Puffer

1,4% (w/v)	<i>Glycin</i>
0,3% (w/v)	<i>Tris-base</i>
20% (v/v)	<i>Methanol</i>

TBST

10 mM	<i>Tris"HCl pH 7,6</i>
150mM	<i>NaCl</i>
0,1%	<i>Tween"20</i>

5% TBST"BSA Block"Puffer

2,5 g	BSA
ad 50 ml	TBST

Hepes Lysepuffer

20 mM	HEPES pH 7,4
150 mM	NaCl
0,5%	NP"40
50 mM	NaF
20 mM	β -Glycerophosphat
10%	Glycerol
1x	Complete Protease"Inhibitor (Roche)

ECL Lösung A

200 ml 0,1 M Tris HCl pH 8,6

50 mg Luminol

ECL Lösung B

11 mg Para Hydroxycoumarinsäure

10 ml DMSO

Caspase 8 Primer (5' – 3') zur Klonierung von WT, NT und CT

WT forward (pGex)	AGCGGATCCAAATGGACTTCAGCAGAAATCTTTATG
WT reverse (pGex)	AGCCAAGCTTTCAATCAGAAGGGAAGACAAGTTT
CT forward (pGex)	GCTGGATCCAATTCAGCAAAGAGAGAAGCAGCAGCCT T
CT reverse (pGex)	GCTGAATTCTCTTAGTGTAAGTAGGCTGAGGCATC
p18 reverse (pGex)	TTTGAATTCTCCAGCAAGGGAAGGGCACTTC
p10 forward (pGex)	GGGGAATTCTACCAGAAAGGTATACCTGTTGAG
p10 Del reverse (pGex)	CAGGAATTCAGCCTCATCCGGGATATATCTCG
DE Del1 reverse (pGex)	GTCGAATTCGGCATCCTTGATGGGTTCTTGCTTCCTTG
DE Del2 reverse (pGex)	GTCGAATTCCTAGTGTTTAGGTAGGTAATCAGCAAATC C
DE De3 reverse (pGex)	GTCGAATTCCCAGCAGTTCATGTCATCATCCAGTTTGC
WT forward (p3xFlag)	ATTGGATCCATGGACTTCAGCAGAAATCTTTATGAT
WT reverse (p3xFlag)	GCATCTAGATCAATCAGAAGGGAAGACAAGTTTTTTTC

3xFlag forward (pcDNAV5)	CTTAAGCTTGGTACCGCCACCATGGAC
3xFlag reverse (pcDNAV5)	CCCTCTAGACAATCAGAAGGGAAGACAAGTTT

Caspase 8 Primer (5' – 3') zur gerichteten Mutagenese

S387A	CTATTTAGAAATGGATTATCAG <u>C</u> ACCTCAAACGAGAT
S387E	CTATTTAGAAATGGATTATCAG <u>A</u> ACCTCAAACGAGAT
SS386/387AA	CCCTATTTAGAAATGGATTTAG <u>CAGC</u> ACCTCAAACGAG ATATATCCG
T419A	CCCTGCAGAGGGAG <u>C</u> ATGGTACATCCAG

2.4. Kultivierung eukaryontischer Zellen

HeLa-Zellen wurden in MEM-Medium (Sigma-Aldrich), Hek293T-Zellen in DMEM (Lonza) und Jurkat-Zellen in RPMI-Medium (Sigma-Aldrich) kultiviert. Den Kultivierungsmedien wurden 10% FCS (PAA), 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin hinzugefügt.

2.5. Transfektion eukaryontischer Zellen

Zellen wurden am Tag zuvor so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70-90% aufwiesen. Für die Transfektion mittels Plasmid-DNA wurde für 1×10^5 Zellen 1 μ g DNA mit 50 μ l Opti MEM gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Gleichfalls wurden 3 μ l Fugene 6 Transfektionsreagenz

(Roche) mit 50 μ l Opti MEM (Gibco) kurz inkubiert. Anschließend wurde die DNA in den Ansatz mit Transfektionsreagenz gegeben und das Gemisch wurde für weitere 20 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden für 24 – 72 h in 1ml Kulturmedium mit 1% FCS jedoch ohne weitere Zusätze und dem Transfektionsansatz kultiviert.

Für die Transfektion mittels siRNA wurden Zellen für den Tag der Transfektion 50-70% konfluent ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden 10 nM siRNA mit 50 μ l Opti MEM gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Gleichfalls wurden 1,5 μ l Oligofectamine (Invitrogen) mit 50 μ l Opti MEM gemischt und kurz inkubiert. Danach wurde die siRNA mit dem Transfektionsreagenz gemischt und für weitere 20 min inkubiert. Die zu behandelten Zellen wurden für 24-48 h in 1 ml Kulturmedium mit 1% FCS jedoch ohne Penicillin/Streptomycin und dem Transfektionsansatz kultiviert.

2.6. Synchronisation von Zellen

25% konfluente HeLa Zellen wurden mit 2 mM Thymidin (Sigma) für 19 h kultiviert. Nach 3x waschen in PBS wurden die Zellen für weitere 9 h in frischem Medium kultiviert und anschließend ein zweites Mal für 16 h mit 2 mM Thymidin inkubiert. Nach 16 h Inkubation wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit frischem Medium in die entsprechenden Zellzyklusphasen entlassen.

Zur Anreicherung von Zellen in der G₂/M Phase wurde diese 80% konfluent ausgesät und mit 50 ng/ μ l Nocodazol für 16 h inkubiert. Danach wurden die abgerundeten Zellen durch vorsichtiges abschütteln von der Kulturschale („mitotic shake off“) in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 2x mit PBS gewaschen und für weitere Analysen herangezogen. Adhärenente Zellen wurden verworfen.

2.7. Analyse der Zellzyklusphasen mittels Propidiumiodid

Adhärente Zellen wurden mit PBS gewaschen und danach mit Trypsin-EDTA (Invitrogen) vom Boden der Kulturschale gelöst. Anschließend wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und in 50 µl kaltes PBS resuspendiert. Während dem langsamen und gleichmäßigem Vortexen wurden den Zellen 450 µl eiskaltes 70% Ethanol zugegeben. Die Zellen wurden nun für mindestens 30 min 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (5 min 800 g) und für 30 min 37 °C in 1 mg/ml RNase A und 100 µg/ml Propidiumiodid inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse an einem FACScan Durchflußzytometer mittels CellQuest Software (Becton Dickinson).

3.

3.1. Generierung stabiler Zelllinien

Zum partiellen Knockdown mittels RNA-Interferenz wurden adhärente HeLa Zellen mit konstitutiv exprimierenden shRNA-Vektoren stabil transfiziert. Hierzu wurden 5×10^6 Zellen ausgesät, mit 1 µg Plasmid-DNA transfiziert und am nächsten Tag mit 1.5 µg/ml G418 (PAA) für 2 Wochen selektioniert. Anschließend wurden die Klone auf einer 48 Well Kulturschale so ausgesät, dass statistisch pro Well nur ein Klon wuchs. Nachdem ca. 1×10^5 Zellen kultiviert worden waren, wurden die Zellen analysiert. Klone mit einem Knockdown von 80-90% wurden für weitere Experimente herangezogen.

3.2. SDS Gelelektrophorese

1×10^5 Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturschale gelöst, für 1 min bei 1500 g sedimentiert, 1x mit PBS (PAA) gewaschen und in 100 µl Lysis-Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 50 mM β Glycerophosphat, 10% Glycerin und 1x Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) resuspendiert. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis lysiert und anschließend für 5 min bei 16000 g sedimentiert. 20 – 50µg Proteinlysate

wurden mit 2x SDS Laemmli Puffer (150 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% Glycerol, 4% SDS, 10% beta-Mercaptoethanol, 0.1% Orange-G) versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. 10-30 µg Zelllysate wurden auf ein 10%-iges Polyacrylamidgel geladen und für 1 h konstant bei 160 V in einer Mini-Protean Kammer (Biorad) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel auf eine mit Methanol aktivierte PVDF-Membran (Roth) in Towbin-Blotpuffer (25 mM Tris-base, 250 mM Glycin, 0.05% SDS, 20% Methanol) bei konstanten 300 mA für 1 h in einer Mini Blotapparatur (Biorad) geblottet. Das Blocken unspezifischer Antikörper-Bindestellen erfolgte für 30 min in TBST BSA (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, 5% BSA). Danach wurde die Membran für eine Stunde in einer geeigneten Verdünnung des Erst-Antikörpers in Blocking-Puffer für 1h bei RT inkubiert. Nach 2x waschen mit TBST („Tris-Bufferd-Saline-Tween“, TBST) schloss sich hiernach für 30 min die Behandlung mit HRP-gekoppeltem Zweit Antikörper („horseradish peroxidase“, HRP) an. Die Membran wurde nun 4x mit TBST jeweils 5 min gewaschen und anschließend mit Chemilumineszenz-Lösung (Pierce) oder Homemade-ECL (Lösung A: 100 mM Tris-HCl pH 8.6, 1.4 mM Luminol, B: 10 ml DMSO, 0.0335 mM p-Coumarinsäure; 1 ml A + 100 µl B + 0.3 µl 30% H₂O₂) für 1 min inkubiert. Die Signale wurden mittels Röntgenfilm Fujifilm Super RK (Fuji) oder Hyperfilm ECL (Amersham) detektiert.

3.3. Coimmunpräzipitation

1x 10⁷ Zellen wurden in 1ml IP-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 10% Glycerol, 0.5% NP-40) lysiert und 1 mg Lysat wurde mit 5 µg Antikörper gemischt und für 1 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl A/G-Agarose (Santa Cruz) wurde für eine weitere Stunde rotierend inkubiert. Das Coimmunpräzipitat wurde sedimentiert, der Überstand verworfen und 3x mit IP-Puffer gewaschen (vortexen). Anschließend wurden die Coimmun Komplexe in 30 µl 2x SDS Laemmli Puffer für 5 min bei 95 °C inkubiert

und einer SDS Gelelektrophorese (SDS „polyacrylamide-gelelectrophoresis“, SDS PAGE) unterzogen.

3.4. Kinase Assay

Zur Durchführung eines *in vitro* Kinase Assays wurden 100 ng bakteriell exprimiertes Procaspase 8 GST Fusionsprotein zusammen mit Cdk1 Cyclin B1 (Fa. Biomol) unter Zugabe von 0.05 mM ATP sowie 1 μ Ci [γ 32P]ATP (3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia) für 30 min bei einer Temperatur von 30 °C in Cdk1 Puffer (Fa. NEB) inkubiert. Die Proben wurden anschließend mittels SDS Gelelektrophorese aufgetrennt und einer Autoradiographie unterzogen.

3.5. Phosphoaminosäureanalyse

Zur Analyse des Phosphostatus einer bestimmten Aminosäure innerhalb des zu untersuchenden Proteins wurde bakteriell exprimiertes GST Fusionsprotein einem Kinase Assay mit Cdk1/Cyclin B1 unterzogen und mittels Autoradiographie analysiert. Die korrespondierende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, das Gelstück in einem Reaktionsgefäß zerkleinert und für 3 h bei 110°C in 200 μ l 6 N HCl hydrolysiert. Danach wurde das Reaktionsgemisch im Dampfsterilisator eingetrocknet und in 10 μ l H₂O resuspendiert. 5 μ l der Proben wurden mit einem Phosphoaminosäure Markergemisch (p Thr, p Tyr und p Ser) auf eine Dünnschichtchromatographie Folie (Fa. Merck) parallel aufgebracht und einer eindimensionalen Dünnschichtchromatographie für 60 min in DC Puffer (5 ml Pyridin, 50 ml Essigsäure und 945 ml H₂O) unterzogen. Nachdem die Folie getrocknet worden war, wurde das Marker Gemisch mit Ninhydrin Spray sichtbar gemacht und die aufgetrennten Phosphoaminosäuren wurden mittels Autoradiographie analysiert.

3.6. Präparation von Plasmid-DNA für den Restriktionsverdau

E. coli Bakterienzellen wurden in 5 ml selektiven LB Medium bei 37 °C über Nacht unter Schütteln inkubiert und am nächsten Tag für 1 min bei 16000 g sedimentiert. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer I (50 mM TrisHCl pH 8.0, 10 mM EDTA, Lagerung 4 °C) bei RT resuspendiert. Die Bakterien wurden unter Zugabe von 250 µl Puffer II (0.2 M NaOH, 1% SDS) (10x vorsichtig invertieren) für 1 min bei RT lysiert und anschließend zum Ausfällen der Proteine sowie der genomischen Plasmid-DNA mit 350 µl Puffer III (8 M Guanidin-HCl, 0.5 M Kaliumacetat, ½ Vol pH 4.2 einstellen und mit Wasser auffüllen, Lagerung 4 °C) versetzt und 10x vorsichtig invertiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde die Nukleinsäurelösung für 10 min bei 16000 g von den Proteinen getrennt. Der Überstand wurde mit 100 µl MSKAT-Puffer (4 mM MgCl₂, 2 M Natriumacetat, 33 mM Kaliumchlorid, 20 mM Ammoniumsulfat und 0.4 M Tris-HCl pH 8.0) versetzt. Unter Zugabe von 700 µl eiskaltem 100% Ethanol wurden die Nukleinsäuren für 5 min bei RT gefällt. Anschließend wurden die Nukleinsäuren für 1 min bei 16000 g RT sedimentiert und danach mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde unter Vakuum getrocknet und in 50 µl Wasser resuspendiert. Optional wurde zur Beseitigung störender RNAs die Lösung für 15 min bei 65 °C mit 10 µg/ml RNase A (Sigma) versetzt.

3.7. Präparation von Plasmid DNA

Zu Zwecken des molekularen Klonierens, der Sequenzierung oder der Transfektion eukaryontischer Zellen wurde die Plasmid DNA mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) laut Herstellerangaben präpariert.

3.8. Isolierung von Nukleinsäuren durch modifizierte Phenol Chloroform Extraktion

Die Nukleinsäurelösung (PCR, Restriktionsverdau) wurde 1:1 mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1 pH 8.0 (Sigma-Aldrich)) vermischt. Für

1 min bei 16000 g wurde die Phasentrennung vollzogen. Die obere Phase wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1/50 Vol MSKAT-Puffer vermischt und mit 5 Vol eiskaltem EtOH wurden die Nukleinsäuren für 5 min bei RT gefällt. Danach wurden die Nukleinsäuren für 1 min 16000 g sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen und für 1 min im Dampfsterilisator getrocknet. Das Pellet wurde nun in 50 µl H₂O resuspendiert. Anschließend wurde mittels Photometer die Konzentration bestimmt.

3.9. Isolierung humaner chromosomaler DNA

Zur Kontrolle der in eukaryontischen Zellen stabil transfizierten shRNA-Kassetten wurde die genomische DNA isoliert und mittels PCR wurde die Integration der shRNA Kassetten kontrolliert. 1×10^5 Zellen wurden mittels Zellschaber von der Kulturschale gelöst, für 1 min bei 1500 g sedimentiert und in 100 µl Lyse Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 0.1 M EDTA, 0.2 % SDS, 10 mg/ml RNaseA (Qiagen)) für 10 min bei 60 °C lysiert. Anschließend wurde Proteinase K (Fermentas) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben und für weitere 60 min bei 60 °C inkubiert. Danach wurde die genomische DNA mittels modifizierter Phenol Chloroform Extraktion (Abschnitt 2.16) isoliert.

3.10. Polymerase"Kettenreaktion

Zur Amplifikation von PCR-Produkten aus cDNA („complementary“ DNA) sowie aus Plasmid-DNA wurde Go Taq DNA-Polymerase (Promega) verwendet. Zur Erst-Amplifikation von cDNA als auch zur gerichteten Mutagenese („Site-Directed-Mutagenesis“) wurde Pfu Ultra II DNA-Polymerase (Sratagene) benutzt. In einigen Fällen wurde zur Überprüfung rekombinanter Bakterienklone Red Taq DNA Polymerase (Sigma) verwendet. Dazu wurde ein Klon mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agar-Platte in 50 µl H₂O resuspendiert. 1%

dieser Lösung wurde dann als Ausgangsmaterial („template“) in die PCR-Reaktion eingesetzt.

3.11. Standard Klonierungsprozedur

1 μg Plasmid-DNA wurde 2x für 10 min, hingegen 1 μg PCR-Produkt 2x für 30 min mit den jeweiligen Enzymen (Fermentas) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mittels modifizierter Phenol-Chloroform-Extraktion (Abschnitt 2.16) aufgereinigt und im Verhältnis Vektor : Insert = 1 : 3 mit T4 DNA Ligase in Quick-Ligasepuffer (NEB) für 5 min bei RT ligiert. 5 μl der Ligation wurden anschließend in kompetente Bakterienzellen transformiert.

3.12. RNA Isolation

1 $\times 10^5$ Zellen wurden in 200 μl Wasser resuspendiert und mit 800 μl Trizol (Invitrogen) gemischt. Nach Zugabe von 200 μl Chloroform und einer Inkubation von 5 min bei RT wurden die unterschiedlichen Phasen durch Zentrifugation von 10 min bei 16000 g voneinander getrennt. Die obere Phase wurde vorsichtig überführt und mit 50 μl MSKAT Puffer und 1 ml eiskaltem 100% EtOH für 10 min bei RT inkubiert. Die RNA wurde anschließend für 1 min bei 16000 g sedimentiert mit 500 μl 70% eiskaltem Ethanol gewaschen, im Dampfsterilisator getrocknet und in 50 μl H₂O resuspendiert.

