

Aus dem Institut für Immunologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich Kabelitz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian–Albrechts-Universität zu Kiel

Untersuchungen zur Induktion von nicht-apoptotischem, reguliertem Zelltod als mögliche Strategie in der Krebstherapie

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Johannes Plenge

aus **Zeven**

Kiel 2018

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

Prof. Dr. Dieter Adam, Institut für Immunologie

Prof. Dr. Susanne Sebens, Institut für Experimentelle
Tumorforschung

22.10.2018

22.10.2018

gez.: Prof. Dr. Christof Dörfer
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

1 Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INHALTSVERZEICHNIS | 1 |
| 2 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 3 |
| 3 | EINLEITUNG | 6 |
| 3.1 | PATHOPHYSIOLOGIE MALIGNER NEOPLASIEN | 6 |
| 3.2 | REGULIERTER ZELLTOD..... | 7 |
| 3.2.1 | <i>Apoptose</i> | 8 |
| 3.2.2 | <i>Nekroptose</i> | 9 |
| 3.2.3 | <i>Autophagie</i> | 11 |
| 3.2.4 | <i>PARP-1 vermittelte regulierte Nekrose: Parthanatos</i> | 14 |
| 3.3 | GEGENSEITIGE REGULATION DER ZELLTODPROGRAMME | 15 |
| 3.4 | TRAIL-REZEPTOR AGONISTEN IN DER THERAPIE MALIGNER TUMOREN..... | 17 |
| 3.5 | PH-HOMÖOSTASE IN DER PATHOPHYSIOLOGIE MALIGNER TUMOREN..... | 18 |
| 3.6 | AUTOPHAGIE-MODULATOREN IN DER KREBSTHERAPIE | 19 |
| 3.7 | TANKYRASE ALS ZIELSTRUKTUR IN DER KREBSTHERAPIE..... | 21 |
| 3.8 | ALGEN-EXTRAKTE IN DER KREBSTHERAPIE..... | 23 |
| 4 | FRAGESTELLUNG DER ARBEIT | 25 |
| 5 | MATERIAL UND METHODIK | 27 |
| 5.1 | LABORGERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN | 27 |
| 5.2 | VERWENDETE STIMULI UND INHIBITOREN..... | 28 |
| 5.3 | ZELLKULTUR..... | 28 |
| 5.4 | LEBENDZELLZÄHLUNG | 30 |
| 5.5 | SELEKTION GENETISCH VERÄNDERTER ZELLINIEN | 30 |
| 5.6 | SIRNA-TRANSFEKTION | 30 |
| 5.7 | HERSTELLUNG VON ZELLYSATEN | 31 |
| 5.8 | BESTIMMUNG DES PROTEINGEHALTES | 31 |
| 5.9 | SDS-PAGE | 32 |
| 5.10 | WESTERN BLOT..... | 32 |
| 5.11 | ZELLTODASSAY MITTELS INTRAZELLULÄRER ATP-MESSUNG..... | 33 |
| 5.12 | ZELLTODASSAY MITTELS PROPIDIUM-IODID FÄRBUNG UND DURCHFLUSSZYTOMETRIE | 33 |
| 5.13 | INTRAZELLULÄRE PH-WERT MESSUNG..... | 34 |
| 6 | ERGEBNISSE | 35 |
| 6.1 | DIE EFFEKTIVITÄT DES TRAIL-REZEPTOR AGONISTEN APG 350 IST MIT DER VON KILLERTRAIL VERGLEICHBAR..... | 35 |
| 6.2 | KOSTIMULATION MIT CARIPORID HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE NEKROPTOSE-RATE..... | 38 |
| 6.3 | OMEPRAZOL IST ZELLINIENABHÄNGIG IN DER LAGE DIE NEKROPTOSE LEICHT ZU STEIGERN | 41 |
| 6.4 | NEKROPTOSE UND AUTOPHAGIE SIND ALS VONEINANDER UNABHÄNGIGE ZELLTODPROGRAMME ZU BETRACHTEN | 43 |
| 6.5 | HERRUNTERREGULATION VON ATG5 BIETET KEINEN SCHUTZ VOR TRAIL-VERMITTELTEN NEKROPTOSE | 45 |
| 6.6 | INDUKTION VON AUTOPHAGIE DURCH RAPAMYCIN UND OBATOCLAX FÜHRT ZELLINIENABHÄNGIG ZU EINER GESTEIGERTEN NEKROPTOSERATE | 47 |
| 6.7 | PARP-HERRUNTERREGULATION HAT KEINE STEIGERUNG DER TRAIL-VERMITTELTEN NEKROPTOSE ZUR FOLGE..... | 50 |
| 6.8 | DIE PARP1-INHIBITOREN ABT-888 UND OLAPARIB ERHÖHEN ZELLINIENABHÄNGIG DAS ANSPRECHEN AUF TRAIL-VERMITTELTEN NEKROPTOSE..... | 52 |
| 6.9 | INHIBITION DER TANKYRASE-AKTIVITÄT DURCH XAV-939 UND WIKI4 FÜHRT ZELLINIENABHÄNGIG ZU EINER STEIGERUNG DER TRAIL-VERMITTELTEN NEKROPTOSE..... | 55 |
| 6.10 | DER DURCH DEN ALGENWIRKSTOFF Fv1 VERMITTELTEN ZELLTOD BLEIBT UNGEKLÄRT..... | 57 |
| 7 | DISKUSSION | 60 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 7.1 | INDUKTION VON NEKROPTOSE DURCH TRAIL REZEPTOR AGONISTEN..... | 60 |
| 7.2 | PH-WERT EINFLÜSSE AUF DIE NEKROPTOSE-THERAPIE..... | 61 |
| 7.3 | EINFLÜSSE VON AUTOPHAGIE-MODULATOREN AUF DIE TRAIL-VERMITTELTE NEKROPTOSE..... | 64 |
| 7.4 | EINFLÜSSE VON PARP AUF DIE TRAIL-VERMITTELTE NEKROPTOSE..... | 66 |
| 7.5 | TANKYRASE-INHIBITION IN DER KREBSTHERAPIE | 69 |
| 7.6 | DER ALGENEXTRAKT FV1 IN DER KREBSTHERAPIE | 70 |
| 8 | ZUSAMMENFASSUNG | 72 |
| 9 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 74 |
| 10 | DANKSAGUNG | 83 |
| 11 | PUBLIKATIONEN: | 84 |
| 12 | LEBENS LAUF..... | 85 |
| 13 | EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG..... | 86 |

2 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|--|
| AIF | <i>Apoptosis inducing factor</i> |
| APAF1 | <i>Apoptotic protease activating factor 1</i> |
| APC | <i>Adenomatous-polyposis-coli</i> |
| ASMase | <i>Acid sphingomyelinase</i> |
| ATG | Autophagie-Gen |
| ATM | <i>ataxia-telangiectasia mutated</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AXIN | <i>Axis inhibition protein</i> |
| BAK | <i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i> |
| BAX | Bcl-2-associated X protein |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| BCECF-AM | 2',7'-Bis-(2-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein tetrakis (acetoxymethyl) ester |
| Bcl-2 | <i>B-cell lymphoma 2</i> |
| Bcl-xL | <i>B-cell lymphoma-extra large</i> |
| Bid | <i>BH3 interacting-domain death agonist</i> |
| BRCA | <i>Breast Cancer</i> |
| CypA | Cyclophilin A |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| CHX | Cycloheximid |
| CXCR4 | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 |
| Da | Dalton |
| DIABLO | <i>Direct IAP binding protein with low pI</i> |
| DISC | <i>Death-induced signaling complex</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DR | <i>Death receptor</i> |
| Drp1 | <i>Dynamine related protein 1</i> |
| E-Cadherin | Epitheliales Cadherin |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |

| | |
|-----------|---|
| ERK | <i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i> |
| FADD | <i>Fas-Associated protein with Death Domain</i> |
| FASL | FAS Ligand |
| Fc | <i>Fragment crystallisable</i> |
| FLIP | <i>FLICE-like inhibitory protein</i> |
| GSK-3 | Glykogensynthase-Kinase 3 |
| HIF-1 | <i>Hypoxia inducible factor 1</i> |
| HIV | Humanes Immundefizienz-Virus |
| HMGB1 | <i>High mobility group box 1</i> |
| IAP | <i>Inhibitor of apoptosis</i> |
| Ig | Immunglobulin |
| JNK | c-Jun N-terminale Kinase |
| LRP | <i>Lipoprotein receptor-related protein</i> |
| MEF | Mausembryonalfibroblasten |
| MIF | <i>Migration inhibitory factor</i> |
| MLKL | <i>Mixed lineage kinase domain-like protein</i> |
| MMP | Matrix-Metallo-Protease |
| mPTP | <i>Mitochondrial permeability transition pore</i> |
| mTOR | <i>Mammalian target of rapamycin</i> |
| NAD | Nicotinamidadenindinukleotid |
| Nec-1 | Necrostatin-1 |
| NF-κB | <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> |
| NHE-1 | <i>Sodium/hydrogen exchanger 1</i> |
| NK-Zellen | natürliche Killerzellen |
| Nrf2 | <i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i> |
| NSA | Necrosulfonamid |
| NUMA | <i>Nuclear mitotic apparatus protein</i> |
| PAR | Poly-ADP-Ribose |
| PARP1 | Poly-ADP-Ribose Polymerase 1 |
| PAS | Präautophagosomale Struktur |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> |

| | |
|----------|---|
| PGAM5 | <i>Phosphoglycerate mutase family member 5</i> |
| pHe | extrazellulärer pH-Wert |
| pHi | intrazellulärer pH-Wert |
| PI | Propidiumiodid |
| PI3-K | Phosphoinositid-3-Kinase |
| RB | Retinoblastom-Protein |
| RIP | <i>Receptor-interacting protein</i> |
| RLU | <i>Relative Light Units</i> |
| ROS | <i>Reactive oxygen species</i> |
| RZT | regulierter Zelltod |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| siRNA | <i>Small interfering RNA</i> |
| SIRT2 | <i>NAD-dependent deacetylase sirtuin-2</i> |
| Smac | <i>Second mitochondria-derived activator of caspases</i> |
| tBid | <i>Truncated BH3 interacting-domain death agonist</i> |
| TH1 | T-Helferzelle Typ1 |
| TLR | <i>Toll-like receptor</i> |
| TNF | Tumor-Nekrose-Faktor |
| TRAF2 | <i>TNF receptor-associated factor 2</i> |
| TRAIL | <i>Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand</i> |
| TRF1 | <i>Telomeric Repeat binding Factor 1</i> |
| UVRAG | <i>UV radiation resistance-associated gene protein</i> |
| VEGF | <i>Vascular endothelial growth factor</i> |
| z. B. | zum Beispiel |
| zVAD-fmk | Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketone |

3 Einleitung

3.1 Pathophysiologie maligner Neoplasien

Unter einer malignen Neoplasie versteht man eine bösartige Gewebeneubildung, die auf der unkontrollierten Zellteilung einer entarteten Zelle beruht. Es kommt dabei zur Verdrängung des gesunden Gewebes und somit zur Schädigung des Organismus. Zur Verdeutlichung der komplexen Vorgänge, die zur bösartigen Entartung einer Zelle führen, definierten Hanahan und Weinberg im Jahr 2000 die sechs Kennzeichen der Krebserkrankungen, welche sie 2011 noch um weitere vier Kriterien erweiterten (Hanahan und Weinberg 2011). Im Folgenden sollen diese Kennzeichen kurz erläutert werden.

Krebszellen sind in der Lage proliferative Signale dauerhaft aufrecht zu erhalten, welche in gesundem Gewebe nur sehr dosiert angewendet werden. Dies kann auf verschiedenen Wegen geschehen, durch Produktion von Wachstumshormonen durch die Krebszellen selbst (autokrine Stimulation), durch Stimulation von Nachbarzellen zur Produktion von Wachstumshormonen, Erhöhung der Dichte von Wachstumshormonrezeptoren oder durch Mutationen, die zur Daueraktivierung der intrazellulären Signalwege führen, welche den Wachstumshormonrezeptoren nachgeschaltet sind.

Ein weiteres Kennzeichen ist das Umgehen von Mechanismen, die der Wachstums- und Proliferationshemmung dienen. Typische Beispiele sind Mutationen, die zum Funktionsverlust der Proteine RB und p53 führen. Beide Proteine haben eine Schlüsselrolle in der Kontrolle des Zellzyklus inne.

Grundlage für das Überleben entarteter Zellen ist die Resistenz gegenüber der Apoptose. Durch Mutationen ist der physiologische Signalweg zum Entledigen fehlerhafter Zellen gestört. Typische Beispiele für solche Mutationen sind die Überexpression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 oder Bcl-XL.

Gesunde Zellen haben eine begrenzte Möglichkeit zur Proliferation, denn mit jeder Zellteilung verkürzen sich die Telomerenden der Chromosomen. Maligne Zellen hingegen sind immortalisiert, das heißt die Anzahl an Zellteilungen ist unbegrenzt. Dies ist vor allem auf Telomeraseaktivität in Tumorzellen zurückzuführen, welche die Telomerenden verlängert.

Eine weitere Eigenschaft maligner Zellen ist die Fähigkeit zur Angiogenese. Um den O₂ und Nährstoffbedarf sowie den Abtransport von Stoffwechselprodukten in einem wachsenden Zellkonglomerat sicherzustellen, bedarf es der Neubildung von Gefäßen. Dies erreichen Krebszellen z. B. durch die Bildung von VEGF.

Die letzte der sechs Kernvoraussetzungen maligner Zellen ist die Möglichkeit zur Invasion und Metastasierung. Zu diesem Zweck ist die Interaktion von Krebszellen mit der Extrazellulärmatrix verändert. Ein Beispiel dafür ist der Verlust von E-Cadherin, einem Protein, mit dem sich gesunde Zellen in der Extrazellulärmatrix verankern.

Zu den 2011 hinzugefügten vier Kriterien gehören zwei Eigenschaften, die die Entwicklung der oben genannten sechs Kriterien stark begünstigen, nämlich die Genom-Instabilität und die Entzündungsreaktion. Durch Genom-Instabilität, wie beispielsweise durch Funktionsverlust von DNA-Reparatur-Mechanismen, werden weitere kanzerogene Mutationen begünstigt. Die oft anzutreffende Entzündungsreaktion im Tumorgewebe geht mit der Ausschüttung von Wachstumsfaktoren durch Immunzellen einher, die die Angiogenese und Zellproliferation fördern. Die übrigen beiden Kennzeichen maligner Zellen sind nicht zwingend erforderlich, jedoch oft bei bösartigen Zellen anzutreffen. Zum einen ist es die Resistenz gegenüber der Immunabwehr (NK-Zellen, CD8⁺-Zellen, CD4⁺-Zellen, TH1-Zellen) und zum anderen der veränderte Energiestoffwechsel mit Bevorzugung der Glykolyse, welche Wachstum auch im sauerstoffarmen Gewebe ermöglicht.

Jedes der zehn genannten Kriterien ist mittlerweile Angriffspunkt in der Krebstherapie. Diese Arbeit setzt sich vor allem mit der Überwindung der Resistenz gegenüber reguliertem Zelltod auseinander und untersucht die Auswirkung von Telomeraseinhibition.

3.2 Regulierter Zelltod

Die Balance des Zellumsatzes ist für die Struktur und Funktion des menschlichen Körpers von entscheidender Bedeutung. So muss sich der Erhalt wichtiger funktionstüchtiger Zellen die Waage halten mit dem Entledigen von überflüssigen oder potenziell den Organismus schädigenden Zellen wie beispielsweise malignen oder Virus-infizierten Zellen. Die wichtigste Stellschraube dieser Zellhomöostase stellt der regulierte Zelltod (RZT) dar. Diese Tatsache wird insbesondere dann deutlich, wenn der RZT fehlerhaft verläuft. Eine Dysregulation im Sinne eines verstärkt ablaufenden RZT führt je nach betroffener Zelllinie zu verschiedenen chronisch degenerativen Erkrankungen, die ein hohes Maß an Morbidität und Mortalität mit sich bringen. Diabetes und neurodegenerative Erkrankungen sind dabei wichtige Beispiele (Degterev und Yuan 2008). Ebenso problematisch ist eine Hemmung oder ein gestörter Ablauf der Zelltodprogramme, so gehört Resistenz gegenüber RZT zu den zehn von Hanahan und Weinberg definierten Kennzeichen maligner Zellen (Hanahan und Weinberg 2011).

In der Vergangenheit wurde der regulierte Zelltod oft mit dem Begriff Apoptose gleichgesetzt und lediglich von der Nekrose unterschieden. Unter Nekrose verstand man dabei einen unregulierten Zelluntergang in Folge von übermäßigem, physikalischem Stress (Vandenabeele et al. 2010). Beide Zelltodformen konnten im Hinblick auf morphologische aber auch funktionelle Unterschiede im Ablauf

voneinander differenziert werden. So definierte man die Caspase-Aktivität als kennzeichnend für die Apoptose. Spätere Untersuchungen zeigten jedoch, dass regulierter Zelltod auch bei Caspase-defizienten Zellen möglich war (Oppenheim et al. 2001). Zudem entdeckte man regulierten Zelltod mit morphologischen Eigenschaften der Nekrose, weshalb der Begriff programmierte Nekrose (Nekroptose) geprägt wurde. In Folge dieser Erkenntnisse rückte man daher von dem Standpunkt ab, dass die Caspase-vermittelte Apoptose die einzige Form des regulierten Zelltods sei. Aktuell werden unter dem Oberbegriff regulierter Zelltod die Unterformen Apoptose, Nekroptose, Autophagie-assoziiertes Zelltod, Parthanatos, sowie weitere Formen der regulierten Nekrose, wie Ferroptose, Oxytose, ETose, NETose, Cyclophilin-D-vermittelte Nekrose, Pyroptose und Pyronekrose zusammengefasst. (Vanden Berghe et al. 2014) Im Folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Formen von reguliertem Zelltod näher erläutert.

3.2.1 Apoptose

Apoptose entspricht dem Regelfall des regulierten Zelltodes und stellt dessen am längsten bekannte und am besten verstandene Unterform dar. Schon früh wurden die morphologischen Charakteristika der Apoptose definiert als Kernfragmentierung sowie die Bildung von Membranbläschen bis hin zu apoptotischen Körperchen (Zeng et al. 2015). Wichtigstes biochemisches Korrelat der Apoptose ist die Aktivierung der Caspase-Kaskade. Bei Caspasen handelt es sich um Cystein-Proteasen, welche ihre Substrate hinter der Aminosäure Aspartat schneiden. Der Mensch besitzt elf verschiedene Caspase-Typen welche sich funktionell einteilen lassen in Aktivator-, Effektor- sowie inflammatorische Caspasen. Die Aktivierung dieser Kaskade kann sowohl intrinsisch, als Folge von DNA-Schädigung, Ausbleiben von Überlebenssignalen oder anderen Formen von Zellstress, als auch extrinsisch durch Aktivierung der Todesrezeptoren durch proapoptotische und proinflammatorische Zytokine wie FAS-Ligand (FASL), Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) erfolgen (Schulze-Osthoff et al. 1998). In Folge der Todesrezeptoraktivierung kommt es intrazellulär zur Formation von death-inducing signaling complexes (DISCs), welche wiederum die Aktivator-Caspase 8 aktivieren (Micheau und Tschopp 2003). Caspase 8 in ihrer Rolle als Aktivatorcaspase setzt dann die Kaskade in Gang. Bei der intrinsischen Apoptose-Induktion kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranraum des Mitochondriums, was wiederum zusammen mit APAF1 und Caspase 9 zur Formation des Apoptosoms mit Caspase-Aktivierung führt (siehe Abbildung 1) (Nagata und Tanaka 2017).

Reguliert wird der intrinsische Signalweg der Apoptose vornehmlich durch Proteine der Bcl-2-Familie. Deren wichtigste proapoptotische Vertreter sind BAX und BAK, welche die Cytochrom C Freisetzung aus dem Mitochondrium begünstigen. Wichtige antiapoptotische Gegenspieler sind Bcl-2 und Bcl-xL, die durch Inhibition von BAX und BAK wirken (Degterev und Yuan 2008). Veränderungen dieser

komplexen Signalkaskade und ihrer regulatorischen Proteine finden sich gehäuft in malignen Zellen. BAX- und BAK- Überexpression sowie Bcl-2-, Bcl-xL- und Caspase-Herunterregulation/-Defekte sind häufige Beispiele dafür (Hanahan und Weinberg 2011).

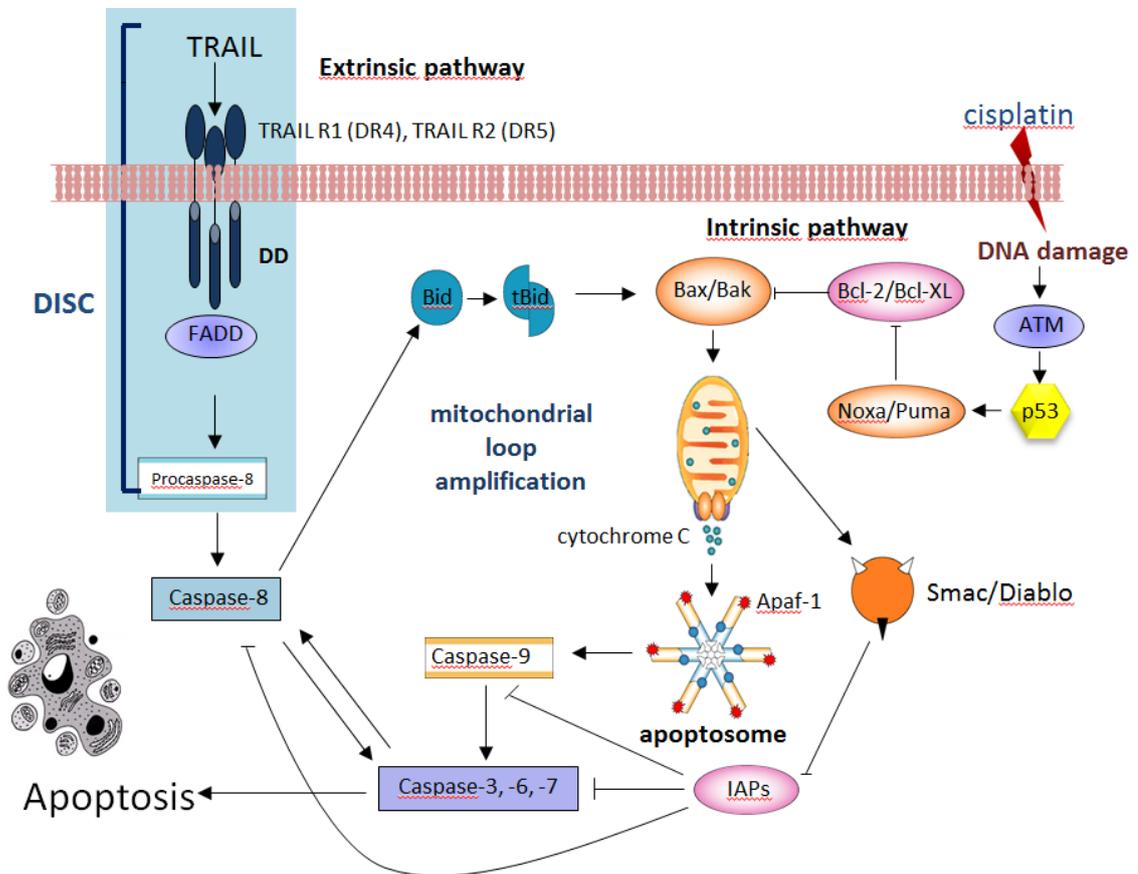


Abbildung 1: Signalwege der Apoptose. Auf dem extrinsischen Signalweg kommt es zur Aktivierung von Todesrezeptoren durch extrazelluläre Liganden, in diesem Beispiel durch Bindung von TRAIL an TRAIL-Rezeptor 1 oder 2. In Folge dessen kommt es zur Aktivierung des DISC durch Interaktion des aktivierten Todesrezeptors mit dem Adapterprotein FADD und Procaspase-8. Die aktivierte Caspase-8 spaltet Bid zu tBid, welches BAX und BAK aktiviert. Auf dem intrinsischen Signalweg kommt es zur DNA-Schädigung, in diesem Beispiel verursacht durch das Chemotherapeutikum Cisplatin, und in Folge dessen über ATM zur Aktivierung von p53. p53 fördert die Transkription der Proteine Noxa und Puma, welche die Wirkung der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL aufheben. Es kommt zum Wegfall der Hemmung auf BAX und BAK. Auf der gemeinsamen Endstrecke der Apoptose führen BAX und BAK zur Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium, welches die Zusammensetzung des Apoptosoms bewirkt. Smac- und Diablo-Moleküle hemmen die Apoptose-inhibitorischen IAPs. Dies führt zur Aktivierung von Caspase-9, welche dann die weiteren Effektorcaspasen Caspase-3, -6 und -7 aktiviert. (Goncharenko-Khaider et al. 2013)