3.13. Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Bakterienzellen wurden für 16 h bei 37 °C im Schüttelschrank in 5 ml selektiven LB Medium kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Kultur in einem Verdünnungsverhältnis von 1:100 in 100 ml SOB Medium (Roth) mit je 5 ml 2 M MgSO₄ und 5 ml 2 M MgCl₂ versetzt und bis zum Erreichen einer OD₅₅₀ von 0.48 im Inkubationsschrank unter ständigem Schütteln bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurde die Kultur für 15 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien

wurden für 5 min bei 6000 g sedimentiert, in 40 ml kalten TFBI Puffer (30 mM Kaliumacetat, 100 mM Rubidiumchlorid, 10 mM Calciumchlorid, 50 mM Manganchlorid, 15% Glycerol) resuspendiert und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Nun wurde die Kultur erneut sedimentiert und für 15 min bei 4 °C in TFBII Puffer (10 mM MOPS, 75 mM Kalziumchlorid, 10 mM Rubidiumchlorid, 15% Glycerol) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien aliquotiert und zur Lagerung bei -80 °C weggefroren.

3.14. Transformation von Bakterienzellen

5 µl eines Ligationsansatzes oder 10 pg Plasmid DNA wurden mit 50 µl auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterienzellen für 5min bei 4 °C inkubiert, einem 30 s andauernden Hitzeschock bei 37 °C unterzogen und anschließend für 45 min bei 37 °C im Bakterieneschüttler inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 1min bei 16000 g sedimentiert, der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 100 µl LB Medium resuspendiert und auf LB Agar Platten ausplattiert. Die LB Agarplatten wurden für 16 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.15. Präparation von GST Fusionsproteinen

Bakterienzellen (BL21) wurden mit einem Vektor zur bakteriellen GST Fusionsproteinexpression transformiert und bei 37 °C über Nacht auf LB Agarplatten kultiviert. Ein Klon wurde dann in 5 ml selektiven LB Medium über Nacht kultiviert und am nächsten Morgen 1:100 in frisches selektives LB-Medium überführt. Nach 1.15 h wurde die bakterielle Proteinsynthese mit 1 mM IPTG (Applichem) induziert und die Bakterien wurden für weitere 2 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 5 min bei 6000 g sedimentiert, mit 5 ml NENTG Puffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 10% Glycerol) resuspendiert. Anschließend wurden 100 mg/ml Lysozym, Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) und 70 KU Benzonase (Novagen) zugegeben. Nach dreimaligem Auftauen (37°C) und

Einfrieren (-170°C) wurde das Gemisch für 20 min bei 16000 g sedimentiert. 500 µl vom Lysat wurden für 30 min bei 4 °C an 25 µl Glutathione-Sepharose-Beads gekoppelt, dreimal mit NENTG Puffer gewaschen und danach in 25 µl NENTG Puffer resuspendiert.

3.16. GST Pull Down

1×10^7 293T Zellen wurden in 1 ml IP-Puffer (20 mM Tris-Hcl pH 7.6, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 10% Glycerol, 0.5% NP-40) lysiert. Um eukaryontische Proteine zu entfernen, die unspezifisch an den Glutathione-Sepharose-Beads binden könnten, wurde das 293T Zelllysate mit 50 µl Glutathione-Sepharose-Beads (Amersham) inkubiert. Zur Bindung der GST Fusionsproteine (wie unter 2.22 beschrieben) mit möglichen Bindungspartnern wurde das 293T Zelllysate mit 1 µg bakteriell exprimiertem GST Fusionsprotein für 1 h bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Anschließend wurden die Immunkomplexe für 1 min bei 800 g sedimentiert, dreimal mit IP Puffer gewaschen und einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen.

3.17. Bioinformatische Methoden

Methoden	URL
DNA Restriktion	http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php
Primer	http://www.operon.com/technical/toolkit.aspx
Sequenz-Konvertierung	http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/readseq/
DNA"Sequence Alignment	http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html
Reverse Complement	http://www.bioinformatics.org/sms/
Proteomics	http://www.expasy.org/
Protein" Sequence"Alignment	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/
Phosphorylierungs-Vorhersage	http://predikin.biosci.uq.edu.au/pkr/
Phospho-Scan	http://scansite.mit.edu/
shRNA-Vorhersage	http://molgyn.kgu.de

3.18. Sonstige Software

Abbildungen wurden mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop CS3 angefertigt. Die Beschriftungen der Abbildungen sowie die schematischen Darstellungen wurden mit dem Vektorgrafikprogramm Adobe Illustrator CS3 erstellt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Die potentielle Cdk1/Cyclin B1-Phosphorylierungsstelle in Procaspase-8.

Elegante Bindungsstudien haben gezeigt, dass die Polo-Box-Domäne von Plk1 an vorphosphorylierte Substrate bindet (68, 69). Diese Substrate werden in den meisten Fällen von weiteren Zellzyklus-Kinasen, wie zum Beispiel Cdk1/Cyclin B1, vorphosphoryliert, sodass anschließend Plk1 an seine Substrate bindet und diese dann selbst phosphoryliert. Insbesondere das sogenannte PBD-Bindungsmotiv, welches im Allgemeinen dem Muster: X-S-[S/T]-[P/X] entspricht, konnte von Elia und seinen Mitarbeitern identifiziert werden. Ausgehend von diesen Studien und den zusätzlich bekannten Plk1(PBD)-Bindungsstellen identifizierter Plk1-Substrate, wurde ein modifiziertes Muster (Abbildung 3-1A) abgeleitet und als Grundlage für eine Mustersuche („Pattern Matching“) verwendet. Dieses Muster wurde unter Einbeziehung folgender Parameter: Taxonomie = Homo Sapiens und Beschreibung = Protease mit der ScanProsite-Software gegen die UniProtKB/Swiss-Prot-Datenbank (Proteindatenbank) aligniert. Als Ergebnis lieferte die Suche 17 Treffer, wovon einer Procaspase 8 war (Abbildung 3-1B). Eine potentielle Cdk1/Cyclin B1 Phosphorylierungsstelle in Procaspase-8 (Ser-387) liegt in unmittelbarer Nähe zu den zwei Spaltstellen Asp 374 und Asp 384 zwischen den Subdomänen p18 und p10 (Abbildung 3-1C). Daher stellte sich die Frage, ob Cdk1/Cyclin B1 als bekannte „Priming“-Kinase für Plk1, die darin vorkommenden Serine phosphoryliert. Wenn es Indizien für eine Interaktion von Cdk1/Cyclin B1 mit Procaspase 8 gibt, hat diese Interaktion auch funktionellen Einfluss? Zusammenfassend zeigten diese ersten bioinformatischen Untersuchungen, dass sich innerhalb der katalytischen Domäne von Procaspase-8 eine PBD(Plk1)-Bindungsstelle befindet, welche möglicherweise von Cdk1/Cyclin B1 vorphosphoryliert wird und dadurch Procaspase 8 funktionell

beeinflussen könnte. Diese Hypothesen galt es in den weiterführenden Experimenten zu untersuchen.

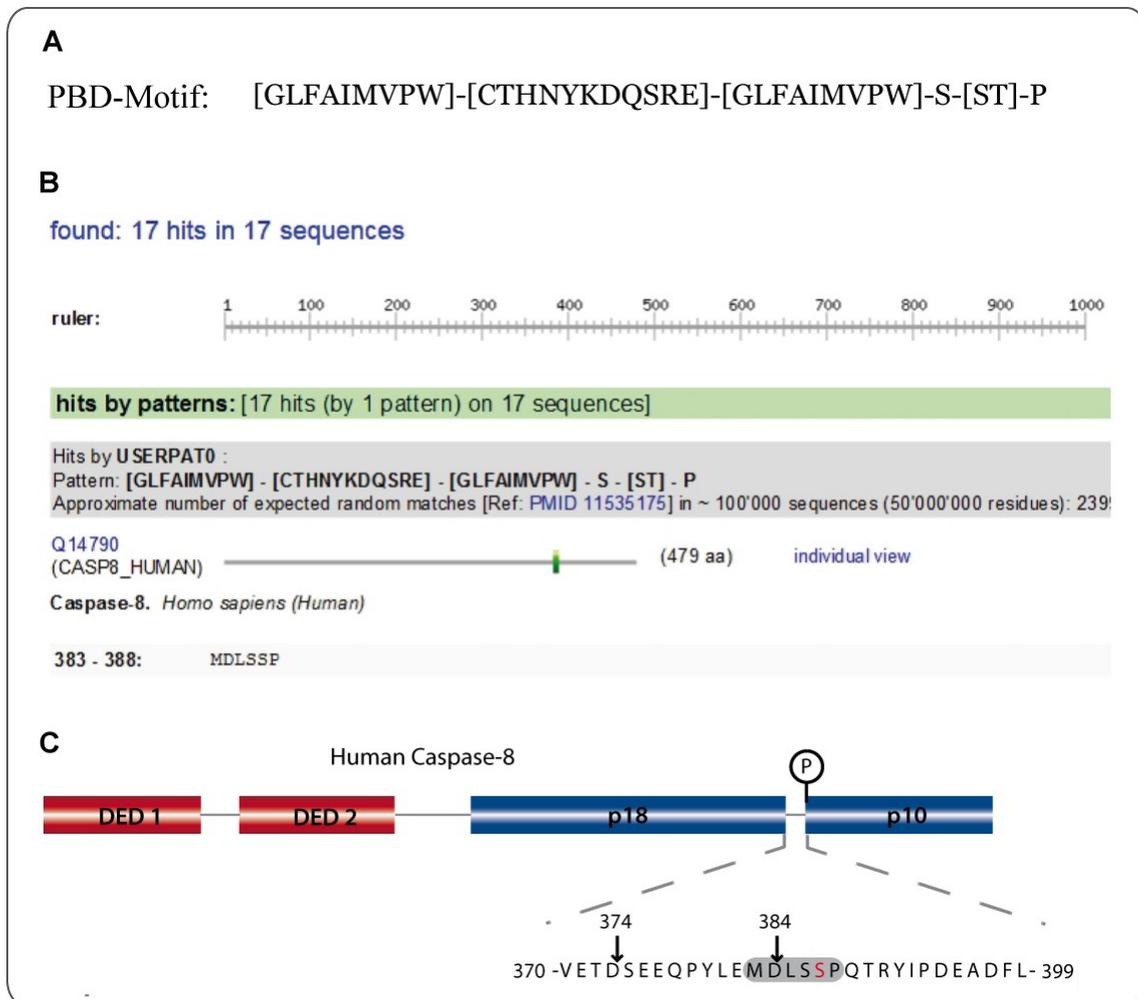


Abbildung 3 . Die Cdk1/Cyclin B1 Phosphorylierungsstelle in Procaspase-8.

(A) Die Sequenz für die Mustersuche besteht aus fünf Aminosäure Modulen. Das erste Modul umfasst vor allem hydrophobe und kleine Aminosäuren. Im zweiten Modul sind hingegen nukleophile, basische, polare und saure Aminosäuren zu finden. Das dritte Modul entspricht wieder dem ersten Modul, gefolgt von einem Serin, einem weiteren Serin oder Threonin und abschließend einem Prolin.

(B) Das Muster findet sich in der Schlüsselprotease des extrinsischen Signalweges, der Procaspase-8. Die Mustersuche gegen die Proteindatenbank UniProtKB/Swiss-Prot lieferte 17 Treffer. Die Suche wurde anhand der

Beschränkung auf humane Proteasen stark eingegrenzt. Hier dargestellt ist der erste Treffer, Procaspase-8, der das gesuchte Muster genau einmal aufweist.

(C) Schematische Darstellung von Procaspase-8. Die aminoterminaler DE Domäne ist für die Proteininteraktion mit dem Adaptormolekül FADD und dem Fas/CD95-Rezeptor zuständig. Diese Interaktion führt zur Ausbildung des „Death-Inducing-Signaling-Complex“ (DISC) und zur proteolytischen Aktivierung von Procaspase-8. Die carboxyterminale Domäne besteht aus der p18 und der p10-Untereinheit welche nach Aktivierung ein Heterotetramer ausbilden (p18/p10/p10/p18). Durch die autokatalytische Spaltung an Asp 374 (p12) und Asp 384 p(10) wird die Aktivierung von Procaspase-8 eingeleitet. Die zweite autokatalytische Spaltung findet an Asp 216 statt, wodurch p18 abgespalten wird. Das PBD-Bindungsmotiv befindet in unmittelbarer Nähe der p10-Spaltstelle. Ser 387 (rot markiert) kommt als mögliche Phosphorylierungsstelle von Cdk1/Cyclin B1 in Frage.

4.2. Die Fas/CD95-Rezeptor vermittelte Apoptose wird in der Mitose blockiert.

In neueren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Zellzyklus-Kinasen während der Mitose, der Zelle eine Schutzfunktion gegen intrinsische apoptotische Stimuli verschaffen können (61). Durch gezielte Phosphorylierung von Caspase-9 durch Cdk1/Cyclin B1 wird die Aktivierung von Caspase-9 am Apoptosom inhibiert. Zusätzlich konnten Forschungsarbeiten zum extrinsischen Apoptoseweg zeigen, dass auch hier Kinasen regulatorischen Einfluss ausüben (63). Durch die Phosphorylierung von Procaspase-8 an Tyr-380 durch Src-Kinase nimmt eine Tyrosin Kinase regulatorischen Einfluss auf den extrinsischen Apoptoseweg. Insbesondere bei Darmkrebs, wo Src konstitutiv aktiv ist, inhibiert die Phosphorylierung von Procaspase 8 an Tyr 380 durch Src die Apoptose und reguliert damit die Tumorprogression (63). Der Einfluss mitotischer Kinasen auf den extrinsischen Apoptose Signalweg wurde jedoch bisher noch nicht studiert.

Um zu untersuchen, ob Krebszellen während der Mitose, den extrinsischen Apoptoseweg beeinflussen können, wurden HeLa-Zellen mittels Doppel-Thymidin-Block zu Beginn der S Phase synchronisiert und in frisches Medium entlassen (Abbildung 3-2A, „Release“). Um zu bestimmen, zu welchem Zeitpunkt sich die meisten Zellen in der G₂/M Phase befinden, wurde nach 7, 8 und 9 h jeweils ein Zellzyklus Profil erstellt (Abbildung 3 2D). Während bereits nach 7 h 35% der Zellen G₂/M erreicht hatten, befanden sich 8 h nach Release 81% der Zellen in G₂/M (Abbildung 3 2D). Somit erstreckte sich nach diesem Versuchsprotokoll die Mitose im Zeitraum von 7 9 h. Daher wurden die Zellen unmittelbar vor Eintritt in die Mitose (6h nach Release) mit einem Antikörper gegen den Fas-Rezeptor für die angegebene Dauer stimuliert (Abbildung 3-2A). Die Messung der Apoptose erfolgte über den Nachweis der Spaltung von PARP (Poly (ADP-ribose) Polymerase), das nach apoptotischen Stimuli in zwei Subfragmente (p115 -> p89 und p26) gespalten wird (Abbildung 3 2B, oberes Panel). Nach der Autoaktivierung von Procaspase 8 kommt es zur Spaltung von Caspase 3 durch Caspase 8, das wiederum PARP an Asp-214 spaltet und somit die aminoternale DNA Bindedomäne (p26) von der carboxyterminalen katalytischen Domäne (p89) trennt. Diese Spaltfragmente lassen sich mit kommerziell erhältlichen Antikörpern nachweisen.

Während bei nichtsynchronisierten HeLa Zellen nach Apoptose-Stimulation eine deutliche PARP-Spaltung nachzuweisen war (Abbildung 3-2B, Spur 1-3), zeigten die synchronisierten, mitotischen Zellen nach Stimulation deutlich weniger PARP Spaltung (Abbildung 3-2B, Spur 7-9). Unbehandelte Zellen zeigten erwartungsgemäß keine PARP-Spaltung (Abbildung 3-2B; Spur 4-6). Insbesondere hohe Mengen an Procaspase-8 in den mitotischen HeLa-Zellen (Abbildung 3-2B, Spur 4-9) korrelierten mit deutlich weniger PARP Spaltung. Dieser Zusammenhang könnte ein weiteres Indiz dafür sein, dass in der Mitose Procaspase-8 vor Aktivierung geschützt wird. Um zusätzlich zu überprüfen, ob sich HeLa-Zellen im Zeitraum von 7 9 h in der Mitose befanden, wurden verschiedene mitotische Marker-Proteine im Western Blot untersucht. Deutliche erhöhte Mengen an Cyclin B1 als auch phosphoryliertem Histon H3 (Ser 10)

deuteten darauf hin, dass für die Mehrheit der synchronisierten Zellen die Mitose erreicht wurde (Abbildung 3-2B). Wie oben beschrieben, steigt zu Ende der G₂ Phase die Cyclin B1 Expression deutlich an und führt zur Aktivierung des MPF („mitosis-promoting-factor“) und damit zum Start der Mitose. In der Mitose wird Histon H3 an Ser-10, Ser 28 und Thr 11 phosphoryliert und diese Phosphorylierungen führen zur Kondensation der Chromosomen in der M Phase der Mitose. Daher wurden Cyclin B1 als auch phosphoryliertes Histon H3(Ser 10) als Marker im Western Blot für die Mitose verwendet.

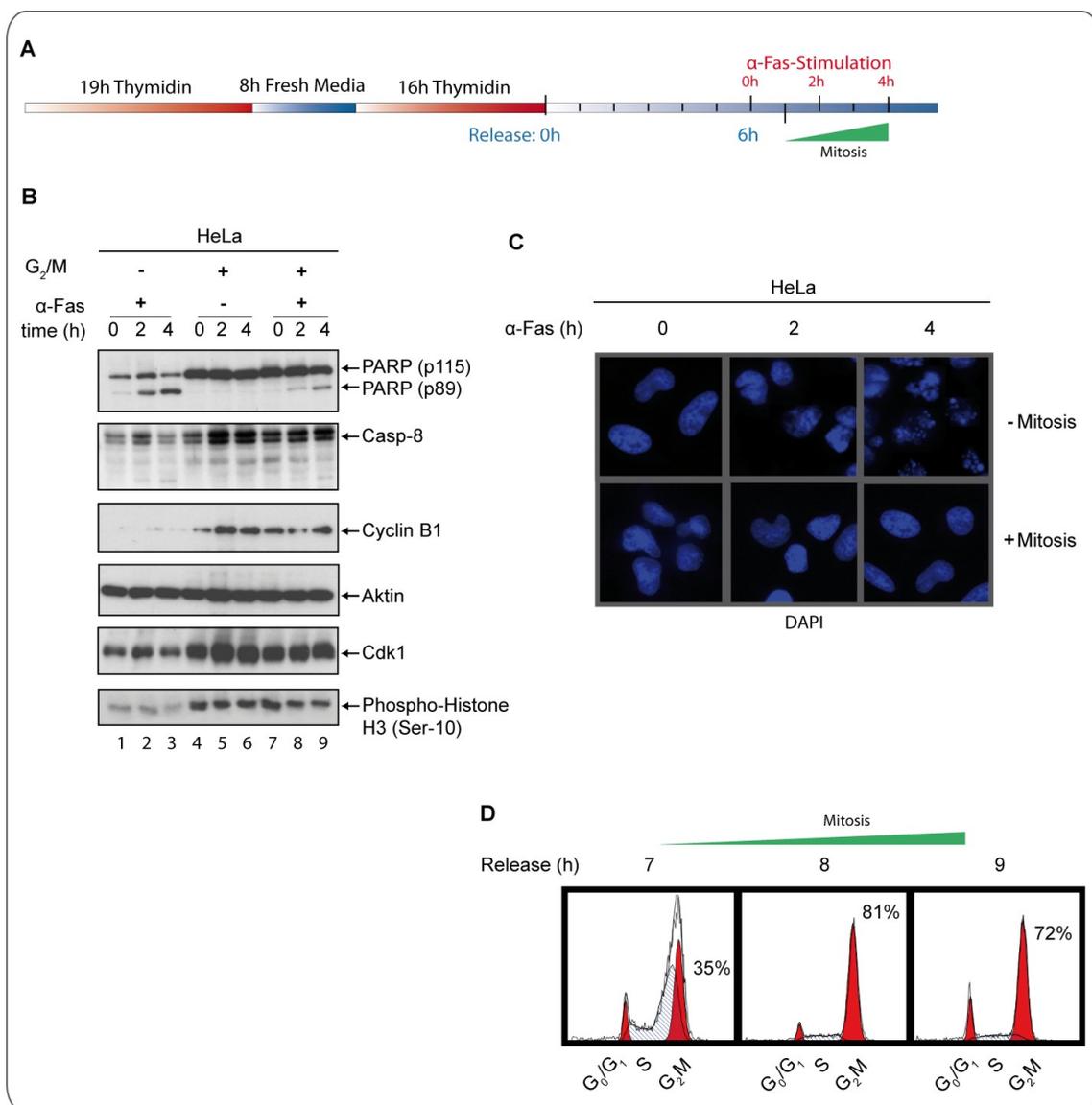


Abbildung 3-2. Mitotische HeLa-Zellen schützen sich vor Fas-vermittelter Apoptose.

(A) Schematische Darstellung der Stimulation von HeLa-Zellen mittels eines Antikörpers gegen den Fas Rezeptor (CD95/Apo-1) nach doppeltem Thymidin-Block zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Fas-Stimulation wurde 6 h nach Release gestartet und die Zellen wurden nach weiteren 2 h und 4 h analysiert.

(B) Unsynchronisierte HeLa-Zellen und synchronisierte HeLa-Zellen wurden zu Beginn der Mitose mit einem Antikörper gegen den Fas-Rezeptor für die gezeigten Zeitpunkte stimuliert und es wurde eine Western-Blot Analyse für Cdk1, Cyclin B1, phosphoryliertes Histon H3, Procaspase-8 und PARP durchgeführt. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin herangezogen.

(C) Unsynchronisierte und synchronisierte HeLa-Zellen wurden zu Beginn der Mitose für die gezeigten Zeitpunkte mit einem Antikörper gegen Fas-Rezeptor(CD95/Apo-1) stimuliert und die DNA wurde mittels DAPI angefärbt.

(D) HeLa Zellen wurden mit einem doppelten Thymidin Block zu Beginn der S Phase synchronisiert und für die gezeigte Dauer in frisches Medium entlassen. Danach wurden die jeweiligen Zellzyklus Phasen mittels FACS analysiert. Die X Achse zeigt den DNA Gehalt und die Y Achse die Zellzahl.

Nachdem mit molekularbiologischen Methoden eine deutlich verringerte extrinsische Apoptose während der Mitose nachgewiesen werden konnte, wurde die Frage gestellt, ob auch anhand des Phänotyps der Zellen eine Verringerung der Apoptose während der Mitose zu beobachten ist. HeLa Zellen wurden mit einem doppelten Thymidin Block synchronisiert und danach in frisches Medium entlassen. 6 h danach wurde die extrinsische Apoptose durch Fas Stimulation ausgelöst und nach 6 h (0 h α Fas), 8h (2 h α Fas) und 10h (4 h α Fas) wurden die DNA Fragmentierung anhand einer DAPI Färbung im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Unsynchronisierte Zellen zeigten bereits nach 2 h Fas Stimulation den apoptotischen Phänotyp der DNA Fragmentierung (Abbildung 3 2C, oben). Nach weiteren 2 h war die DNA der unsynchronisierten Zellen stark fragmentiert. Im Gegensatz dazu war bei der Population der mitotischen Zellen

während des gesamten Zeitraums keine DNA Fragmentierung zu beobachten (Abbildung 3 2C, unten). Dieses Experiment bestätigt, dass bei Krebszellen während der Mitose kaum Apoptose induziert werden kann.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass sich Krebszellen während der Mitose gegen extrinsische, apoptotische Signale schützen.

4.3. Cdk1/Cyclin B1 phosphoryliert Procaspase-8 an Ser 387 in vitro

Nachdem erste bioinformatische Analysen, Western Blot Analysen sowie Experimente zum Nachweis der DNA Fragmentierung auf einen möglichen funktionellen Zusammenhang zwischen Mitose und extrinsischer Apoptose schließen ließen, sollte mittels biochemischer Methoden die Interaktion von Cdk1/Cyclin B1 mit Procaspase-8 genauer untersucht werden. Procaspase-8 (Abbildung 3-3A) wurde aus humaner cDNA kloniert. Davon wurden die einzelnen Subdomänen als GST-Fusionsproteine rekombinant in Bakterien hergestellt, mittels Glutathione-Sepharose-Beads aufgereinigt, in Anwesenheit von γ -³²P-ATP und Cdk1/Cyclin B1 inkubiert und mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 3-3B). Weder die aminoternale Subdomäne (beide DE Domänen) noch die p18-Untereinheit zeigten die Inkorporation von γ -³²P-ATP, wohingegen die p10-Untereinheit deutliche Inkorporation von γ -³²P-ATP aufwies (Abbildung 3-3B). Die korrespondierende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Eine Phosphoaminosäure-Analyse lieferte innerhalb dieses Subfragmentes ein Serin als Phosphorylierungssignal (Abbildung 3-3C).

Um die Cdk1/Cyclin B1-Phosphorylierungsstelle genau zu determinieren, wurde Procaspase 8 mittels gerichteter Mutagenese an Ser 387 zu Alanin respektive Glutaminsäure punktmuiert (S387A und S387E), anschließend in Anwesenheit von γ -³²P-ATP und Cdk1/Cyclin B1 inkubiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Dieser Test zeigte, dass nur auf Procaspase-8 (WT), jedoch kaum auf die

Punktmutanten S387A und S387E ³²P Phosphat übertragen wurde (Abbildung 3 3D, Spur 3-5). Die Kinase Assays mit GST sowie Cdk1/Cyclin B1 ohne GST zeigten erwartungsgemäß keine Signale. Die beiden zusätzlich detektierten Banden oberhalb von Caspase 8 sind beide unspezifisch. Aufgrund der Anfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blue (CBB) ist von einer annähernd gleichen Beladung auszugehen (Abbildung 3-3B und Abbildung 3 3D, beide untere Panel). Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass innerhalb der p10 Untereinheit von Procaspase-8 Ser 387 die Hauptphosphorylierungsstelle für Cdk1/Cyclin B1 in vitro ist.

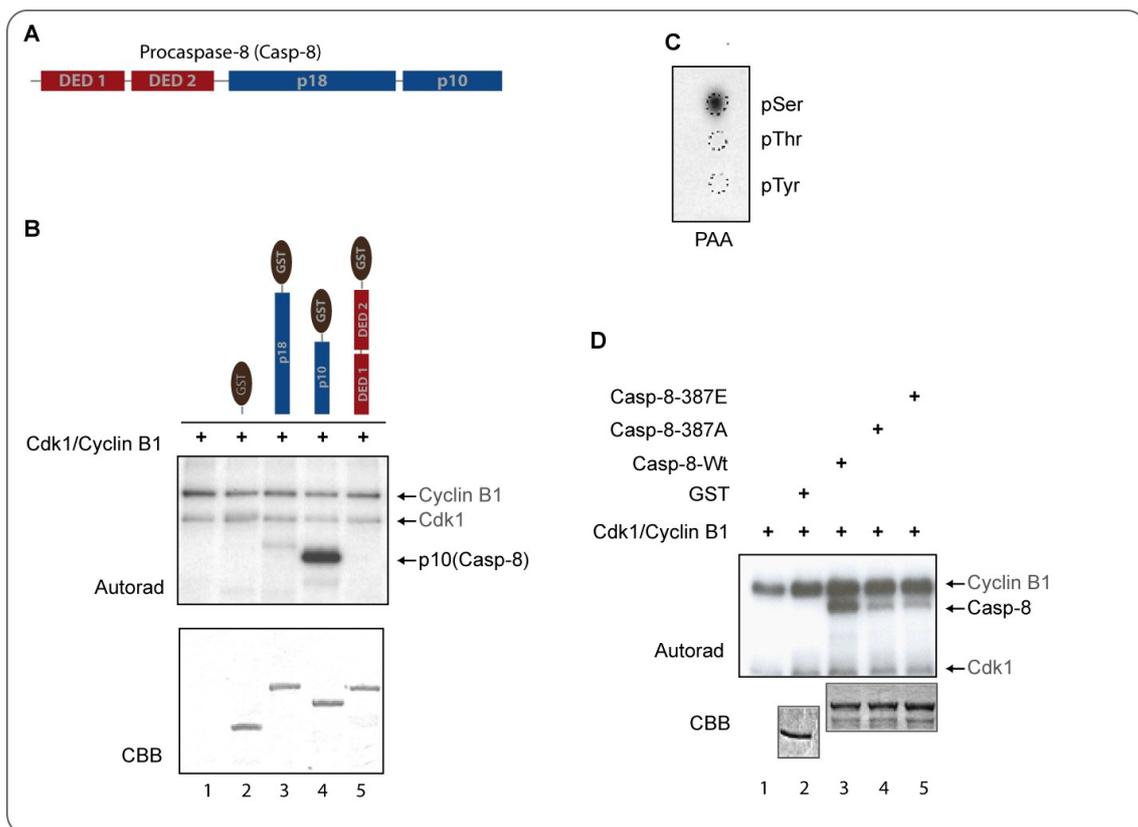


Abbildung 3-3. Cdk1/Cyclin B1 phosphoryliert Procaspase-8 an Ser 387.

(A) Schematische Darstellung der einzelnen Subdomänen von Procaspase-8: NT (2 DEDs), p18 und p10.

(B) Bakteriell exprimierte Subdomänen von Procaspase-8 wurden als GST-Fusionsproteine aufgereinigt, mit Cdk1/Cyclin B1 unter Zugabe von γ -32P-ATP inkubiert und anschließend mittels SDS PAGE analysiert.

(C) Die Bande des korrespondierenden Signals von p10 aus (B) wurde ausgeschnitten und einer Phosphoaminosäure Analyse unterzogen.

(D) Procaspase-8 (WT) und die Punktmutanten (S387A und S387E) wurden bakteriell exprimiert, mittels Glutathione-Sepharose-Beads aufgereinigt und unter Zugabe von γ -32P-ATP mit Cdk1/Cyclin B1 zusammen inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

4.4. Cdk1/Cyclin B1 bindet an die DE Domäne von Procaspase-8 in vitro und in vivo

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Procaspase-8 von Cdk1/Cyclin B1 an Ser 387 in vitro phosphoryliert wird, stellte sich die Frage, ob es weitere Hinweise für eine Interaktion beider Proteine gibt. Dieser Frage nachgehend, wurde Procaspase-8 zuerst in eine N-terminale (NT) als auch in eine C-terminale (CT) Subdomäne unterteilt, zusammen mit dem Wildtyp (WT) als GST-Fusionsproteine in Bakterien exprimiert und aufgereinigt (GST Caspase 8 gebunden an Glutathione-Sepharose-Beads). HEK 293T Zellen („human embryonic kidney“, HEK) wurden mit einem 3xFlag-Cdk1 überexprimierenden Vektor transfiziert und 48 h später lysiert. Die Lysate wurden zusammen mit den jeweiligen an Glutathione Sepharose Beads gekoppelten GST Caspase 8-Konstrukten inkubiert und es wurde untersucht, ob überexprimiertes 3xFlag markiertes Cdk1 mit Caspase 8 assoziiert. Die Analyse des GST-Pulldowns mittels SDS-PAGE zeigte, dass Cdk1 nicht von allen Caspase 8 Subdomänen präzipitiert wurde (Abbildung 3 4A). Die stärkste Interaktion von Caspase 8 mit Cdk1 fand über den aminoterminalen Bereich (NT) von Caspase 8 statt (Abbildung 3-4A, Spur 4) wobei das

Gesamtprotein (WT) etwas schwächer mit Cdk1 assoziierte (Abbildung 3-4A, Spur 3). Keine Assoziation hingegen fand mit der carboxyterminalen Domäne von Caspase 8 statt (Abbildung 3-4A, Spur 5).

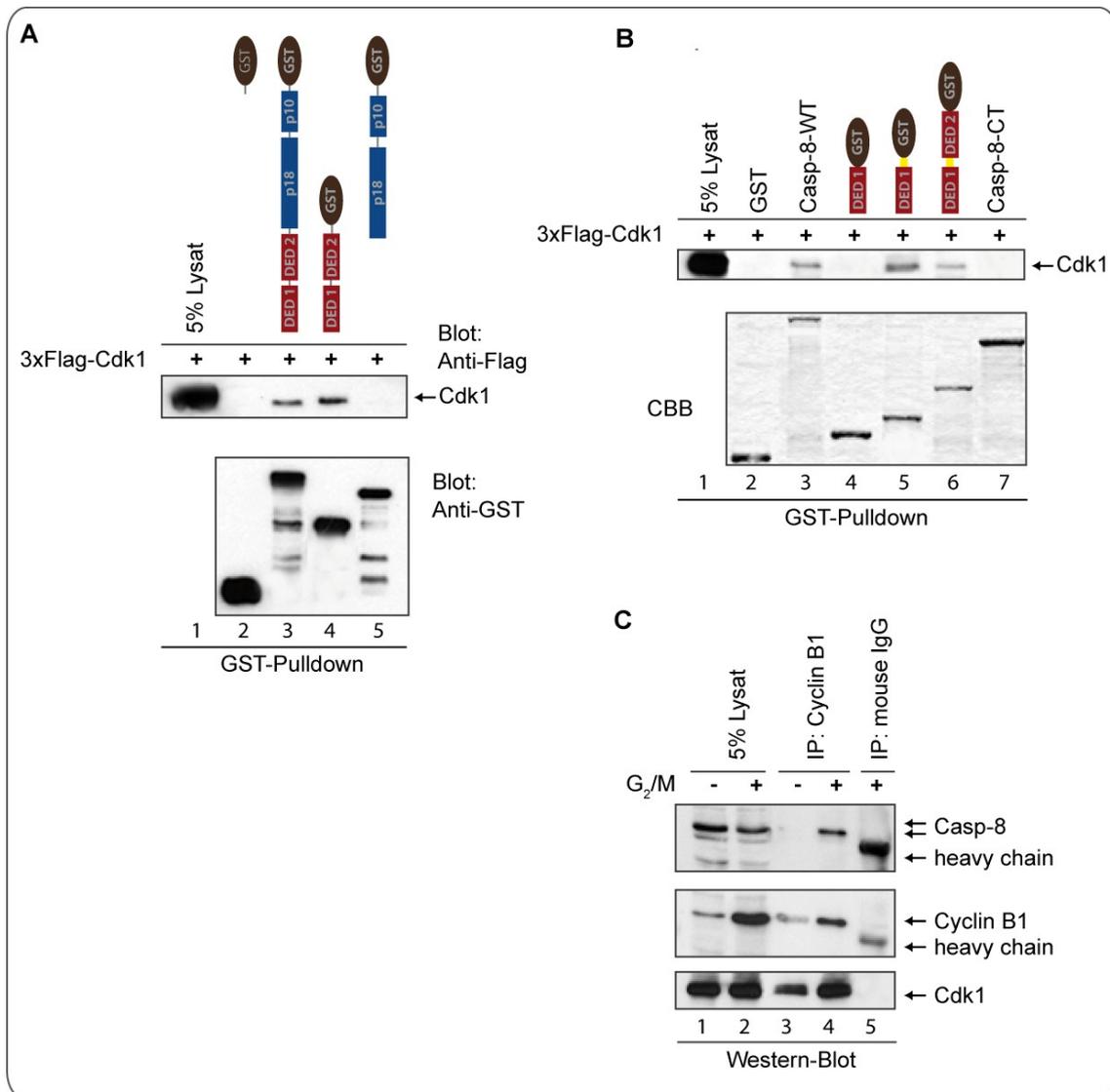


Abbildung 3-4. Cdk1/Cyclin B1 assoziiert mit Procaspase-8 *in vitro* und in humanen Zellen.