3.2.2 Nekroptose

Unter Nekroptose versteht man eine Form des regulierten Zelltodes mit morphologischen Eigenschaften der Nekrose wie Anschwellen der Organellen, rasche mitochondriale Dysfunktion und Verlust der Membranintegrität. Der Beginn des Nekroptosesignalweges entspricht dem extrinsischen Weg der Apoptose durch Aktivierung von Todesrezeptoren durch die Liganden FASL, TNF oder TRAIL. Bleibt in Folge dessen die Aktivierung von Caspase 8 aus, z. B. durch Anwesenheit von Caspase-Inhibitoren oder einen Caspase 8 Gendefekt, kommt es zur Nekroptose (Grootjans et al. 2017). Insofern liegt ein alternativer Signalweg zur Absicherung des Zelltodes vor. Bekannt ist, dass diese Absicherung z. B. im Falle von Virusinfektionen benötigt wird, da verschiedene virale Proteine in der

Lage sind Caspasen zu inhibieren, um die Apoptose der Wirtszelle zu verhindern (Grootjans et al. 2017; Callus und Vaux 2007)

Nach Aktivierung der Todesrezeptoren kommt es zur Bindung von Fas-associated-protein with death domain (FADD) sowie RIP1. RIP1 kommt bei der Todesrezeptor-vermittelten Nekroptose eine essentielle Bedeutung zu. So konnte gezeigt werden, dass sich durch Inhibition von RIP1 durch Necrostatin-1 (Nec-1) der Ablauf der Nekroptose unterdrücken ließ (Voigt et al. 2014). RIP1 aktiviert und bindet RIP3, was wiederum das mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL) durch Phosphorylierung rekrutiert (siehe Abbildung 2). Aktiviertes MLKL bildet daraufhin Oligomere, welche sich mit der Zellmembran verbinden und deren Integrität auf bisher ungeklärte Art und Weise zerstören. Dies führt letztendlich zum nekroptotischen Zelltod. Neben der Todesrezeptor-vermittelten Nekroptose existieren noch weitere Formen, z. B. die Nekroptose nach Aktivierung von Toll-like Rezeptoren. In diesem Fall läuft die Signalkaskade unabhängig von RIP1 ab. Als essentielle Schlüsselproteine der Nekroptose gelten daher RIP3 und MLKL, die auch als Nekrosom zusammengefasst werden (Galluzzi et al. 2017; Grootjans et al. 2017).

Ebenfalls kommt es im Verlauf der Nekroptose zum Zerfall weiterer Organellen wie dem Endoplasmatischen Retikulum. Die Freisetzung von großen Mengen Ca^{2+} -Ionen wiederum aktiviert Calpain-Proteasen, welche zahlreiche intrazelluläre Proteine spalten. Auch die Permeabilität lysosomaler Membranen wird erhöht. Entscheidend für diesen Schritt scheinen Ceramide zu sein, die abhängig von der sauren Sphingomyelinase (ASMase) lysosomal produziert werden. So konnte in Versuchen durch Inhibition der ASMase eine Nekroptose-Protektion erzielt werden (Voigt et al. 2014; Thon et al. 2005). Der Zerfall lysosomaler Membranen führt zur Freisetzung von Cathepsinen, die die Degradierung intrazellulärer Proteine weiter vorantreiben (Yamashima 2004).

In der Endstrecke der Nekroptose kommt es zum Zerfall der Zelle. Begleitend führt dies zu einer Freisetzung von high mobility group box 1 (HMGB1, Amphoterin), einem Protein, das freie DNA bindet und über Aktivierung verschiedener Rezeptoren wie TLR-2 und TLR-4 zur Rekrutierung von Entzündungszellen führt. Ebenso wie Nekrose führt Nekroptose demnach zu einer inflammatorischen Reaktion, was einen Unterschied zur Apoptose darstellt (Kaczmarek et al. 2013).

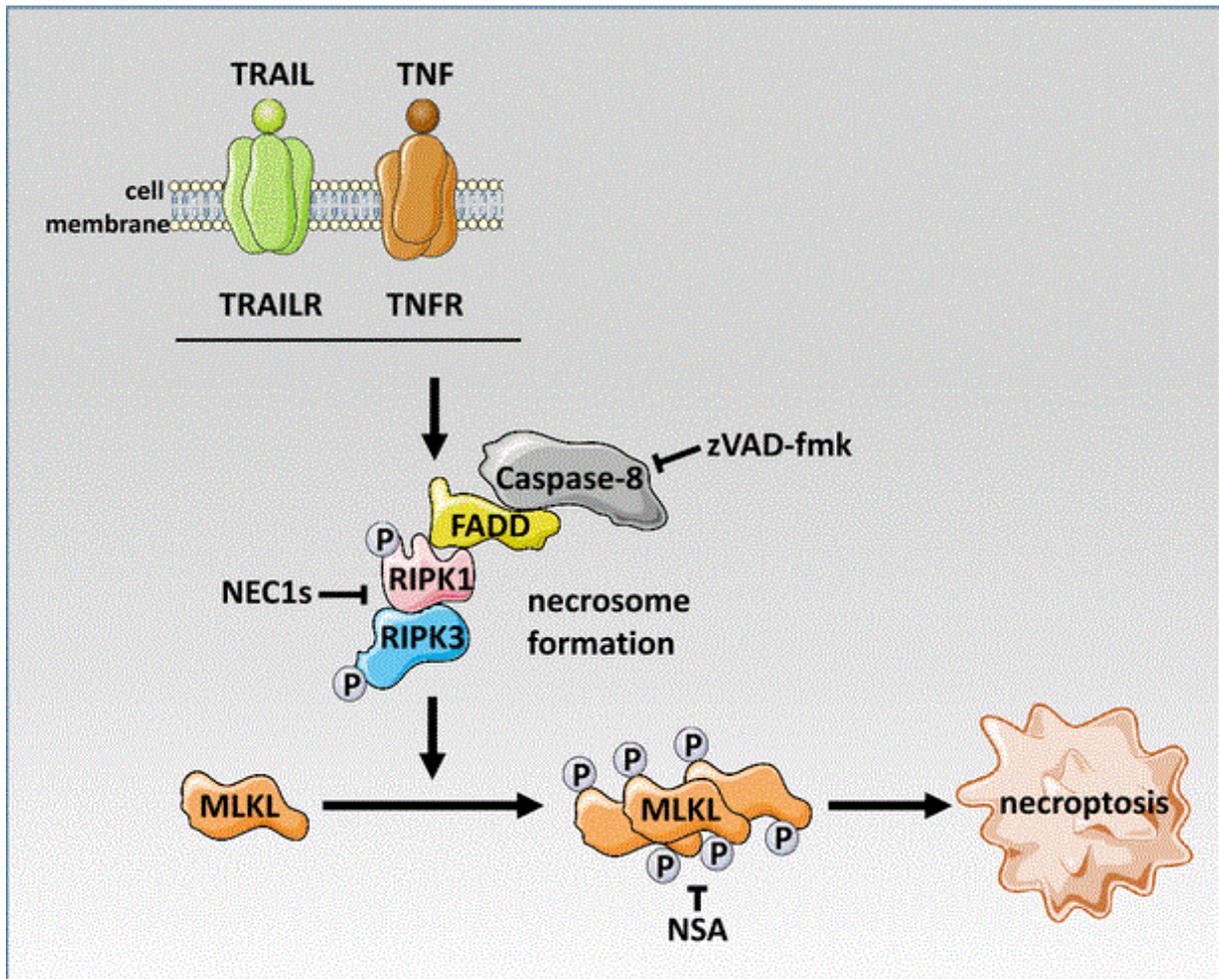


Abbildung 2: Vereinfachter Signalweg der Nekroptose. Durch Aktivierung von TRAIL- oder TNF-Todesrezeptoren (TRAILR, TNFR) und gleichzeitiger Inhibition von Caspase-8 (in diesem Beispiel durch zVAD-fmk) kommt es über die Proteine FADD und RIPK1 zur Formation des Nekrosoms, bestehend aus RIPK3 und MLKL. In Folge dessen kommt es zum Ablauf des nekroptotischen Zelltodes. Der Signalweg kann sowohl durch RIPK1 Inhibition (Necrostatin1, NEC1), als auch durch MLKL Inhibition (Necrosulfonamid, NSA) blockiert werden. (modifiziert nach Philipp et al. 2016)

3.2.3 Autophagie

Unter Autophagie versteht man einen generellen Oberbegriff für die Degradierung cytoplasmatischer Bestandteile in Lysosomen. Dabei wird unterschieden zwischen Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon-vermittelter Autophagie. Spricht man von „Autophagie“ ist in der Regel die Makroautophagie gemeint. Sie dient zum Abbau von Zellorganellen und anderen cytoplasmatischen Bestandteilen und der Wiederverwertung von Nährstoffen. Im Zentrum dieses Prozesses steht am Anfang die präautophagosomale Struktur (PAS). Ausgehend vom PAS werden Organellen und Cytoplasma zunächst von einer einschichtigen Membran umgeben. Man spricht nun von der Phagophore. Kommt es zum kompletten Einschluss liegt das Autophagosom vor, ein Zellorganell, das in der Regel von einer doppelschichtigen Membran umgeben ist. In der Folge fusioniert das Autophagosom mit einem Lysosom und die Degradierung des Inhaltes des entstandenen Autophagolysosoms beginnt.

Die Formation und Regulation des Autophagosoms stellt ein komplexes Geschehen dar und ist noch nicht vollständig erforscht. In Hefezellen existieren 18 verschiedene Autophagie-Gene (ATG) die unmittelbar an der Bildung des Autophagosoms beteiligt sind (Suzuki und Ohsumi 2007). Eine zentrale Rolle dabei spielt Beclin-1. Beclin-1 ist u.a. Interaktionspartner von Bcl-2, welches über eine BH3-Domäne bindet und die Formation des Autophagosoms verhindert (Maiuri et al. 2014; Oberstein et al. 2007). Somit wirkt Bcl-2 nicht nur antiapoptotisch, sondern auch autophagieinhibierend. Leidet die Zelle an Nährstoffmangel, wird die Verbindung zwischen Beclin-1 und Bcl-2 aufgehoben und es kommt zur Autophagie (Maiuri et al. 2014; Pattingre et al. 2005). Weiterer Regulator von Beclin-1 ist das UV radiation resistance-associated gene Protein (UVRAG), ein Tumorsuppressor, welcher Beclin-1 aktiviert und somit die Autophagie einleitet (Park et al. 2014).

Anhand von Bcl-2 und Beclin-1 wurde deutlich wie nutritive Faktoren den Ablauf der Autophagie regulieren. Ein weiterer Beleg für diesen Zusammenhang ist die Rolle des Proteins mammalian target of Rapamycin (mTOR), das die Formation des Autophagosoms hemmt. Bei Nährstoffmangel oder Signalen kataboler Hormone kommt es zur Hemmung von mTOR und somit zur Enthemmung des Autophagosoms (siehe Abbildung 3). Die Autophagie steht in Folge dessen zur Bereitstellung von Nährstoffen bereit. In Experimenten konnte eine Aktivierung der Autophagie durch mTOR-Inhibitoren wie Rapamycin bewiesen werden (Hare und Harvey 2017).

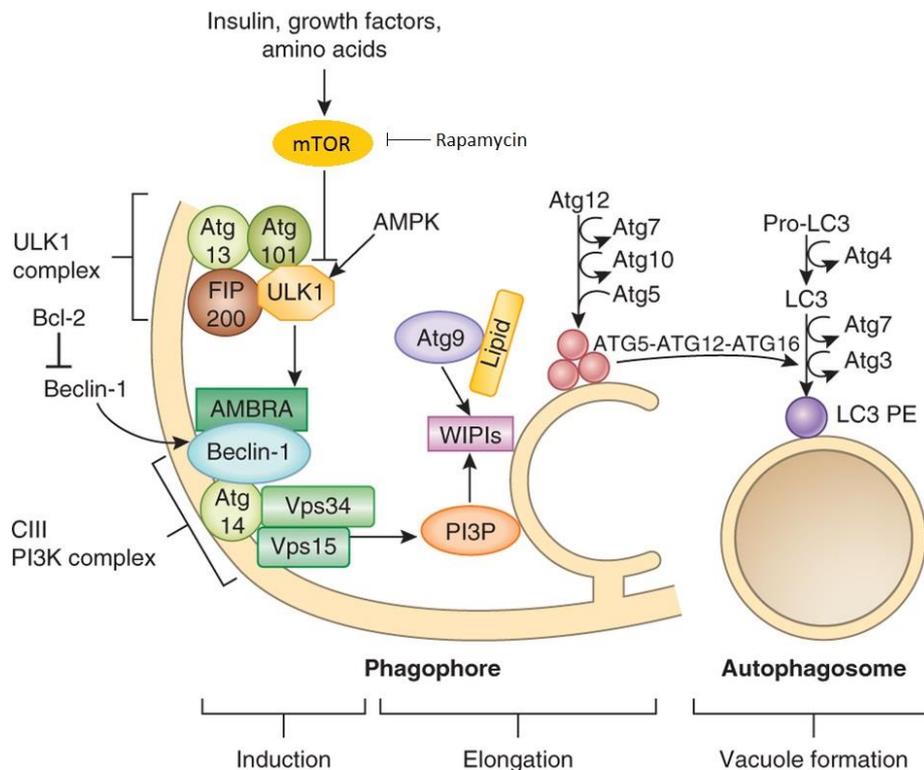


Abbildung 3: Signalweg Autophagie. Nach Inhibition durch z. B. Rapamycin oder nach Wegfall aktivierender Faktoren (Insulin, Wachstumshormone, Aminosäuren) kommt es zur Enthemmung des ULK1-Komplexes durch mTOR. Der ULK1-Komplex wiederum aktiviert den CIII PI3K-Komplex um Beclin-1. Bcl-2 ist in der Lage Beclin-1 zu inhibieren. Damit hemmt Bcl-2 sowohl Autophagie als auch Apoptose. Über zwischengeschaltete Proteine kommt es schließlich zur Formation weiterer ATG-Proteine zum Autophagosom. Modifiziert nach Nixon 2013.

Lange verstand man Autophagie lediglich als Prozess, in Phasen von nutritivem Stress das Überleben der Zelle durch Bereitstellung von Nährstoffen zu sichern. Doch es finden sich Hinweise, dass Autophagie ebenfalls in der Lage ist regulierten Zelltod zu vermitteln. Am Beispiel des HIV-Virus wurde gezeigt, dass es durch Bindung des viralen Hüllproteins (env) an den Chemokinrezeptor CXCR4 von CD4+ T-Zellen zur intrazellulären Akkumulation von Beclin-1 und in Folge dessen zum Autophagie vermittelten Zelltod kommt (Espert et al. 2006). Auch gibt es Hinweise, dass Autophagie dann Zelltod vermittelt könnte, wenn Apoptose nicht möglich ist (Maiuri et al. 2014). Dies wurde gezeigt an BAX und BAK Knockout Zellen, die als Folge von DNA-Schäden oder generellem Zellstress einen Autophagie vermittelten Zelltod starben (Ullman et al. 2008). Als alternatives Zelltodprogramm ist die Autophagie daher auch für die Pathophysiologie von malignen Tumoren von Relevanz. Bestätigt wird dies dadurch, dass Tumoren häufig Mutationen mit Funktionsverlust von ATG-Proteinen wie Beclin-1 aufweisen (Rosenfeldt und Ryan 2009). Aktuell existieren auch Meinungen, die die Autophagie als eigenständiges Zelltodprogramm in Frage stellen. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass der Wirkstoff Obatoclax in der Lage ist, einen Autophagie-vermittelten Zelltod auszulösen, der jedoch RIP1 und RIP3 abhängig ist und somit Nekroptose darstellt (Basit et al. 2013; Oberst 2013).