(A) und (B) Verschiedene humane GST Caspase 8-Fusionskonstrukte wurden bakteriell exprimiert und an Glutathione Sepharose-Beads gekoppelt. Humanes 3xFlag-markiertes Cdk1 wurde in 293T-Zellen überexprimiert und 48 h später lysiert. Die an Glutathione-Sepharose-Beads gekoppelten GST Caspase 8-Fusionskonstrukte wurden zusammen mit den 293T-Zelllysaten bei 4 °C über

Nacht in IP Puffer inkubiert und anschließend wurden die Präzipitate gewaschen und mittels SDS-PAGE analysiert.

(C) HeLa Zellen wurden für 16 h mit 50 nM Nocodazole in der G₂/M-Phase angereichert. HeLa Zellen wurden bei 4 °C für 16 h mit Cyclin B1-Antikörper oder als Kontrolle mit Immunsereum (mouse IgG) inkubiert. Die Immunkomplexe wurden an A/G Agarose Beads gekoppelt, mit IP Puffer gewaschen und mittels SDS-PAGE analysiert.

Um die Assoziation von Cdk1 mit Procaspase 8 genau zu charakterisieren, wurde die aminoternale Domäne von Procaspase-8 in drei unterschiedliche Bereiche unterteilt: a) die erste DE Domäne (DED 1) ohne Linker-Region, b) DED 1 mit Linker-Region und c) beide DEDs (Abbildung 3-4B). Die verschiedenen Fusionsproteine wurden bakteriell hergestellt, mittels Glutathione-Sepharose-Beads aufgereinigt und in NENTG Puffer resuspendiert. 3xFlag-markiertes Cdk1 wurde in HEK 293T Zellen für 48 h überexprimiert, anschließend lysiert und dieses Lysat wurde zusammen mit den an Glutathione-Sepharose-Beads gekoppelten GST Caspase 8 Fusionsproteine über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Glutathione Beads aus dem Zellysat gereinigt und mittels SDS PAGE analysiert. Interaktionen von 3xFlag Cdk1 waren neben dem Gesamtprotein von Caspase-8 (Abbildung 3-4B, Spur 3) zusätzlich mit den beiden DE Domänen mit der Linkerregion nachweisbar (Abbildung 3-4B, Spur 5 und 6). Interessanterweise zeigte dieses Experiment keine Assoziation von 3xFlag-Cdk1 mit der ersten DE Domäne von Caspase 8, die keine Linkerregion enthielt (Abbildung 3-4B, Spur 4). Zusammenfassend ergaben diese Interaktionsstudien, dass die Bindung von Cdk1 und Caspase 8 über die DE Domäne, speziell über die Linker-Region innerhalb der beiden DE Domänen vermittelt wird.

Um die Interaktion beider Proteine in vivo zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mittels Nocodazol in G₂/M angereichert. Die regulatorische Untereinheit,

Cyclin B1, bindet unmittelbar vor Eintritt in die Mitose an die katalytische Untereinheit Cdk1 und aktiviert somit die Kinase-Funktion von Cdk1 (siehe Abschnitt 1.7). Durch Verwendung von Cyclin B1 spezifischen Antikörpern wurde mitotisch aktives Cdk1/Cyclin B1 präzipitiert. Lysate von synchronisierten HeLa-Zellen wurden deshalb mittels Cyclin B1-Antikörper immunpräzipitiert, an A/G Agarose gekoppelt und durch SDS-PAGE analysiert. Eine deutliche Assoziation von Cdk1/Cyclin B1 mit Caspase 8 konnte nur bei den synchronisierten Zellen (Abbildung 3-4C, Spur 4 oberes Panel) nachgewiesen werden. In unsynchronisierten HeLa Zellen konnte hingegen keine Interaktion nachgewiesen werden (Abbildung 3-4C, Spur 3 oberes Panel). Die Immunpräzipitation von Cyclin B1 in G₂/M hat gezeigt, dass in der Mitose Cdk1/Cyclin B1 an Caspase-8 bindet.

4.5. Der Phospho-Antikörper pAB-Casp8/S387 erkennt spezifisch phosphorylierte Procaspase-8

Nachdem erste Hinweise auf eine Phosphorylierung von Procaspase 8 durch Cdk1/Cyclin B1 in der Mitose hindeuteten, stellten wir uns die Frage, nach der Kinetik und der Funktion dieser Interaktion *in vivo*. Um dieser Frage im Detail nachzugehen, wurde ein phosphospezifischer Antikörper gegen Procaspase-8 generiert. Kaninchen wurden mit einem Phosphopeptid aus 13 Aminosäuren (Abbildung 3-5A) 4x immunisiert. Einige Wochen später wurde das Serum immunisierter Kaninchen affinitätsaufgereinigt (Abbildung 3-5B). Um die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen, wurde zuerst ein Kinase-Test durchgeführt: steigende Konzentrationen (50 ng – 800 ng) bakteriell exprimiertes und mittels Glutathione-Sepharose-Beads aufgereinigtes Procaspase 8-GST Fusionsprotein wurden zusammen mit ATP und aktiven Cdk1/Cyclin B1 Komplex inkubiert und anschließend mittels SDS PAGE analysiert. Der phosphospezifische Antikörper, pAB-Casp8/S387, detektierte a) konzentrationsabhängig und b) weitaus weniger als 100 ng phosphoryliertes

Procaspase 8 (Abbildung 3-5C), was auf eine hohe Spezifität dieses Phospho Antikörpers hindeutete. Zudem erkannte der gegen die phosphorylierte Form von Caspase 8 gerichtete Antikörper tatsächlich auch nur die phosphorylierte Form (Abbildung 3-5C, Spur 2-5 Oben) wohingegen der gegen das Gesamtprotein gerichtete Antikörper auch die nichtphosphorylierte Protease detektierte (Abbildung 3-5C, Spur 6 Mitte). Durch Dephosphorylierung mittels λ Phosphatase wurde der Phosphostatus erwartungsgemäß wieder umgekehrt (Abbildung 3-5D, Spur 3), d.h. pAB Casp8/S387 war nicht mehr in der Lage, Procaspase 8 zu erkennen.

Auch ein weiterer Kinase-Test von Cdk1/Cyclin B1 und Procaspase-8 zeigte bei anschließender Western Blot Untersuchung, dass eine Punktmutation von Procaspase-8 (S387A) die Phosphorylierung durch Cdk1/Cyclin B1 verhindert (Abbildung 3-5, Spur 4 und 6). Weder Procaspase8-WT noch Procaspase8-S387A wurden vom phosphospezifischen Antikörper erkannt, was die hohe Spezifität von pABCasp8/S387 zusätzlich unterstreicht.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich mittels des phosphospezifischen Antikörpers, pABCasp8/S387, kleinste Mengen von an Serin 387 in vitro phosphoryliertem Procaspase-8 nachweisen lassen.

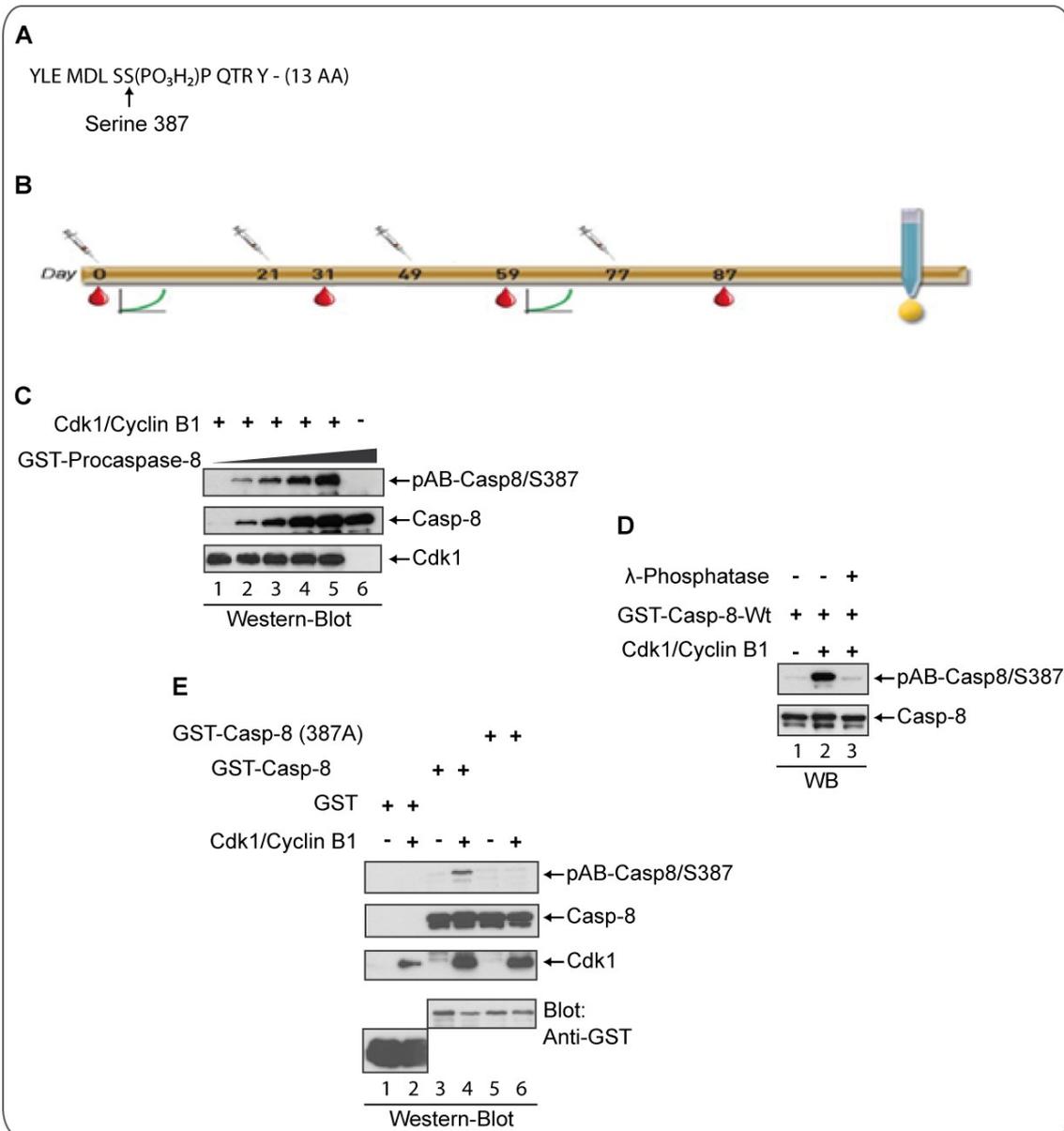


Abbildung 3-5. Der Phospho-Antikörper pAB-Casp8/S387 erkennt spezifisch phosphoryliertes Procaspase-8.

(A) Ein aus 13 Aminosäuren bestehendes Phosphopeptid wurde an einen Protein Carrier („Keyhole Limpet Hemocyanin“, KLH) gekoppelt und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet.

(B) Kaninchen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit dem Phosphopeptid über einen Zeitraum von 90 Tagen immunisiert und der daraus resultierende Phospho-Antikörper wurde anschließend analysiert und affinitätsaufgereinigt.

(C) Steigende Konzentrationen (50 ng – 800 ng) GST Procaspase-8 wurden zusammen mit ATP und Cdk1/Cyclin B1 inkubiert und anschließend mittels SDS PAGE analysiert.

(D) Procaspase-8, Cdk1/Cyclin B1 und ATP wurden zusammen mit λ -Phosphatase inkubiert und danach mittels SDS PAGE analysiert.

(E) Mit der Procaspase-8 Mutante, S387A, und Cdk1/Cyclin B1 wurde ein Kinase Test durchgeführt und anschließend durch SDS PAGE analysiert.

4.6. Procaspase-8 wird während der Mitose in vivo phosphoryliert

Erste Evidenzen einer *in vitro* Phosphorylierung ließen als nächstes die Frage zu, ob Procaspase-8 auch *in vivo* phosphoryliert wird. Um diese Frage zu beantworten, wurde zuerst überprüft, ob der Phospho-Antikörper, pAB-Casp8/S387, Procaspase 8 in humanen Zellen im Western Blot detektiert. Hierzu sollten stabil transfizierte Caspase 8 Knockdown Zellen generiert werden. Mittels der in unserem Labor entwickelten Web Applikation zur Suche spezifischer shRNA-Sequenzen, (www.molgyn.kgu.de/genesilencer/) wurden 3 Sequenzen mit einem hohen zu erwarteten Knockdown von Procaspase 8 ausgewählt und in konstitutiv shRNA exprimierende Vektoren (82, 83) kloniert. Die Vektoren wurden anschließend in HeLa Zellen transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Selektionsmedium für 72h inkubiert und danach mittels Western Blot analysiert (82, 83). Der Vektor mit der potentesten shRNA-Sequenz gegen Procaspase 8 (Abbildung 3-6A, oberes Panel) wurde stabil in HeLa Zellen transfiziert. Für 4-6 Wochen wurden Einzelklone selektioniert und danach mittels SDS PAGE analysiert. Von mehreren Einzelklonen, wurden 2 Klone für weitere Studien herangezogen (Abbildung 3-6A, unteres Panel). Zusätzlich wurde die Integrität der shRNA-Kassette mittels PCR auf genomischer HeLa DNA verifiziert. Um mit einem weiteren Experiment die Spezifität des phosphospezifischen Antikörpers gegen Procaspase 8 zu überprüfen, wurden Procaspase-8 Knockdown-Zellen lysiert und mittels Western Blot analysiert.

Procaspase-8 als auch phosphorylierte *Procaspase-8* ließen sich in Lysaten von HeLa-Zellen (WT) nachweisen, wohingegen im Lysat von *Procaspase-8* Knockdown Zellen das korrespondierende Signal ausblieb (Abbildung 3-6B). Somit bestätigten diese Ergebnisse die hohe Spezifität des gegen die phosphorylierte Form (S387) von *Procaspase 8* gerichteten Antikörpers *in vivo*. Weiterhin wollten wir wissen, ob phosphorylierte *Procaspase 8* mit der *Cyclin B1* Expression und somit mit der MPF Aktivität in der Mitose korreliert.

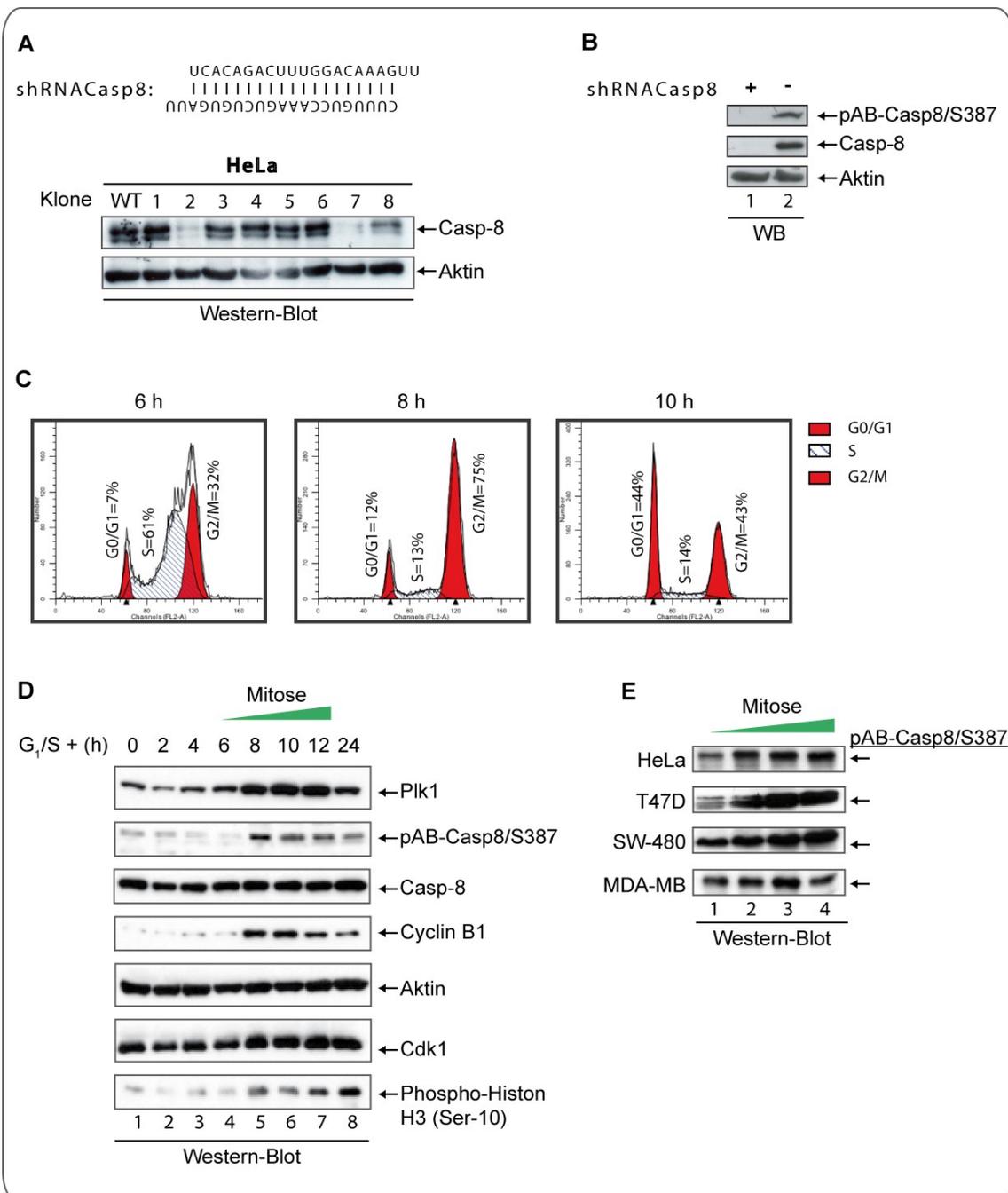


Abbildung 3-6. Phosphorylierung von Procaspase 8 während der Mitose.