3.2.4 PARP-1 vermittelte regulierte Nekrose: Parthanatos

Bei der Poly-ADP-Ribose Polymerase 1 (PARP1) handelt es sich um ein Enzym der DNA-Reparatur, das in der Lage ist, DNA-Einzelstrangbrüche zu reparieren. Fällt dieses System aus, akkumulieren im Laufe der Replikation Doppelstrangbrüche, die durch BRCA abhängige homologe Rekombination als alternatives Reparatursystem behoben werden können. Diese Tatsache wird bei der Behandlung von BRCA-Mutation-positiven Tumoren relevant, so wie sie beim familiären Brustkrebs oft auftreten. Fällt nämlich die BRCA-abhängige homologe Rekombination aus, sind diese Zellen besonders sensitiv für PARP1-Inhibition. Daher stellen PARP-Inhibitoren wie Olaparib und ABT-888 neue Ansätze zur Therapie von BRCA-Mutation positivem Brustkrebs dar (Lee et al. 2014).

Neben der Funktion als DNA-Reparaturenzym, die per se zum Überleben von Zellen beiträgt, scheint PARP1 auch eine bestimmte Form des regulierten Zelltodes zu vermitteln, der als Parthanatos bezeichnet wird. Lange ging man davon aus, dass der PARP1 vermittelte Zelltod Folge eines Energiekollaps der Zelle sei, da es durch PARP1-Aktivierung zu hohem Verbrauch von NAD⁺ und ATP kommt (Zong et al. 2004). Neuere Untersuchungen liefern jedoch eine andere Erklärung. Die Aktivierung von PARP1 in Folge von DNA-Schädigung führt zur Bildung von Poly-ADP-Ribose-Polymeren und deren Translokation in das Cytosol, wo sie die Freisetzung von *apoptosis inducing factor* (AIF) aus dem Mitochondrium bewirken (Fatokun et al. 2014). AIF leitet dann im Zellkern in Kombination mit den Proteinen *migration inhibitory factor* (MIF), Cyclophilin A (CypA) und dem Histon H2AX den Zelltod durch DNA-Degradierung ein (siehe Abbildung 4) (Wang et al. 2016; Artus et al. 2010). Da DNA-Schäden bei rasch proliferierenden Zellen ein hohes Risiko für maligne Entartung darstellen, stellt die PARP-vermittelte regulierte Nekrose für den Organismus eine elegante Lösung dar, sich solcher Zellen zu entledigen.

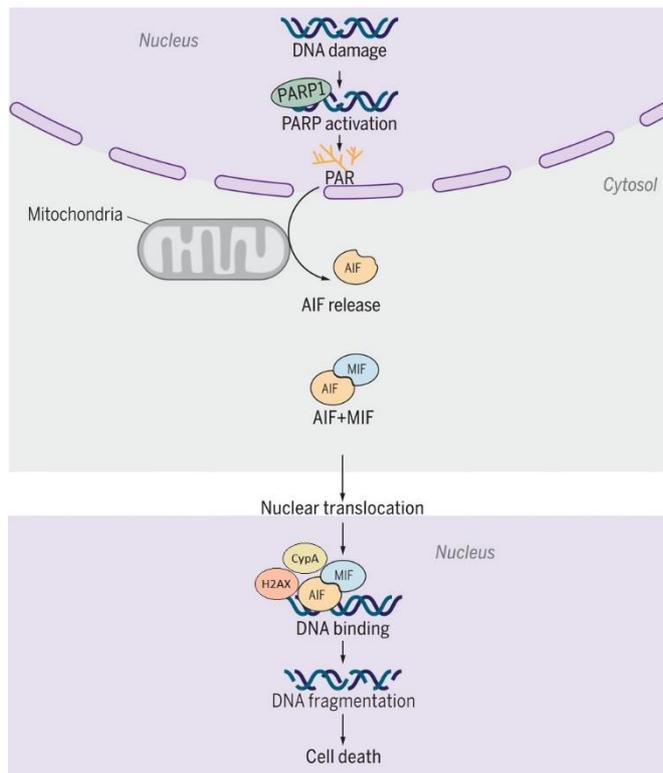


Abbildung 4: Signalweg des PARP vermittelten Zelltodes. Durch DNA-Schädigung kommt es zur PARP-Aktivierung und Bildung von PAR. Die PAR gelangen aus dem Zellkern in das Zytoplasma und setzen AIF aus dem Mitochondrium frei. AIF bindet MIF und leitet im Zellkern zusammen mit den Proteinen CypA und H2AX die Spaltung der DNA und somit den Zelltod ein. Modifiziert nach Wang et al. 2016.

3.3 Gegenseitige Regulation der Zelltodprogramme

Wird eine Zelle mit mehreren Zelltodstimuli konfrontiert, so läuft in der Regel nur ein Zelltodprogramm zurzeit ab. Daher geht man davon aus, dass sich die verschiedenen Zelltodsignalwege gegenseitig regulieren (Galluzzi et al. 2017; Orrenius et al. 2011).

Verschiedene Versuche haben belegt, dass Apoptose und Autophagie sich einander inhibierend beeinflussen. Dies stützt die These, dass es sich bei der Autophagie um eine Funktion zur Zellerhaltung handelt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass durch Autophagie-Inhibition mittels Chloroquin das Therapieansprechen von Leukämiezellen bei CML gesteigert wurde (Carew et al. 2007). Dementsprechend konnte in Zellen mit Beclin-1 Überexpression eine Protektion vor TRAIL vermittelter Apoptose festgestellt werden (Cho et al. 2009). Auch wurde gezeigt, dass es im Rahmen der Autophagie zur Degradierung von Caspase 8 und somit zu einer Unterbrechung des Apoptose-Signalweges kommt (Hou et al. 2010). Umgekehrt spaltet aktivierte Caspase 8 ATG6, ein Schlüsselprotein des Autophagosoms (Rikiishi 2012).

Gegen das Modell der wechselseitigen Inhibition spricht die Entdeckung, dass Rottlerin über AMP activated protein kinase (AMPK) Aktivierung und die Suppression von mTOR sowohl Autophagie als auch Apoptose einleitet (Kumar et al. 2013). Auch wurde gezeigt, dass eine Inhibition von Beclin-1

nicht nur Autophagie, sondern auch Apoptose inhibiert (Espert et al. 2006). Auch die Tatsache, dass mit Bcl-2 ein wichtiger Regulator vorliegt, der sowohl Apoptose als auch Autophagie inhibiert, spricht gegen die Vorstellung einer komplett gegenläufigen Regulation der beiden Zelltodprogramme. Die verschiedenen Entdeckungen zeigen eindeutig, dass die gegenseitige Beeinflussung zwischen Apoptose und Autophagie sehr komplex ist und sich keine allgemeingültigen Aussagen zur Art der gegenseitigen Regulation machen lassen.

Ebenso kontrovers werden die Zusammenhänge zwischen Autophagie und Nekroptose diskutiert. Auf der einen Seite wurde gezeigt, dass Autophagie zu einer Herunterregulation von Caspase 6 führt, welche für den Ablauf der TNF vermittelten Nekroptose essentiell ist (Ye et al. 2013). Auch wurde beobachtet, dass die mTOR-vermittelte Inhibition von Autophagie den Ablauf der zVAD-vermittelten Nekroptose fördert, während Induktion von Autophagie durch Nährstoffmangel diese inhibiert (Wu et al. 2014). Auf der anderen Seite existieren Meinungen, dass Autophagie die Nekroptose auch fördern könnte. Basit et al. konnten zeigen, dass die Autophagie fördernde Substanz Obatoclax auch nekroptischen Zelltod auslöst und zwar durch Formation des Nekrosoms an autophagosomalen Membranen (Basit et al. 2013).

Zu der Beeinflussung von Nekroptose und PARP-vermittelter Nekrose durch die Apoptose bestehen klare Vorstellungen. Zum einen ist bekannt, dass PARP1 bei Ablauf der Apoptose durch Caspase 3, eine wichtige Effektorcaspase der Signalkaskade, gespalten und somit inaktiviert wird. Zum anderen führt Aktivierung von Caspase 8 z. B. in Folge extrinsischer Apoptose Induktion zur Spaltung von RIP1 und RIP3, den Schlüsselproteinen der Nekroptose (Kaczmarek et al. 2013).

Ein wichtiger Faktor, der die Regulation zwischen Apoptose und Nekroptose steuert, ist die intrazelluläre ATP-Konzentration. Für den Ablauf der Apoptose sind ausreichende Energiemengen von Nöten. Daher wird bei ATP-Mangel die Nekroptose als Zelltodprogramm bevorzugt und bei ausreichender ATP-Konzentration die Apoptose (Galluzzi et al. 2014; Nicotera et al. 1998). Sinkende ATP-Spiegel haben allerdings auch eine Hemmung des mTOR-Signalweges zur Folge, was wiederum die Autophagie aktiviert. Der Autophagie kommt dabei am ehesten die Rolle zur Sicherung des Zellüberlebens zu und antagonisiert somit die Nekroptose. Ein Beleg dafür ist die Tatsache, dass zVAD, ein Pan-Caspase Inhibitor, in Kombination mit TRAIL effektiv Nekroptose induziert, wohl auch aus dem Grund, weil es lysosomale Cathepsine inhibiert und somit die Autophagie als Gegenspieler der Nekroptose ausschaltet (Wu et al. 2014).

Als weiterer Faktor gilt der extrazelluläre pH-Wert (pHe). So konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit TRAIL bei sauren extrazellulären pH-Werten zur Induktion von Nekroptose an Stelle von Apoptose bei normalen extrazellulären pH-Werten führt (Meurette et al. 2007). Da in malignen

Tumoren die Sauerstoff-Versorgung oft insuffizient ist, liegen dort oft niedrige pH-Werte vor. Insofern kommt dieser Entdeckung eine Krebs-relevante Bedeutung bei.

3.4 TRAIL-Rezeptor Agonisten in der Therapie maligner Tumoren

Die Aktivierung extrinsischer Signalwege zur Induktion von reguliertem Zelltod stellt eine vielversprechende Option in der Behandlung maligner Tumoren dar. Das am besten verstandene System bildet dabei die TNF-Rezeptor 1-vermittelte Apoptose durch den Liganden TNF. TNF scheidet jedoch auf Grund schwerer pro-entzündlicher Nebenwirkungen als systemisches Therapeutikum aus. Im Sinne einer targeted therapy gilt es daher, einen Liganden für Todesrezeptoren zu finden, der ausschließlich bei malignen Zellen in der Lage ist, regulierten Zelltod auszulösen, um somit schwere Nebenwirkungen zu vermeiden. Mit TRAIL steht ein solcher Ligand zur Verfügung. Durch Bindung an Death-Rezeptor 4 oder 5 (DR4/DR5) führt TRAIL zur Aktivierung des extrinsischen Signalweges von reguliertem Zelltod, wie Studien zeigen, jedoch nicht bei gutartigen Zellen (Hellwig und Rehm 2012; Ashkenazi et al. 1999; Walczak et al. 1999; Pitti et al. 1996). Die TRAIL-vermittelte Apoptose wurde bereits ausgiebig untersucht. Dabei zeigt sich, dass ca. 1/3 aller menschlichen Tumoren komplett resistent und ein weiteres Drittel nur mäßig auf die TRAIL-Behandlung anspricht (Buchsbaum et al. 2006). Mögliche Resistenzmechanismen, die dabei diskutiert werden sind Expression und Beschaffenheit der Todesrezeptoren, erhöhte Protein-Aktivitäten von FLIP, IAP, Bcl2-Proteinen, NF- κ B, Akt sowie ein Defekt von p53 (Hellwig und Rehm 2012). Durch Modulation dieser Resistenzmechanismen konnte in einigen Fällen ein verbessertes Ansprechverhalten auf die Behandlung mit TRAIL erzielt werden. Als Ko-Therapeutika wurden zu diesem Zweck beispielsweise Doxorubicin, Paclitaxel, Cycloheximid und Bcl-2-Inhibitoren erfolgreich eingesetzt (Hellwig und Rehm 2012). Eine weitere Strategie zur effektiven Behandlung Apoptose-resistenter Zellen stellt die Induktion von TRAIL-vermittelter Nekroptose dar. Studien zeigen, dass durch die Kombination von TRAIL mit dem pan-Caspaseinhibitor zVAD-fmk bei vielen humanen Tumorzelllinien effektiv Nekroptose ausgelöst werden kann (Voigt et al. 2014). Jedoch weisen auch für diese Art des regulierten Zelltodes viele Tumorzelllinien Resistenzen auf. Um Tumorzellen für die Nekroptose zu sensibilisieren, wurde Cycloheximid erfolgreich getestet. Im Gegensatz zu TRAIL und zVAD-fmk allein weist Cycloheximid jedoch ein schlechtes Verträglichkeitsprofil auf. Es wäre daher wünschenswert, alternative Wege zu finden, um die TRAIL-vermittelte Nekroptose als Krebstherapie effektiver zu gestalten.

Zur effektiven Induktion von programmiertem Zelltod ist das Binden von TRAIL an DR4 oder DR5 allein nicht ausreichend. Zusätzlich müssen mehrere Rezeptoren zu Clustern zusammengeführt werden. Um dies zu erreichen, gibt es mehrere Konzepte in der Entwicklung von TRAIL-Rezeptor-Agonisten. Sehr verbreitet und in dieser Arbeit als Standard verwendet ist killerTRAIL, ein DR4-Rezeptor-Agonist,

bestehend aus der extrazellulären Domäne von humanem TRAIL verbunden mit einem Histidin-Tag, welcher für das Bilden von DR4-Rezeptor Clustern sorgt. Auch werden Antikörper als Agonisten an TRAIL-Rezeptoren verwendet. Ein Rezeptor-Clustering erfolgt in diesen Fällen über Verbindung mittels Fc-Rezeptoren. Da *in vivo* jedoch zahlreiche physiologische Antikörper um die Fc-Bindungsstellen konkurrieren, stellten sich diese Antikörper in klinischen Studien als ineffektiv heraus (Gieffers et al. 2013). Zu Fc-Rezeptor unabhängigem Clustering von TRAIL-Rezeptoren führt APG 350. Es handelt sich dabei um ein Fusionsprodukt des Fc-Teils eines humanen IgG-Antikörpers mit zwei TRAIL-Rezeptor bindenden Sequenzen, bestehend aus jeweils drei TRAIL-Sequenzen. Auf diese Weise kann ein APG 350 Molekül sechs TRAIL-Rezeptoren auf engem Raum binden und somit zu effektivem Clustering führen (Gieffers et al. 2013).