(A) *SiRNA Sequenz für die Depletion von Procaspase 8. HeLa Zellen wurde mit shRNA Vektoren gegen Procaspase 8 stabil transfiziert und zu Einzelklonen expandiert. Die Zellysate wurden mit Caspase 8 Antikörpern analysiert. Als Standard diente β -Aktin.*

(B) *Das Lysat eines stabilen transfizierten shRNA-Caspase 8 Klons wurde mit einem Caspase 8 Antikörper sowie mit dem phosphospezifischen Antikörper pAB Casp8/S387 analysiert.*

(C) *Mittels doppeltem Thymidin Block wurden die Zellen zu Beginn der G₁/S Phase synchronisiert und für die gezeigte Dauer in frisches Medium entlassen.*

(D) *Für die gezeigten Zeitpunkte wurde mit Hilfe des Phospho Antikörpers, pAB Casp8/S387, die Phosphorylierung von Procaspase 8 untersucht. Als Markerproteine für den Verlauf der Mitose wurden die Lysate mit Antikörpern gegen Plk1, Cyclin B1, Cdk1 sowie phosphoryliertes Histon H3 untersucht.*

(E) *Verschiedene Krebszelllinien wurden während der Mitose auf den Phosphostatus von Procaspase 8 hin untersucht. (HeLa: humanes Zervixkarzinom, T47D: humanes Mammakarzinom, MDA MB: humanes Mammakarzinom, SW 480: humanes Magenkarzinom)*

HeLa Zellen wurden mittels doppeltem Thymidin Block zu Beginn der G₁/S Phase synchronisiert, in frisches Medium entlassen (Release) und für die gezeigten Zeitpunkte anhand ihres DNA Gehaltes analysiert. 8 Stunden nach Release befand sich ein hoher Anteil von Zellen (75%) in der G₂/M Phase (Abbildung 3 6C). Um den Phospho-Status von Procaspase 8 während der Mitose genau zu charakterisieren, wurden zusätzlich von den gezeigten Zeitpunkten Lysate hergestellt. Mit Hilfe mitotischer Marker Proteine wie Cyclin B1, phosphoryliertes Histon H3 (Ser-10) und Plk1 konnte gezeigt werden, dass sich 7-10 h nach G₁/S eine hohe Anzahl der synchronisierten HeLa Zellen in der Mitose befand

(Abbildung 3 6D). Die Phosphorylierung von Procaspase 8 an Ser 387 zeigte sich besonders deutlich während der Mitose (Abbildung 3-6D, zweites Panel von oben, Spur 5-8). Kaum Phosphorylierung von Procaspase 8 wurde dagegen außerhalb der Mitose nachgewiesen (Abbildung 3-6D, zweites Panel von oben, Spur 1-4). Auch in weiteren Tumorzellen unterschiedlichen Ursprungs fand sich eine Korrelation der Phosphorylierung von Procaspase 8 an Ser 387 mit dem zeitlichen Verlauf der Mitose (Abbildung 3-6E).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Procaspase 8 hauptsächlich während der Mitose von Cdk1/Cyclin B1 in Krebszellen unterschiedlichen Ursprungs phosphoryliert wird.

4.7. Knockdown von Cyclin B1 verringert die Phosphorylierung an Ser 387 und verstärkt extrinsische Apoptose nach Fas Stimulation

Bisher konnte gezeigt werden, dass Procaspase 8 an Ser 387 von Cdk1/Cyclin B1 *in vitro* als auch *in vivo* phosphoryliert wird. Weiterhin zeigten Interaktions Studien eine direkte Assoziation von Cdk1/Cyclin B1 und Procaspase 8 während der Mitose in humanen Krebszellen. Zudem wurde an Ser 387 phosphorylierte Procaspase 8 verstärkt während der Mitose nachgewiesen. Deshalb sollte anschließend untersucht werden, welche Funktion Cdk1/Cyclin B1 innerhalb der extrinsischen apoptotischen Signaltransduktion hat.

HeLa Zellen wurden mit Hilfe der in unserem Labor entwickelten shRNA-Vektoren stabil gegen die regulatorische Untereinheit des MPF, Cyclin B1, transfiziert und zu Einzelklonen expandiert. Aus mehreren Einzelklonen wurde anschließend ein Klon mit einem partiellen Knockdown von über 75% für weitere Studien herangezogen (84). HeLa-Zellen und HeLa-CyclinB1-Knockdown Zellen (Cyclin B1⁻) wurden mit Nocodazol in der G₂/M Phase angereichert. In G₂/M konnte für beide Zelllinien (HeLa und Cyclin B1⁻) ein

deutlicher Anstieg der Cyclin B1 Expression nachgewiesen werden (Abbildung 3-7A). Jedoch war das Cyclin B1 Proteinlevel in den Cyclin B1⁻ Zellen deutlich geringer im Vergleich zu parentalen HeLa-Zellen (Abbildung 3-7A, oberes Panel). Um zu untersuchen, welche Funktion die Phosphorylierung während der Mitose von Procaspase 8 innerhalb der extrinsischen Apoptose hat, wurden beide Zelllinien mit einem doppelten Thymidin Block in der G₁/S Phase synchronisiert und anschließend in frisches Medium entlassen. 7 h danach wurde mittels eines Antikörpers gegen den Fas Rezeptor der extrinsische Apoptoseweg stimuliert (Abbildung 3-7B).

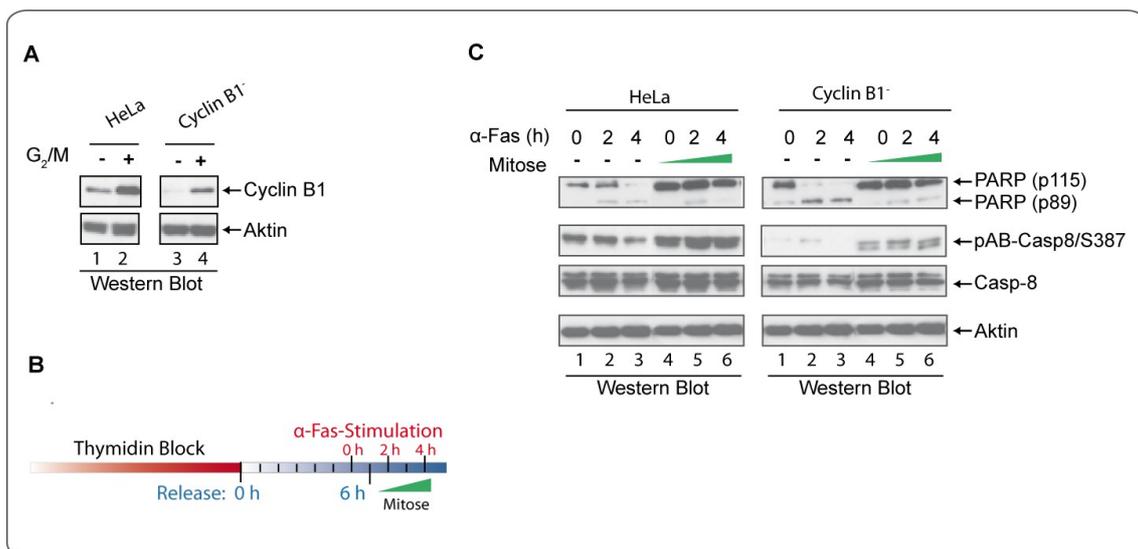


Abbildung 3-7. Cdk1/Cyclin B1 phosphoryliert Procaspase 8 in mitotischen HeLa Zellen.

(A) Cyclin B1 Zellen wurden durch Nocodazol in der G₂/M Phase angereichert und anschließend wurden die Lysate mittels SDS PAGE analysiert. Der Knockdown von Cyclin B1 durch stabil transfizierte shRNA wurde mit Hilfe eines Cyclin B1 Antikörpers nachgewiesen.

(B) Schematische Darstellung des Protokolls der Fas^α Stimulation nach Anreicherung von HeLa^α Zellen in der G₁/S^α Phase.

(C) Cyclin B1 Knockdown Zellen wurden durch einen doppelten Thymidin Block in der G₁/S Phase synchronisiert, für 6 h in frisches Medium entlassen und ab

diesem Zeitpunkt für eine Dauer von 4 h mit Fas Antikörper stimuliert. Die Lysate wurden mit Antikörpern gegen PARP, phosphorylierte Procaspase 8 und Procaspase 8 untersucht. Als Ladekontrolle wurde β Aktin herangezogen.

Die Cyclin B1 Zellen zeigten eine deutlich geringere Phosphorylierung von Procaspase 8 im Vergleich zu den parentalen HeLa Zellen (Abbildung 3-7C, zweites Panel von oben). Dies legt den Schluss nahe, dass Procaspase 8 von aktivem Cdk1/Cyclin B1 Komplex während der Mitose in humanen Krebszellen phosphoryliert wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Procaspase 8 durch Cdk1/Cyclin B1 in der Mitose deutlich erhöht war (Abbildung 3 7C zweites oberes Panel, Spur 1-3 und Spur 4 5). Um die Funktion dieser Phosphorylierung genauer zu untersuchen, wurde die Spaltung von PARP als Marker für den Grad der Apoptose Induktion untersucht. Während in nichtsynchronisierten Zellen schon nach 2 h gespaltenes PARP nachweisbar war (Abbildung 3-7C, jeweils Spur 1 3), fand während der Mitose kaum PARP Spaltung statt (Abbildung 3 7C, jeweils Spur 4-7). Zudem konnte mittels des phosphospezifischen Antikörpers pAb-Casp8/S387 bestätigt werden, dass Procaspase 8 durch Cdk1/Cyclin B1 in der Mitose verstärkt phosphoryliert wird (Abbildung 3-7C). Durch erhöhte Cyclin B1 Expression zum Ende der G₂ Phase wird der MPF aktiviert. Durch den Knockdown von Cyclin B1 in humanen Krebszellen wurde daher die Aktivität des MPF verringert (siehe Abschnitt 1.7). Dadurch konnte gezeigt werden, dass aktives Cdk1 Procaspase 8 während der Mitose an Ser 387 phosphoryliert. Darüber hinaus korrelierte die zunehmende Phosphorylierung von Procaspase 8 durch Cdk1/Cyclin B1 während der Mitose mit einer deutlich geringeren PARP Spaltung nach Fas Stimulation. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die Phosphorylierung von Procaspase 8 durch Cdk1/Cyclin B1 während der Mitose die extrinsische Apoptose gehemmt wird.

4.8. Cdk1/Cyclin B1 reguliert die Aktivierung/Prozessierung von Procaspase 8 während der Mitose

Um zu untersuchen, welche funktionelle Bedeutung die Phosphorylierung von Procaspase 8 an Ser 387 durch Cdk1/Cyclin B1 für die Protease selbst hat, wurde die Spaltung der Procaspase 8 in seine katalytisch aktiven Untereinheiten detailliert untersucht.

HeLa-Zellen wurden mit dem Fas-Liganden für verschiedene Zeitpunkte stimuliert und bereits nach 4 Stunden konnte die katalytisch aktive Untereinheit von Caspase 8, p18, nachgewiesen werden (Abbildung 3-8A). Nach 6 h Fas Stimulation zeigte sich p18 deutlich (Abbildung 3 8A, Spur 3). Die Spaltung von PARP, die uns bisher als Nachweis für die Induktion der Apoptose diente, korrelierte erwartungsgemäß mit der Aktivierung von Procaspase 8 (Abbildung 3 8A). Diese Ergebnisse bestätigen, dass in allen durchgeführten Experimenten, die autokatalytische Spaltung von Procaspase 8 der Spaltung von PARP vorausgeht (Abbildung 3-7C, Spur 4-6 und Spur 10-12).

Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass der extrinsische Apoptoseweg in humanen Zellen mittels Cyclohexamid verstärkt werden kann (38). Cyclohexamid ist ein Antibiotikum von Streptomyceten, das die Translation von Eukaryonten hemmt. Daher sollte untersucht werden, ob die Prozessierung von Procaspase-8 insbesondere in HeLa Zellen durch Cyclohexamid verstärkt wird. Es wurde die autokatalytische Spaltung von Procaspase-8 in HeLa-Zellen über mehrere Stunden mit oder ohne Cycloheximid nach Fas Ligation analysiert. Während steigende Konzentrationen des Fas-Liganden mit der Akkumulierung der katalytisch aktiven Untereinheit von Procaspase 8, p18, korrelierten (Abbildung 3-8B, Spur 2, 3 und 5), konnte dieser Effekt durch zusätzliche Inkubation mit Cyclohexamid deutlich verstärkt werden (Abbildung 3-8B, Spur 6). Interessanterweise wurde durch alleinige Inkubation mit Cyclohexamid, Caspase-8 Prozessierung aktiviert (Abbildung 3-8B, Spur 4). Dieses Ergebnis deutet daher auf einen zusätzlichen Rückkoppelungsmechanismus hin, der auch

intrinsisch zur Aktivierung von Procaspase 8 führt. Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse, dass die Prozessierung von Procaspase-8 mittels Fas-Ligation durch zusätzliche Inkubation mit Cyclohexamid verstärkt werden kann.

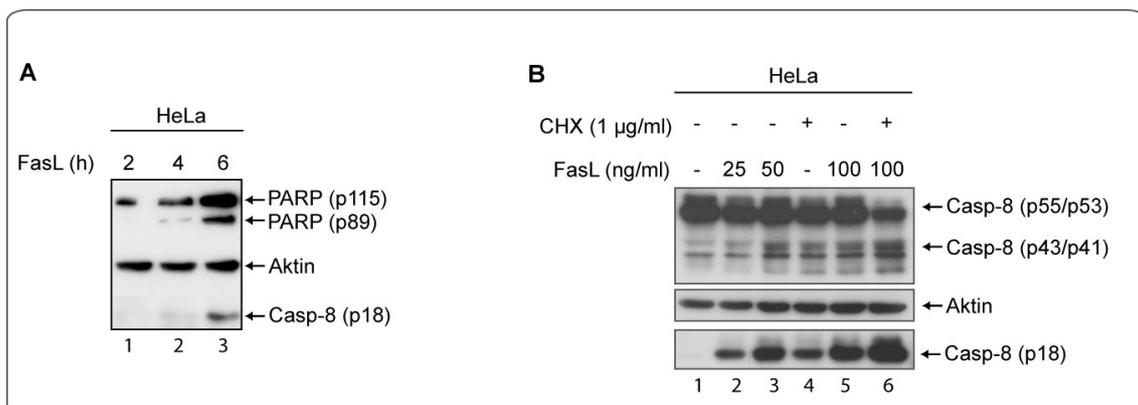


Abbildung 3-8. Der Fas-Ligand induziert die Prozessierung von Caspase-8.

(A) HeLa-Zellen wurden mittels natürlichem Fas-Liganden für einen Zeitraum von 6 h stimuliert und die Spaltung von PARP sowie von Procaspase 8 wurde durch SDS PAGE untersucht.

(B) HeLa-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen des Fas-Liganden mit und ohne Cyclohexamid für 6 h stimuliert und die autokatalytische Spaltung von Procaspase 8 wurde mittels Western Blot analysiert. Als Standard diente β Aktin.

Die Phosphorylierungsstelle Ser-387 liegt in unmittelbarer Nähe zu einer der beiden Spaltstellen (Asp 384), an denen die Spaltung von p10 vollzogen wird (Abbildung 1 2). Daher stellte sich die Frage, ob die Phosphorylierung von Procaspase 8 an Ser 387 durch Cdk1/Cyclin B1 direkten Einfluss auf die Prozessierung von Procaspase 8 hat. Um diesen Aspekt im Western Blot

nachzuweisen, wurde Procaspase 8 carboxyterminal mit einem V5 Tag markiert. Dadurch konnte speziell die p10-Untereinheit mit Hilfe eines V5 Antikörpers detektiert werden. Caspase 8 Knockdown Zellen (Caspase⁻) wurden mit einer an Ser 387 nicht phosphorylierbaren Mutante (S387A) sowie mit einer den Phosphostatus vortäuschenden Mutante (S387E) transfiziert und 24 h später für die angegebene Dauer mit dem Fas Liganden stimuliert. Während sich bei der Phosphorylierung vortäuschenden Mutante, S387E, über den gesamten Zeitraum keine nachweisbare Procaspase 8 Spaltung nachzuweisen war, wurde die nichtphosphorylierbare Procaspase 8 Mutante, S387A, bereits nach 1 h gespalten (Abbildung 4-8, Spur 10-12). Erneut korrelierte die Spaltung von Procaspase 8 mit der von PARP (Abbildung 3 8, Spur 10 12). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung von exogener Procaspase 8 an Ser 387 dessen autokatalytische Spaltung hemmt.

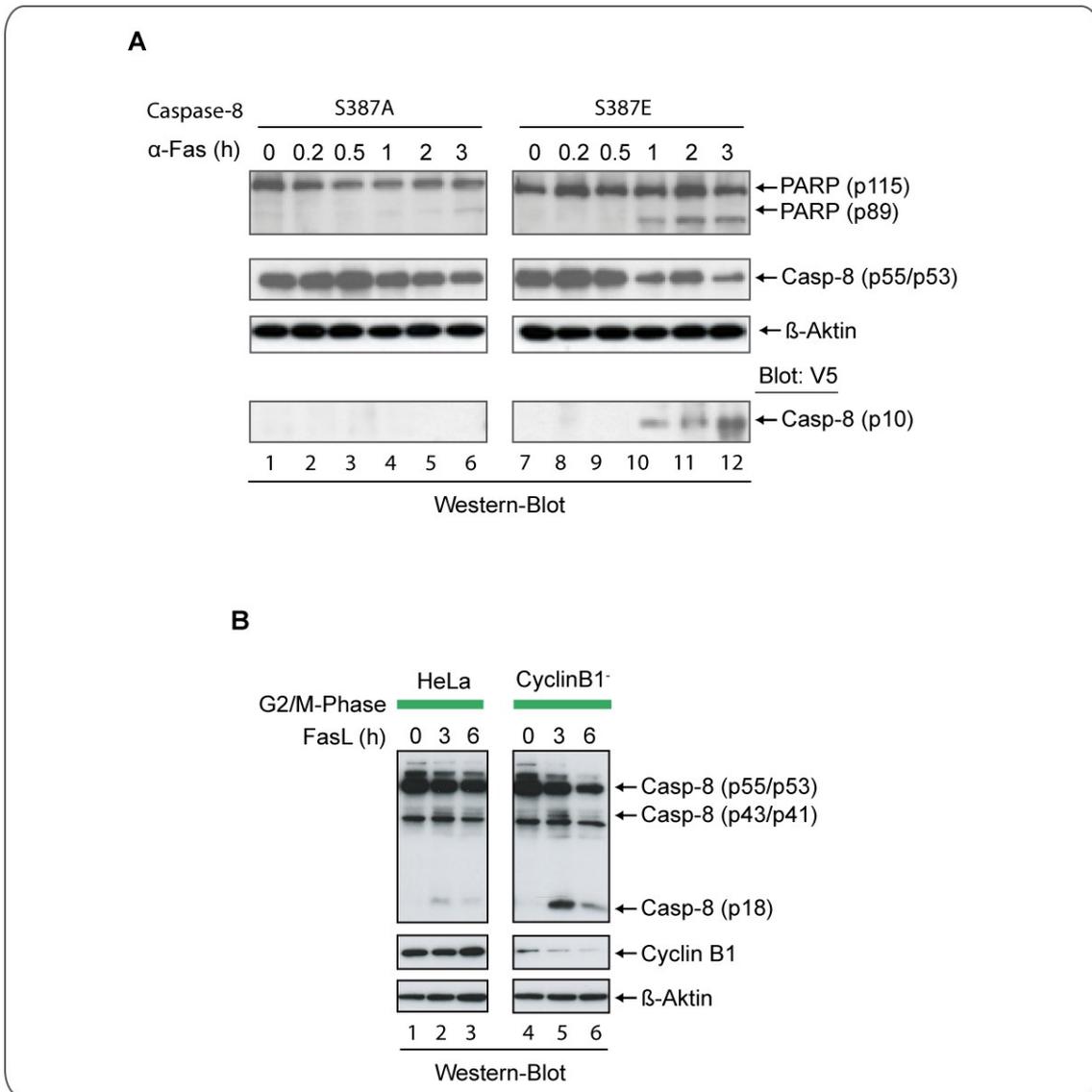


Abbildung 3-9. Cdk1/Cyclin B1 verhindert die Prozessierung von Procaspase 8 durch Phosphorylierung an Ser 387 in der G₂/M Phase.

(A) HeLa Zellen wurden mit V5 Tag-markierten Procaspase 8 Mutanten transfiziert und 24 h später für 3 h mit Fas Antikörper stimuliert. Die Induktion der extrinsischen Apoptose sowie die Prozessierung von Procaspase 8 wurden durch PARP Spaltung sowie mittels Caspase 8 Antikörper und V5 Antikörper überprüft.

(B) Cyclin B1 Knockdown Zellen wurden mit 50 ng/ml Nocodazol für 16 h in der G₂/M Phase angereichert. Die abgerundeten, mitotischen Zellen wurden dann in frisches Medium überführt. Damit die Zellen im Zellzyklus nicht über die Metaphase hinauslaufen, wurden diese mit 1 µg/ml MG132 in der Metaphase arretiert. Für 6 h wurde mit 50 ng/ml Fas Ligand die extrinsische Apoptose

stimuliert. Die Cyclin B1 Expression wurde mit Cyclin B1 Antikörper durch SDS PAGE analysiert. Die Prozessierung von Procaspase 8 wurde durch den monoklonalen Antikörper (C15) nachgewiesen. Zur Standardisierung wurde β Aktin herangezogen.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob Cdk1/Cyclin B1 die Prozessierung/Aktivierung von endogener Procaspase 8 während der Mitose beeinflusst. Hierzu wurden HeLa Zellen mittels Nocodazol in G₂/M angereichert. Durch vorsichtiges Abschütteln wurden die abgerundeten, mitotischen Zellen in frisches Medium überführt und zudem mit dem Proteasom Inhibitor, MG 132, inkubiert. Dadurch wurde verhindert, dass die Nocodazol angereicherten Zellen die Metaphase des Zellzyklus verlassen. Um in Metaphase Zellen die Aktivierung der Fas vermittelten Apoptose funktionell zu untersuchen, wurden die Zellen für die angegebene Dauer mit dem Fas Liganden stimuliert (Abbildung 4-9B). Bereits 3 Stunden nach Stimulation wurde in den Cyclin B1 Zellen Procaspase 8 in seine katalytischen Untereinheiten prozessiert (Abbildung 3 9B, Spur 5-6). Dagegen konnte über den gesamten Zeitraum der Messung in HeLa Zellen (WT) kaum Prozessierung von Procaspase 8 nachgewiesen werden (Abbildung 3 9B, Spur 2-3). Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse, dass Cdk1/Cyclin B1 die Prozessierung/Aktivierung von Procaspase 8 nach Fas Stimulation während der G₂/M Phase der Mitose verhindert und somit mitotische Krebszellen vor extrinsischer Apoptose schützt.

5. DISKUSSION

Geschädigte Zellen werden normalerweise als solche vom Organismus erkannt und mittels Apoptose aus dem Zellverband entfernt. Eines der Hauptmerkmale von Krebszellen jedoch ist, der Apoptose zu entkommen (4). Ein weiteres Charakteristikum von Krebszellen ist ihre Fähigkeit zur anhaltenden Proliferation. Dadurch kommt es zu erhöhter Aktivität von Zellzyklus Kinasen. In diesem Zusammenhang wurde in vielen unterschiedlichen Arbeiten immer wieder auf die besondere Bedeutung von Zellzyklus-Kinasen hingewiesen (85). Insbesondere diejenigen, welche für die ungehemmte Proliferation der Krebszelle unverzichtbar sind, wie zum Beispiel Plk1 und Cdk1/Cyclin B1, spielen hierbei eine besondere Rolle (86, 87). Zusammenfassend drängte sich also die Frage auf, ob insbesondere Zellzyklus-Kinasen die Signalwege der Apoptose zum Vorteil der Krebszelle posttranslational regulieren.

Um diese Frage zu beantworten und darüber hinaus einen direkten Zusammenhang zwischen Zellzyklus-Kinasen und Regulatoren der Apoptose herzustellen, suchten wir speziell nach Proteinen, die das sogenannte PBD-Bindungsmotiv (S-[ST]-[PX]) potentieller Plk1-Substrate aufweisen (68, 69). Diese und weitere Arbeiten haben gezeigt, dass das PBD-Bindungsmotiv meistens von Cdk1/Cyclin B1 vorphosphoryliert wird, damit Plk1 über die PBD dort binden kann und danach das Protein von Plk1 phosphoryliert werden kann (Abbildung 1-3). In der Tat lieferte die in dieser Arbeit durchgeführte stringente Suchstrategie mehrere Treffer. Einer davon ist Procaspase 8, ein Hauptakteur des extrinsischen Signalweges der Apoptose (16, 88). Aufgrund der wichtigen Funktionen, die Procaspase 8 in der Zelle erfüllt, stellt diese Protease für die Krebszelle ein besonderes Ziel dar. Die bisher am intensivsten untersuchten Mechanismen der Inaktivierung von Procaspase 8 in Krebszellen, sind Punktmutationen sowie Deletionen des Caspase 8 Gens (48, 50, 53, 54, 89-92). Diese führen zu einer verminderten extrinsischen Funktion von Procaspase 8. Zudem zeigen weitere Studien Störungen des Caspase 8 Gens durch Methylierungen am Promoter in verschiedenen Krebsarten (55, 93-97). Darüber

hinaus führt die Phosphorylierung von Procaspase 8 an Tyr 380 durch Src Kinase zur Suppression der apoptotischen Aktivität von Procaspase 8 sowie zur Verstärkung der Zellmigration und der Metastasierung in Krebszellen (38, 98, 99). Die unterschiedlichen Mechanismen zur Inaktivierung von Procaspase 8 in Krebszellen legen den Schluss nahe, dass Procaspase 8 möglicherweise der Tumorentwicklung entgegenwirkt. Diese Hypothese wird durch Daten einer kürzlich durchgeführten Studie gestützt, die zeigt, dass Caspase 8-defiziente Zellen die Tumorentwicklung beschleunigen (57). Daher stellt sich die Frage, ob Krebszellen nicht nur durch Phosphorylierung von Tyrosin, sondern auch durch Phosphorylierung von Serin und Threonin die proapoptische Funktion von Procaspase 8 inhibieren und somit der Apoptose entgegenwirken.

Die in dieser Arbeit identifizierte Cdk1 Phosphorylierungsstelle in Procaspase 8 befindet sich innerhalb der Linker Region zwischen den beiden katalytischen Untereinheiten, p10 und p18, von Procaspase 8 (Abbildung 3-1). Genauer betrachtet, entspricht dieses PBD Bindungsmotiv in der Linker Region von Procaspase 8 dem von Elia et. al. vorgeschlagenem Bindungsmuster mit der Konsensus Sequenz: S-(pT/pS)-(P/X). Zudem zeigen aktuelle Studien, dass in der Mitose potentielle Plk1 Substrate initial von Cdk1/Cyclin B1 phosphoryliert werden (100, 101). Dies könnte bedeuten, dass die Phosphorylierung von Procaspase 8 durch Cdk1/Cyclin B1 eine Vorphosphorylierung für Plk1 ist. Daher wird in weiteren biochemischen Untersuchungen eine Interaktion von Plk1 mit Procaspase 8 untersucht werden.

5.1. Mitotische Krebszellen schützen sich gegen Apoptose

Wir konnten zeigen, dass sich humane Krebszellen gegen extrinsische apoptotische Signale schützen (Abbildung 3-2). Zellen wurden in den meisten Experimenten mittels doppeltem Thymidin Block synchronisiert, in frisches Medium entlassen und 6 h später mit Fas-Antikörper oder Fas Ligand stimuliert. Wie wir vermutet hatten, konnte in mitotischen Zellen weniger PARP-Spaltung

und somit weniger DNA Fragmentierung nach Apoptose Stimulation beobachtet werden. Das könnte bedeuten, dass mitotische Kinasen gezielt inhibitorischen Einfluss auf extrinsische apoptotische Stimuli nehmen.

Darüber hinaus konnte in der mitotischen Zellpopulation mehr Procaspase 8 Gesamtprotein nachgewiesen werden als in nicht synchronisierten Zellen (Abbildung 3-2). In Anlehnung zum Induced Proximity Model, wo hohe lokale Mengen an Caspase 8, zu deren Prozessierung und somit Aktivierung führen, würde man somit vermuten, dass es in der Mitose zu spontaner katalytischer Caspase Aktivität kommen könnte. Umso erstaunlicher zeigen unsere Ergebnisse das Gegenteil, was darauf hindeutet, dass die Zelle gezielt Schutzmechanismen gegen apoptotische Stimuli während der Mitose etabliert hat. Gestützt wird diese Schlussfolgerung durch einen ähnlichen Mechanismus, bei dem die Phosphorylierung von Procaspase 8 an Tyr 380 durch Src Kinase Dickdarmkrebszellen vor extrinsischer Apoptose schützt (63).

5.2. Direkte Bindung und Phosphorylierung von Procaspase"8 durch mitotische Kinasen

Die in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen zur Interaktion und zur Phosphorylierung haben ergeben, dass Cdk1/Cyclin B1 Procaspase 8 an Ser 387 phosphoryliert (Abbildung 3-3) und darüber hinaus an die DE Domäne von Procaspase 8 bindet (Abbildung 3-4). Im Gegensatz zu allen bisherigen Studien in diesem Feld, konnten wir erstmals *in vitro* zeigen, dass die Bindung über die Linkerregion der beiden DE Domänen von Procaspase 8 stattfindet. Interessanterweise zeigen bioinformatische Analysen, dass auch innerhalb der Linkerregion der DE Domäne eine Sequenz zu finden ist, die dem Konsensusmotiv von Cdk1 entspricht (Threonin 92: ELQTPGR). Dies könnte bedeuten, dass diese Stelle *in vivo* entweder von Cdk1/Cyclin B1 selbst oder einer weiteren Prolin-gerichteten Kinase phosphoryliert wird. Unsere Ergebnisse der *in vitro* Kinase Tests deuten jedoch nicht auf eine Phosphorylierung an Thr 92 durch Cdk1/Cyclin B1, da die aminoternale Subdomäne von

Procaspase 8 im Kinase Test nicht phosphoryliert wird. Um aber die Frage zu beantworten, ob diese Stelle in vivo eine Cdk1/Cyclin B1 Phosphorylierungsstelle ist, wäre eine Coimmunpräzipitation von Procaspase 8 aus mitotischen Zellextrakten mit anschließender massenspektrometrischer Analyse eine experimentelle Strategie, um zu untersuchen, ob Procaspase 8 an dieser Stelle in der Mitose phosphoryliert wird.

Die Coimmunpräzipitation von Procaspase 8 durch Cdk1/Cyclin B1 (Abbildung 3 4C) legt nahe, dass die Interaktion beider Proteine in der G₂/M Transition stattfindet. Im Gegensatz zu anderen Studien wurde hier bewusst die Coimmunpräzipitation mit Cyclin B1 Antikörper durchgeführt, um mitotisch aktivierten Cdk1/Cyclin B1 Komplex zu präzipitieren.

Verschiedene Kinase Tests haben gezeigt, dass Procaspase 8 in vitro von Cdk1/Cyclin B1 innerhalb der katalytischen Untereinheit p10 an Ser 387 phosphoryliert wird (Abbildung 3-3). Da sich Ser 387 in unmittelbarer Nähe zu einer der beiden Spaltstellen (Asp 384), welche zur Abspaltung von p12 und p10 führen, befindet, könnte das bedeuten, dass die Phosphorylierung an Ser 387 die Prozessierung von Procaspase 8 beeinflusst. Um das genau zu untersuchen wurden im weiteren Verlauf dieser Studie Analysen zur Prozessierung von Procaspase 8 durchgeführt.

Der deutliche Rückgang des Phosphosignals durch die Punktmutation von Ser 387 legt nahe, dass diese Stelle die Hauptphosphorylierungsstelle von Cdk1/Cyclin B1 ist. Da aber die Punktmutanten einen minimalen Rest an Phosphorylierungssignal aufweisen, können wir nicht ausschließen, dass Cdk1/Cyclin B1 Procaspase 8 an weiteren Stellen phosphoryliert. Neuere Studien bestätigen ebenfalls, dass Phosphorylierungsereignisse an Proteasen durch Cdk1/Cyclin B1 primär zwischen den funktionellen Domänen, also in den Linkerregionen, stattfinden (63, 102). Dies könnte bedeuten, dass speziell Proteasen des apoptotischen Signalweges durch Phosphorylierungsereignisse innerhalb der Linker Regionen inhibiert werden.

5.3. Die Phosphorylierung von Procaspase⁸ als neuartiger Schutzmechanismus zu Beginn der Mitose

Mithilfe eines experimentell gut funktionierenden, phosphospezifischen Antikörpers in Kombination mit unserer mehrfach reproduzierten RNAi Strategie konnten wir neue Erkenntnisse im Zusammenhang mit anhaltender Proliferation bei Krebszellen und der Regulation der extrinsischen Apoptose gewinnen. Hierzu wurden verschiedene Knockdown Zelllinien generiert und für funktionelle Studien herangezogen (82, 83, 103). Da es sich hierbei jedoch um einen partiellen Knockdown und eben keine Knockout Zellen handelt, muss mit minimaler Restexpression der jeweiligen Gene gerechnet werden. Dies bedeutet, dass wir bei den Ergebnissen niemals einen Ja/Nein Antwort erwarten können, sondern nur eine Tendenz interpretieren. Umso wichtiger war es, effiziente Knockdown Zelllinien zu generieren, die potent die Expression ihrer Ziel mRNA inhibieren. Dies wurde einerseits durch effizientes molekulares Klonieren und andererseits durch wirkungsvolle shRNA-Sequenzen erreicht. Dadurch konnten wir teilweise ein Knockdown von 90-95% erzielen, was annähernd einem Knockout entspricht.

Es konnte gezeigt werden, dass der in dieser Studie verwendete phosphospezifische Antikörper, pAB-Casp8/Ser387 spezifisch die phosphorylierte Form von Procaspase 8 erkennt (Abbildung 3-5 und 3 6). Zusätzlich zeigte eine extensive BLAST-Suche mit der Sequenz des Phospho Peptides gegen die humane Proteindatenbank keinen weiteren Treffer außer Procaspase 8.

Die Phosphorylierung von Procaspase 8 an Ser 387 zeigte sich primär in mitotischen Zellextrakten von verschiedenen humanen Krebszellen (Abbildung 3-6 und 3 7). Obwohl das Phosphosignal verstärkt in der Mitose zu finden war, aber auch minimal nach doppeltem Thymidin Block zu Beginn der G₁/S-Phase (Abbildung 3 6), können wir nicht ausschließen, dass hier weitere Phosphorylierungsereignisse stattfinden könnten (z.B. durch Cyclin E1/Cdk2). Da die Zellen aber nicht zu 100% synchronisiert sind, ist auch davon auszugehen, dass das Restsignal von einer ungenügend synchronisierten Zellpopulation herrührt. Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, ob eine

mögliche Phosphorylierung von Procaspase 8 in der G₁/S Phase zusätzlich funktionelle Bedeutung hat. Eine Phosphorylierung von Procaspase 8 in der G₁/S Phase würde zudem mit dem Modell von Allan et. al. korrelieren, in dem Procaspase 9, der Hauptregulator des intrinsischen Signalweges, in der S Phase zuerst von ERK1/2 und später in der Mitose von Cdk1/Cyclin B1 reguliert wird (60, 61).

Da in vivo mittels RNAi neben der endogenen Procaspase 8 gleichzeitig phosphorylierte Procaspase 8 deutlich reduziert wurde (Abbildung 3-6B) lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass sich durch den phosphospezifische Antikörper: pAB Casp8/S387, nur phosphorylierte Procaspase 8 nachweisen lässt.

Die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von Procaspase 8 in stabilen Cyclin B1 Knockdown Zellen hat gezeigt, dass in diesen Zellen Procaspase 8 kaum phosphoryliert wird (Abbildung 3-7C). Das deutet darauf hin, dass tatsächlich Cdk1 für diese Phosphorylierung an Ser 387 von Procaspase 8 in humanen Krebszellen verantwortlich ist. Diese Daten stehen auch in Einklang mit einer ähnlichen Strategie, bei der endogenes Cdk1/Cyclin B1 Procaspase 9 während der Mitose phosphoryliert (61).

5.4. Durch die Hemmung der Aktivierung der Procaspase 8 schützt sich die Krebszelle vor extrinsischer Apoptose

Die exogene Expression von Ser 387 Punktmutanten legt nahe, dass die Phosphorylierung von Procaspase 8 an Ser 387 mit der Autoprozessierung von Procaspase 8 nach Fas Stimulation korreliert (Abbildung 3-9A). Der Wegfall der Phosphorylierung (S387A) führt deutlich zu einer erhöhten Autoprozessierung von Procaspase 8. Noch klarer wird das Bild in Prometaphase Zellen, die nach Cyclin B1/Knockdown deutlich erhöhte Procaspase 8 Prozessierung zeigen (Abbildung 3-9C und B).

Die Prozessierung von Procaspase 8 findet nach dem „Induced-Proximity-Model“ am DISC statt. Während nach Rezeptor Aktivierung Procaspase 8 zum DISC rekrutiert wird, führen dort hohe Konzentration von Procaspase 8 zu deren Autoaktivierung (15). Während der Autokatalyse von Procaspase 8 am DISC kommt es zur Formation des Heterotetramers, bestehend aus den katalytischen Untereinheiten ((p10)₂(p18)₂). Damit wird die extrinsische Apoptose eingeleitet. Der erste Schritt umfasst die Abspaltung von der p10 Untereinheit, gefolgt von der Abspaltung der p18 Untereinheit. Da die Phosphorylierungsstelle innerhalb der Linker Region, zwischen den beiden katalytischen Untereinheiten p10 und p18, identifiziert wurde, legt das die Vermutung nahe, dass die Autokatalyse von Procaspase 8 durch mitotische Kinasen inhibiert wird. Die Inaktivierung von Procaspase 8 durch Inhibition der Autoaktivierung korreliert mit allen bisher bekannten Inaktivierungsmechanismen wie Mutationen, epigenetischer Modifikationen sowie posttranslationaler Modifikationen. Jede Art der Inaktivierung hemmt die Prozessierung von Procaspase 8. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass möglicherweise die Rekrutierung zum DISC beeinflusst werden könnte. Ein solcher Mechanismus konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Weitere Experimente im Zusammenhang mit einer Immunpräzipitation vom DISC sollten hier mehr Aufschluss geben.

Trotzdem kann aus den in dieser Studie erzielten Ergebnissen abgeleitet werden, dass die Phosphorylierung von Procaspase 8 an Ser 387 durch Cdk1/Cyclin B1 während der Mitose zur Hemmung der Autokatalyse von Procaspase 8 führt. Dieses Model steht auch in Einklang mit ähnlichen Studien, die zeigen, dass die Phosphorylierung von Proteasen des intrinsischen sowie des extrinsischen Signalweges mit der Regulierbarkeit der Autokatalyse von Caspasen korreliert (63, 102).

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass Cdk1/Cyclin B1 zu Beginn der Mitose gezielt Enzyme der extrinsischen Apoptose hemmt. Darüber hinaus wird in dieser Studie erstmals gezeigt, dass ein Initiator des extrinsischen Signalweges durch Zellzyklus-Kinasen reguliert wird. Das lässt den Schluss zu, dass ein direkter Zusammenhang zwischen gesteigerter Proliferation bei

Krebszellen, erhöhter Aktivität von Zellzyklus-Kinasen und gezielter Hemmung der Apoptose besteht. Neben den bekannten Mechanismen zur Inaktivierung von Procaspase 8, wie Mutationen, Deletionen und Promoter Methylierungen, konnte in dieser Studie ein neuartiger Mechanismus zur Inhibition der katalytischen Aktivität von Caspase 8 gezeigt werden. Durch die Phosphorylierung von Procaspase 8 in unmittelbarer Nähe der Spaltstelle durch eine Zellzyklus-Kinase wird die autokatalytische Spaltung von Procaspase 8 inhibiert. Das bedeutet, dass durch gezielte Inhibition von Zellzyklus-Kinasen, welche Apoptose blockieren, Tumorzellen für Apoptose sensibilisiert werden können. Zellzyklus-Kinasen wie Cdk1/Cyclin B1 scheinen den Schwellenwert für Fas vermittelte Apoptose in der Mitose zu erhöhen. Durch neueste Studien, die zeigen, dass Procaspase 8 tumorsuppressive Eigenschaften aufweist, eröffnen sich zudem neuartige Strategien zur Tumorbekämpfung (57). Die tumorsuppressive Funktion von Caspase 8 resultiert aus der Aktivierung von p53 durch die Spaltung von Osteopontin durch Caspase 8 (104). Osteopontin ist bei Krebspatienten überexprimiert und ist zudem in unterschiedliche Aspekte der Tumprogression involviert. Verschiedene Strategien in der Tumorthherapie wurden verfolgt, um die Caspase 8 Expression in Tumorzellen wieder herzustellen oder zu erhöhen. Durch die Inkubation mit 5-aza-2'-deoxycytidin („5 AZA“) kommt es zur Demethylierung des Promoters und somit zur gesteigerten Expression des Caspase 8 Gens (105, 106). Eine weitere, erfolgsversprechende Strategie ist die Exposition von Zellen mit Interferon gamma („IFN γ “) zur Steigerung der Expression von Procaspase 8. Werden Zellen mit IFN γ vorinkubiert, führt das zur Expression von Procaspase 8 und sensibilisiert diese Zellen für die Radio- und Chemotherapie sowie für die Rezeptor vermittelte Apoptose Induktion mittels TRAIL und FAS (107-111). Zusätzlich zur Stimulation mit IFN γ wird versucht in Kombination mit Histon Deacetylase Inhibitoren die Expression von Caspase 8 zu erhöhen und dadurch die Zellen für TRAIL vermittelte Apoptose zu sensibilisieren (112, 113). Durch den in dieser Studie gezeigten neuartigen Mechanismus der Inhibition der Caspase 8 Prozessierung durch die mitotische Kinase Cdk1 eröffnen sich

neue Strategien in der Tumorthherapie. Die Vorbehandlung von Zellen mit dem Cdk1 Inhibitor, RO 3306, mit anschließender Stimulation der extrinsischen Apoptose durch TRAIL, könnte Krebszellen effektiver für extrinsische Apoptose sensibilisieren. Darüber hinaus könnte diese neuartige Strategie erfolgreiches zur Aufhebung der Resistenzausbildung nach Chemotherapie beitragen.

Abkürzungsverzeichnis

<i>APAF-1</i>	<i>Apoptotic protease-activating factor 1</i>
<i>APC/C</i>	<i>Anaphase-promoting complex</i>
<i>Asp</i>	<i>Asparagin</i>
<i>ATP</i>	<i>Adenosintriphosphat</i>
<i>BLAST</i>	<i>Basic local alignment search tool</i>
<i>CamK</i>	<i>Calmodulin kinase</i>
<i>CBB</i>	<i>Coomassie brilliant blue</i>
<i>CDK1</i>	<i>Cyclin-dependent kinase 1</i>
<i>cDNA</i>	<i>complementary DNA</i>
<i>CT</i>	<i>C-terminus</i>
<i>Cys</i>	<i>Cystein</i>
<i>DAPI</i>	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
<i>DED</i>	<i>Death-effector domain</i>
<i>DISC</i>	<i>Death-induced signaling complex</i>
<i>ECL</i>	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
<i>ECM</i>	<i>Extracellular matrix</i>
<i>ERK</i>	<i>Extracellular-related kinase</i>
<i>FACS</i>	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
<i>FADD</i>	<i>FAS-associated death domain protein</i>
<i>FCS</i>	<i>Fetal calf serum</i>
<i>GFP</i>	<i>Green fluorescence protein</i>
<i>GST</i>	<i>Glutathione S-transferase</i>

<i>HDAC</i>	<i>Histone deacetylase</i>
<i>HEK</i>	<i>Human embryonic kidney</i>
<i>His</i>	<i>Histidin</i>
<i>HRP</i>	<i>Horseradish peroxidase</i>
<i>IFN</i>	<i>Interferon</i>
<i>IMD</i>	<i>Integrin^αmediated death</i>
<i>IP</i>	<i>Immunpräzipitation</i>
<i>IPTG</i>	<i>Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid</i>
<i>LB</i>	<i>Luria broth</i>
<i>Lys</i>	<i>Lysin</i>
<i>mAB</i>	<i>Monoclonaler Antikörper</i>
<i>MAPK</i>	<i>Mitogen^αactivated protein kinase</i>
<i>MEM</i>	<i>Minimum essential medium</i>
<i>MPF</i>	<i>Mitosis promoting factor</i>
<i>mRNA</i>	<i>Messenger RNA</i>
<i>NT</i>	<i>N^αterminus</i>
<i>PAGE</i>	<i>Polyacrylamide gelelectrophoresis</i>
<i>PARP</i>	<i>Poly^α(ADP-ribose)^αPolymerase</i>
<i>PBD</i>	<i>Polo-box domain</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphat^αbuffered saline</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<i>PI</i>	<i>Phosphatidylinositol</i>
<i>PLK1</i>	<i>Polo^αlike kinase1</i>
<i>RIP</i>	<i>Receptor^αinteracting protein kinase</i>
<i>RIPA</i>	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>

<i>RNAi</i>	<i>RNA"Interference</i>
<i>RNase</i>	<i>Ribonuclease</i>
<i>RT</i>	<i>Raumtemperatur</i>
<i>Ser</i>	<i>Serin</i>
<i>shRNA</i>	<i>Short"hairpin RNA</i>
<i>siRNA</i>	<i>Small"interfering RNA</i>
<i>SMAC</i>	<i>Second mitochondria"derived activator of caspases</i>
<i>SOB</i>	<i>Super Optimal Broth</i>
<i>Src</i>	<i>Sarcom</i>
<i>TBST</i>	<i>Tris"buffered saline tween</i>
<i>TFB</i>	<i>Transformation buffer</i>
<i>TNF</i>	<i>Tumor"necrosis factor</i>
<i>TRIS</i>	<i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
<i>Tyr</i>	<i>Tyrosin</i>
<i>v/v</i>	<i>volume/volume</i>
<i>w/v</i>	<i>weight/volume</i>
WT	Wildtype

Publikationen

*Kreis NN, Sommer K, Sanhaji M, Krämer A, **Matthess Y**, Kaufmann M, Strebhardt K, Yuan J.*

Long-term downregulation of Polo-like kinase 1 increases the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1).

Cell Cycle. 2009 Feb 1;8(3):460-72. Epub 2009 Feb 18. PubMed PMID: 19177004.

*Kappel S, **Matthess Y**, Kaufmann M, Strebhardt K.*

Silencing of mammalian genes by tetracycline-inducible shRNA expression.

Nat Protoc. 2007;2(12):3257-69. PubMed PMID: 18079726.

*Kappel S, **Matthess Y**, Zimmer B, Kaufmann M, Strebhardt K.*

Tumor inhibition by genomically integrated inducible RNAi-cassettes.

Nucleic Acids Res. 2006;34(16):4527-36. Epub 2006 Aug 31. PubMed PMID: 16945954;
PubMed Central PMCID: PMC1636372.

*Yuan J, Krämer A, **Matthess Y**, Yan R, Spänkuch B, Gätje R, Knecht R, Kaufmann M, Strebhardt K.*

Stable gene silencing of cyclin B1 in tumor cells increases susceptibility to taxol and leads to growth arrest in vivo.

Oncogene. 2006 Mar 16;25(12):1753-62. PubMed PMID: 16278675.

***Matthess Y**, Kappel S, Spänkuch B, Zimmer B, Kaufmann M, Strebhardt K.*

**Conditional inhibition of cancer cell proliferation by tetracycline-responsive,
H1 promoter-driven silencing of PLK1.**

Oncogene. 2005 Apr 21;24(18):2973-80. PubMed PMID: 15735719.

Spänkuch B, Matthess Y, Knecht R, Zimmer B, Kaufmann M, Strebhardt K.

**Cancer inhibition in nude mice after systemic application of U6 promoter-driven
short hairpin RNAs against PLK1.**

J Natl Cancer Inst. 2004 Jun 2;96(11):862-72. PubMed PMID: 15173270.

Danksagung

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Phil. nat. Klaus Strebhardt für die hervorragende Betreuung sowie die wissenschaftliche Unterstützung bei der Realisierung dieser Arbeit bedanken. Dank gilt auch Prof. Dr. Manfred Kaufmann für die finanzielle Unterstützung bei diesem Projekt.

Genauso möchte ich mich bei Prof. Dr. Jürgen Bereiter Hahn für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit recht herzlich bedanken.

Frau Dr. Monika Raab danke ich ganz besonders für die außergewöhnliche Unterstützung bei der Durchführung essentieller molekularbiologischer Methoden, insbesondere im Bereich der Proteinbiochemie, sowie ihrer konstruktiven und projektfördernden Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des molekularbiologischen Labors danken, die durch ihre fachspezifische Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Lisa Kurunci-Csacsco, Anne Greiner, Dr. Sven Kappel, Andrea Krämer, Nina Kreis, Dr. Bernd Martin, Susanne Roth, Mourad Sanhaji, PD Dr. Birgit Spänkuch und PD Dr. Juping Yuan.

Besonderer Dank gilt vor allem meiner Familie.

Referenzen

1. Kerr JF, Wyllie AH, & Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.
2. Yuan J & Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802-809.
3. Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462.
4. Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
5. Morgenbesser SD, Williams BO, Jacks T, & DePinho RA (1994) p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature* 371:72-74.
6. Symonds H, et al. (1994) p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* 78:703-711.
7. Li P, et al. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
8. Martinou JC & Green DR (2001) Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:63-67.
9. Riedl SJ & Salvesen GS (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:405-413.
10. Li P, et al. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
11. Itoh N, et al. (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66:233-243.
12. Nagata S (1999) Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* 33:29-55.
13. Krammer PH, Arnold R, & Lavrik IN (2007) Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 7:532-542.

14. *Strasser A, Jost PJ, & Nagata S (2009) The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. Immunity 30:180-192.*
15. *Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, & Dixit VM (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. J Biol Chem 273:2926-2930.*
16. *Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, & Wallach D (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. Cell 85:803-815.*
17. *Medema JP, et al. (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). EMBO J 16:2794-2804.*
18. *Grenet J, Teitz T, Wei T, Valentine V, & Kidd VJ (1999) Structure and chromosome localization of the human CASP8 gene. Gene 226:225-232.*
19. *Scaffidi C, Medema JP, Krammer PH, & Peter ME (1997) FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. J Biol Chem 272:26953-26958.*
20. *Barnhart BC, Lee JC, Alappat EC, & Peter ME (2003) The death effector domain protein family. Oncogene 22:8634-8644.*
21. *Lavrik IN, Golks A, & Krammer PH (2005) Caspases: pharmacological manipulation of cell death. J Clin Invest 115:2665-2672.*
22. *Boatright KM & Salvesen GS (2003) Mechanisms of caspase activation. Curr Opin Cell Biol 15:725-731.*
23. *Boatright KM, et al. (2003) A unified model for apical caspase activation. Mol Cell 11:529-541.*
24. *Peter ME & Krammer PH (2003) The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. Cell Death Differ 10:26-35.*
25. *Martin DA, Siegel RM, Zheng L, & Lenardo MJ (1998) Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. J Biol Chem 273:4345-4349.*
26. *Chang DW, Xing Z, Capacio VL, Peter ME, & Yang X (2003) Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. EMBO J 22:4132-4142.*
27. *Morgan MJ, Kim YS, & Liu ZG (2009) Membrane-bound Fas ligand requires RIP1 for efficient activation of caspase-8 within the death-inducing signaling complex. J Immunol 183:3278-3284.*

28. Donepudi M, Mac SA, Briand C, & Grutter MG (2003) Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell* 11:543-549.
29. Pop C, Fitzgerald P, Green DR, & Salvesen GS (2007) Role of proteolysis in caspase-8 activation and stabilization. *Biochemistry* 46:4398-4407.
30. Jin Z, et al. (2009) Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell* 137:721-735.
31. Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, & Peter ME (2002) Apoptosis-independent functions of killer caspases. *Curr Opin Cell Biol* 14:721-726.
32. Misra RS, et al. (2007) Caspase-8 and c-FLIPL associate in lipid rafts with NF-kappaB adaptors during T cell activation. *J Biol Chem* 282:19365-19374.
33. Koenig A, Russell JQ, Rodgers WA, & Budd RC (2008) Spatial differences in active caspase-8 defines its role in T-cell activation versus cell death. *Cell Death Differ* 15:1701-1711.
34. Desgrosellier JS & Cheresh DA (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10:9-22.
35. Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM, & Cheresh DA (2001) Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol* 155:459-470.
36. Stupack DG, et al. (2006) Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. *Nature* 439:95-99.
37. Barbero S, et al. (2008) Identification of a critical tyrosine residue in caspase 8 that promotes cell migration. *J Biol Chem* 283:13031-13034.
38. Cursi S, et al. (2006) Src kinase phosphorylates Caspase-8 on Tyr380: a novel mechanism of apoptosis suppression. *EMBO J* 25:1895-1905.
39. Finlay D & Vuori K (2007) Novel noncatalytic role for caspase-8 in promoting SRC-mediated adhesion and Erk signaling in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 67:11704-11711.
40. Helfer B, et al. (2006) Caspase-8 promotes cell motility and calpain activity under nonapoptotic conditions. *Cancer Res* 66:4273-4278.
41. Finlay D, Howes A, & Vuori K (2009) Critical role for caspase-8 in epidermal growth factor signaling. *Cancer Res* 69:5023-5029.
42. Finlay D, Howes A, & Vuori K (2009) Caspase-8 as a potential mediator of pro-tumorigenic signals. *Cell Cycle* 8:3441-3442.

43. Mielgo A, et al. (2009) *The death effector domains of caspase-8 induce terminal differentiation. PLoS One 4:e7879.*
44. Mielgo A, Torres VA, Clair K, Barbero S, & Stupack DG (2009) *Paclitaxel promotes a caspase 8-mediated apoptosis through death effector domain association with microtubules. Oncogene 28:3551-3562.*
45. Joseph B, Ekedahl J, Sirzen F, Lewensohn R, & Zhivotovsky B (1999) *Differences in expression of pro-caspases in small cell and non-small cell lung carcinoma. Biochem Biophys Res Commun 262:381-387.*
46. Teitz T, et al. (2000) *Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. Nat Med 6:529-535.*
47. Soung YH, et al. (2005) *CASPASE-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas. Cancer Res 65:815-821.*
48. Soung YH, et al. (2005) *Caspase-8 gene is frequently inactivated by the frameshift somatic mutation 1225_1226delTG in hepatocellular carcinomas. Oncogene 24:141-147.*
49. Kim HS, et al. (2003) *Inactivating mutations of caspase-8 gene in colorectal carcinomas. Gastroenterology 125:708-715.*
50. Mandruzzato S, Brasseur F, Andry G, Boon T, & van der Bruggen P (1997) *A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. J Exp Med 186:785-793.*
51. Stupack DG, et al. (2006) *Potential of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. Nature 439:95-99.*
52. Teitz T, Lahti JM, & Kidd VJ (2001) *Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an important component of programmed cell death. J Mol Med 79:428-436.*
53. Takita J, et al. (2001) *Allelic imbalance on chromosome 2q and alterations of the caspase 8 gene in neuroblastoma. Oncogene 20:4424-4432.*
54. Takita J, et al. (2000) *Absent or reduced expression of the caspase 8 gene occurs frequently in neuroblastoma, but not commonly in Ewing sarcoma or rhabdomyosarcoma. Med Pediatr Oncol 35:541-543.*
55. Teitz T, et al. (2000) *Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. Nat Med 6:529-535.*

56. Teitz T, Stupack DG, & Lahti JM (2006) Halting neuroblastoma metastasis by controlling integrin-mediated death. *Cell Cycle* 5:681-685.
57. Krelin Y, et al. (2008) Caspase-8 deficiency facilitates cellular transformation in vitro. *Cell Death Differ* 15:1350-1355.
58. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, & Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1326-1331.
59. Erhardt P, Schremser EJ, & Cooper GM (1999) B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway. *Mol Cell Biol* 19:5308-5315.
60. Allan LA, et al. (2003) Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nat Cell Biol* 5:647-654.
61. Allan LA & Clarke PR (2007) Phosphorylation of caspase-9 by CDK1/cyclin B1 protects mitotic cells against apoptosis. *Mol Cell* 26:301-310.
62. Alvarado-Kristensson M, et al. (2004) p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils. *J Exp Med* 199:449-458.
63. Cursi S, et al. (2006) Src kinase phosphorylates Caspase-8 on Tyr380: a novel mechanism of apoptosis suppression. *EMBO J* 25:1895-1905.
64. Barr FA, Sillje HH, & Nigg EA (2004) Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:429-440.
65. Petronczki M, Lenart P, & Peters JM (2008) Polo on the Rise-from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *Dev Cell* 14:646-659.
66. Jang YJ, Lin CY, Ma S, & Erikson RL (2002) Functional studies on the role of the C-terminal domain of mammalian polo-like kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1984-1989.
67. Seong YS, et al. (2002) A spindle checkpoint arrest and a cytokinesis failure by the dominant-negative polo-box domain of Plk1 in U-2 OS cells. *J Biol Chem* 277:32282-32293.
68. Elia AE, et al. (2003) The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* 115:83-95.

69. Elia AE, Cantley LC, & Yaffe MB (2003) Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science* 299:1228-1231.
70. Neef R, et al. (2007) Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1. *Nat Cell Biol* 9:436-444.
71. Lee KS, et al. (2008) Mechanisms of mammalian polo-like kinase 1 (Plk1) localization: self- versus non-self-priming. *Cell Cycle* 7:141-145.
72. Johnson EF, Stewart KD, Woods KW, Giranda VL, & Luo Y (2007) Pharmacological and functional comparison of the polo-like kinase family: insight into inhibitor and substrate specificity. *Biochemistry* 46:9551-9563.
73. Yamaguchi T, et al. (2005) Phosphorylation by Cdk1 induces Plk1-mediated vimentin phosphorylation during mitosis. *J Cell Biol* 171:431-436.
74. Hanisch A, Wehner A, Nigg EA, & Sillje HH (2006) Different Plk1 functions show distinct dependencies on Polo-Box domain-mediated targeting. *Mol Biol Cell* 17:448-459.
75. Lowery DM, Lim D, & Yaffe MB (2005) Structure and function of Polo-like kinases. *Oncogene* 24:248-259.
76. Fabbro M, et al. (2005) Cdk1/Erk2- and Plk1-dependent phosphorylation of a centrosome protein, Cep55, is required for its recruitment to midbody and cytokinesis. *Dev Cell* 9:477-488.
77. Rauh NR, Schmidt A, Bormann J, Nigg EA, & Mayer TU (2005) Calcium triggers exit from meiosis II by targeting the APC/C inhibitor XErp1 for degradation. *Nature* 437:1048-1052.
78. Neef R, et al. (2003) Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *J Cell Biol* 162:863-875.
79. Nakajima H, Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, & Nishida E (2003) Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate. *J Biol Chem* 278:25277-25280.
80. Johnson EF, Stewart KD, Woods KW, Giranda VL, & Luo Y (2007) Pharmacological and functional comparison of the polo-like kinase family: insight into inhibitor and substrate specificity. *Biochemistry* 46:9551-9563.

81. Malumbres M & Barbacid M (2005) Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30:630-641.
82. Matthess Y, et al. (2005) Conditional inhibition of cancer cell proliferation by tetracycline-responsive, H1 promoter-driven silencing of PLK1. *Oncogene* 24:2973-2980.
83. Kappel S, Matthess Y, Kaufmann M, & Strebhardt K (2007) Silencing of mammalian genes by tetracycline-inducible shRNA expression. *Nat Protoc* 2:3257-3269.
84. Yuan J, et al. (2004) Cyclin B1 depletion inhibits proliferation and induces apoptosis in human tumor cells. *Oncogene* 23:5843-5852.
85. Hunter T (2000) Signaling--2000 and beyond. *Cell* 100:113-127.
86. Strebhardt K & Ullrich A (2006) Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 6:321-330.
87. Malumbres M & Barbacid M (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9:153-166.
88. Muzio M, et al. (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85:817-827.
89. Wang M, Zhang Z, Tian Y, Shao J, & Zhang Z (2009) A six-nucleotide insertion-deletion polymorphism in the CASP8 promoter associated with risk and progression of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 15:2567-2572.
90. Sun T, et al. (2007) A six-nucleotide insertion-deletion polymorphism in the CASP8 promoter is associated with susceptibility to multiple cancers. *Nat Genet* 39:605-613.
91. Chun HJ, et al. (2002) Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 419:395-399.
92. Liu B, Peng D, Lu Y, Jin W, & Fan Z (2002) A novel single amino acid deletion caspase-8 mutant in cancer cells that lost proapoptotic activity. *J Biol Chem* 277:30159-30164.
93. Kamimatsuse A, et al. (2009) Detection of CpG island hypermethylation of caspase-8 in neuroblastoma using an oligonucleotide array. *Pediatr Blood Cancer* 52:777-783.
94. Malekzadeh K, et al. (2009) Methylation patterns of Rb1 and Casp-8 promoters and their impact on their expression in bladder cancer. *Cancer Invest* 27:70-80.

95. Yang Q, et al. (2007) Methylation of CASP8, DCR2, and HIN-1 in neuroblastoma is associated with poor outcome. *Clin Cancer Res* 13:3191-3197.
96. Martinez R, et al. (2007) CpG island promoter hypermethylation of the pro-apoptotic gene caspase-8 is a common hallmark of relapsed glioblastoma multiforme. *Carcinogenesis* 28:1264-1268.
97. Harada K, et al. (2002) Deregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines. *Cancer Res* 62:5897-5901.
98. Barbero S, et al. (2008) Identification of a critical tyrosine residue in caspase 8 that promotes cell migration. *J Biol Chem* 283:13031-13034.
99. Barbero S, et al. (2009) Caspase-8 association with the focal adhesion complex promotes tumor cell migration and metastasis. *Cancer Res* 69:3755-3763.
100. Fu Z, et al. (2008) Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression. *Nat Cell Biol*.
101. Zhang X, et al. (2009) Sequential phosphorylation of Nedd1 by Cdk1 and Plk1 is required for targeting of the gammaTuRC to the centrosome. *J Cell Sci* 122:2240-2251.
102. Andersen JL, et al. (2009) Restraint of apoptosis during mitosis through interdomain phosphorylation of caspase-2. *EMBO J* 28:3216-3227.
103. Yuan J, et al. (2006) Stable gene silencing of cyclin B1 in tumor cells increases susceptibility to taxol and leads to growth arrest in vivo. *Oncogene* 25:1753-1762.
104. Kim HJ, et al. (2009) Intracellular cleavage of osteopontin by caspase-8 modulates hypoxia/reoxygenation cell death through p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:15326-15331.
105. Fulda S, et al. (2001) Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 20:5865-5877.
106. Fulda S & Debatin KM (2006) 5-Aza-2'-deoxycytidine and IFN-gamma cooperate to sensitize for TRAIL-induced apoptosis by upregulating caspase-8. *Oncogene* 25:5125-5133.
107. Johnsen JI, et al. (2004) Synergistic induction of apoptosis in neuroblastoma cells using a combination of cytostatic drugs with interferon-gamma and TRAIL. *Int J Oncol* 25:1849-1857.

108. Langaas V, Shahzidi S, Johnsen JI, Smedsrod B, & Sveinbjornsson B (2001) Interferon-gamma modulates TRAIL-mediated apoptosis in human colon carcinoma cells. *Anticancer Res* 21:3733-3738.
109. Ruiz-Ruiz C, et al. (2004) The up-regulation of human caspase-8 by interferon-gamma in breast tumor cells requires the induction and action of the transcription factor interferon regulatory factor-1. *J Biol Chem* 279:19712-19720.
110. Fulda S & Debatin KM (2002) IFN-gamma sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway. *Oncogene* 21:2295-2308.
111. Lissat A, et al. (2007) Interferon-gamma sensitizes resistant Ewing's sarcoma cells to tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by up-regulation of caspase-8 without altering chemosensitivity. *Am J Pathol* 170:1917-1930.
112. Hacker S, et al. (2009) Histone deacetylase inhibitors cooperate with IFN-gamma to restore caspase-8 expression and overcome TRAIL resistance in cancers with silencing of caspase-8. *Oncogene* 28:3097-3110.
113. Wood TE, et al. (2010) Selective inhibition of histone deacetylases sensitizes malignant cells to death receptor ligands. *Mol Cancer Ther* 9:246-256.

Persönliche Daten

Yves Matthess
Einhardstraße 8
36039 Fulda
Mail: yvesmatthess@gmail.com
Geboren am 13. Januar 1975 in Wittenberg
verheiratet, 1 Kind

Institutsadresse

Universitätsklinikum Frankfurt
Zentrum für Gynäkologie und Frauenheilkunde
Institut für Molekulare Gynäkologie
Theodor-Stern-Kai 7
60590 Frankfurt/Main
Tel: 069-630183674
Fax: 069-63016144

Kurzprofil

Angestrebter Abschluss: Dr. phil. nat. im Fachbereich der Biowissenschaften
in Frankfurt am Main
Diplom der Biologie an der Johann Wolfgang -Goethe Universität Frankfurt am Main

Studium und Ausbildung

05/2005 – heute J.W. Goethe -Universität, Universitätsklinikum
 Institut für Molekulare Gynäkologie

 Promotion der Biowissenschaften
 Thema: „Funktionelle Studien zur Hemmung der Apoptose in
 mitotischen Zellen“

Methoden der Molekulares Klonieren, PCR, „Site-Directed-Mutagenesis“
Molekularbiologie QT PCR, Northern Blot von mRNA/siRNA, Southern Blot,
 shRNA Klonierung, humane Zellkultur, Mikroskopie,
 Immunfluoreszenz, transiente und stabile Transfektion,
 siRNA/shRNA, Western Blot, Coimmunpräzipitation,

bakterielle Proteinexpression, Pull Down, Bioinformatik

06/2004 - 02/2005 Diplom der Johann Wolfgang Goethe -Universität
Title: „Etablierung eines konditionellen
RNAi Systems zur Hemmung von Onkoproteinen“

10/1997 - 05/2005 Studium der Biologie und Informatik
an der J.W. Goethe -Universität Frankfurt/Main

01/1996 – 07/1997 Bundeswehrdienst: Marinewaffenschule und
Marineabschnittskommando Nord

05/1995 Abitur an der Elisabethenschule in Frankfurt am Main

Bioinformatik

03/2004- 05/2004 Zusammenarbeit mit dem "Fraunhofer-Institut" und dem
"Beilstein-Institut"
Java Implementierung eines graphischen Benutzer-Interfaces
zur Darstellung von „Pharmakophor“ Modellen.

09/2007 - heute Aufbau und Pflege der Internetpräsenz der Molekularen
Gynäkologie

Implementierung einer Webapplikation zur Vorhersage von
shRNA-Sequenzen unter Verwendung verschiedener Internet-
Technologien (HTML, CSS und Java, serverseitig)
<http://www.molgyn.kgu.de>

Informatik

04/2005 - 02/2010 Implementierung und Betreuung verschiedener
Internetpräsenzen

Außeruniversitäres Engagement

01/1998 - heute Trainer Kunstturnen im Leistungszentrum Frankfurt

01/2008 - heute 2. Vorsitzender der KTV Fulda-Werra-Rhön

Besondere Kenntnisse

Sprachen	Englisch
Programmierung	Sehr gute Kenntnisse in: <ul style="list-style-type: none">• Java, JSP• HTML, CSS,• PHP, JavaScript, Ajax• Wordpress, Typo3
Werkzeuge	Netbeans Illustrator/Inkscape, Photoshop/Gimp
Server	Apache, Tomcat, Glassfish
Datenbanken	MySQL
Betriebssysteme	Windows, Linux, Mac OS

Lehrtätigkeiten

2008 - 2010 Dozent an der staatlichen Schule für die MTA Ausbildung in Frankfurt am Main im Fach Molekularbiologie

Sonstiges

1992 - 2008	Mehrfacher Hessenmeister im Kunstturnen
1994	Deutscher Vizemeister im Kunstturnen
1997	Erhalt der Ehrenmedaille der Bundeswehr für besondere

Leistungen

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den 19. 02. 2010

Yves Matthess

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Funktionelle Studien zur Hemmung der Apoptose in mitotischen Zellen“

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht benutzt habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nichtausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nichtstattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den 19. 02. 2010

Yves Matthes