3.5 pH-Homöostase in der Pathophysiologie maligner Tumoren

Zu den Kennzeichen von malignem Gewebe gehört unter anderem eine pH-Wert Verschiebung im Sinne eines erniedrigten extrazellulären pH-Wertes (pHe) und eines erhöhten intrazellulären pH-Wertes (pHi) (Cardone et al. 2005). Lange wurde die Warburg-Hypothese als Grundlage für dieses Phänomen gesehen, die besagt, dass ein mitochondrialer Defekt Ursache für die maligne Entartung von Zellen sei. In Folge dessen käme es trotz ausreichender Sauerstoffzufuhr zu vermehrter Glykolyse und Laktat-Bildung, da ein alkalischer pHi die Glykolyse durch Aktivierung von Schlüsselenzymen wie Phosphofruktokinase antreibe und gleichzeitig jedoch die oxidative Metabolisierung von Pyruvat hemmen würde (Danhier et al. 2017; Kaminskas 1978). Die hohen Konzentrationen saurer Metabolite würden dann zur verstärkten Aktivierung membranständiger H⁺-Transporter führen und somit den pHe senken. Gegen diese Erklärung sprechen Erkenntnisse aus der intrazellulären pH-Wert Messung, die zeigen, dass der pHi von Tumorzellen sogar alkalischer ist als bei gesunden Zellen (Cardone et al. 2005). Daher geht man aktuell davon aus, dass die pH-Wert Verschiebungen nicht Folge des veränderten Stoffwechsels sind, sondern umgekehrt am Anfang der malignen Entartung H⁺-Ionen aktiv aus der Zelle transportiert werden und in Folge des pHi-Anstiegs es zu jener besagten Veränderung des Kohlenhydratstoffwechsels kommt (Reshkin et al. 2014). Es konnte gezeigt werden, dass zahlreiche Onkogene die Aktivität und Expression von membranständigen Protonen-Transportern erhöhen und somit die Entartung einleiten. Unter vielen Transportern seien dabei vor allem der Na⁺/H⁺ Austausch NHE1 und die ATP-abhängige Protonenpumpe V-ATPase von entscheidender Bedeutung (Xie et al. 2017; Stransky et al. 2016). Die resultierende pH-Wert Verschiebung habe nicht nur wie oben geschildert Auswirkungen auf den Kohlenhydratstoffwechsel, sondern würde auch weitere Kennzeichen von Malignität begründen. Zum einen käme es durch den sauren pHe zu verstärkter Expression von Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) sowie zu NF-κB getriebener vermehrter Sekretion von VEGF (Xu et al. 2002). Beides führt zu Angiogenese im Tumorgewebe. Zum anderen ist im sauren

Milieu die extrazelluläre Proteolyse durch Aktivierung von Matrix-Metallo-Proteasen (MMP) und Cathepsinen erhöht. Dies steigert die Invasivität und Metastasierungsfähigkeit von Krebszellen (Kato et al. 2005). Somit muss die pH-Wert-Verschiebung auch mit Zweien der von Hanahan und Weinberg definierten „Hallmarks of Cancer“ in Verbindung gebracht werden, nämlich Metastasierung und Angiogenese (Hanahan und Weinberg 2011).

Des Weiteren besteht die Vermutung, dass ein saurer pH_e auch die Resistenz gegenüber Chemotherapien vermittelt, da es sich bei den verwendeten Substanzen oft um milde Basen handelt, die durch Protonierung ionisiert werden und somit die Zellmembran schlechter durchdringen können (McCarty und Whitaker 2010). Zusätzlich fand man heraus, dass ein Abfall des pH_i für die Einleitung von Chemotherapie-induzierter Apoptose essentiell ist. Außerdem führt das saure Milieu zu einer Immunsuppression im Sinne einer Hemmung der T-Zell-Aktivierung sowie einer Hemmung der zytotoxischen Aktivität von natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) und von Lymphokin aktivierten Killer-Zellen (Pilon-Thomas et al. 2016; Loeffler et al. 1991).

Es besteht also in vielerlei Hinsicht Grund dazu, die fehlregulierte pH-Homöostase therapeutisch anzugreifen. Dazu stehen vier verschiedene Strategien zur Verfügung: (1) die Verwendung von alkalischen Infusionen zur Neutralisation des sauren pH_e, (2) die Verwendung von Inhibitoren der Protonentransporter, (3) die therapeutische Senkung des pH_i zur Steigerung der Therapiesensitivität und (4) das Ausnutzen der besonderen pH-Verhältnisse zur Gestaltung gezielter Krebstherapeutika (McCarty und Whitaker 2010).

3.6 Autophagie-Modulatoren in der Krebstherapie

Wie in 3.2.3 erläutert nimmt die Autophagie Einfluss auf regulierte Zelltodprogramme. Zum Zwecke der Optimierung von Zelltodinduktion in der Krebstherapie wurden daher zahlreiche Autophagie-Modulatoren getestet. Die Ergebnisse sollen im Folgenden weiter ausgeführt werden.

Tumorzellen überleben oft trotz starkem Nährstoff- oder Sauerstoffmangel, was vor allem durch den Ablauf von Autophagie gewährleistet wird (Karantza-Wadsworth et al. 2007). Allein diese Tatsache macht die Verwendung von Autophagie-Inhibitoren interessant für die Krebstherapie (Amaravadi et al. 2011). Verschiedene Inhibitoren greifen an unterschiedlichen Punkten in den Ablauf der Autophagie ein. 3-Methyladenin verhindert die Formation des Autophagosoms und somit den grundlegenden Schritt der Autophagie. Chloroquin akkumuliert in den Lysosomen und verhindert deren Ansäuerung, was den lysosomalen Abbau im Rahmen der Autophagie verhindert. Den gleichen Effekt erzielt Bafilomycin A1, indem es das lysosomale Enzym H⁺-ATPase inhibiert (siehe Abbildung 5). In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass Chloroquin über p53-Aktivierung Zelltod von Lymphomzellen auslösen konnte (Amaravadi et al. 2007). Bei der Therapie des Burkitt-Lymphoms in

Mäusen verhinderte Chloroquin eine spontane Tumorentstehung (Maclean et al. 2008). In Kombination mit mTOR-Inhibitoren verhinderte Chloroquin bei Nierenzellkarzinomzellen den Ablauf von Mitophagie, was mit einem Anstieg von ROS und in Folge dessen Nekroptose einherging (Bray et al. 2012). Generell können Autophagie-Inhibitoren zu einem Abfall der zellulären Energielevel führen und auf diesem Wege Nekroptose einleiten (Shimizu et al. 2004).

Neben den Inhibitoren sind jedoch auch die Induktoren von Autophagie in der Krebstherapie von Bedeutung. So sind mTOR-Inhibitoren wie beispielsweise Rapamycin (Sirolimus) bereits für die Behandlung von Nierenzellkarzinomen zugelassen. Bei ausreichender Energieversorgung und Stimulation mit Wachstumsfaktoren ist mTOR aktiv und inhibiert Autophagie. Auf diese Weise führt mTOR-Inhibition zur Autophagie-Induktion (siehe Abbildung 5) (Jung et al. 2009). Des Weiteren blockieren mTOR-Inhibitoren den Ablauf der Glykolyse und begünstigen den oxidativen Stoffwechsel. Gemeinsam mit der Autophagie-abhängigen Fragmentierung der Mitochondrien kommt es zur verstärkten Bildung von ROS. Gleichzeitig inhibieren mTOR-Inhibitoren das natürliche Antioxidans Nrf2. Auf diese Weise leiten mTOR-Inhibitoren Zelltod durch ROS Akkumulation ein (Bray et al. 2012).

Auch gibt es Hinweise, dass Autophagieproteine direkt mit den Signalwegen des regulierten Zelltodes in Verbindung stehen. So dienen autophagosomale Membranen mit ihren Proteinen als Plattformen für die Interaktion der Zelltod-bestimmenden Molekülkomplexe (DISCs) bestehend aus ATG5, ATG12, FADD, RIP1, Caspase 8. Auf diese Weise steht Autophagie mit der Aktivierung von Caspase 8 und Induktion von Apoptose in Verbindung (Young et al. 2012). Ebenso scheint es einen Zusammenhang zwischen Autophagieproteinen und Nekroptose zu geben. So konnte bei Rhabdomyosarkom-Zellen durch Stimulation mit Obatoclax die Formation von Nekrosomen an autophagosomalen Membranen beobachtet werden, was den Eintritt von Nekroptose zur Folge hatte. Bei Obatoclax handelt es sich um einen Inhibitor von antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1) (Fulda et al. 2010). Da Bcl-2 und Mcl-1 durch Bindung an Beclin-1 inhibierend auf die Autophagosomen-Bildung wirken, hebt Obatoclax die Zahl der Autophagosomen an (Basit et al. 2013). Außerdem ist ein inhibierender Effekt auf die mTOR-Aktivität beschrieben worden (Bonapace et al. 2010). Beides mündet in einer durch Obatoclax-vermittelten gesteigerten Autophagie. Über das Protein ATG5 kommt es letztendlich zur Formation des Nekrosoms an den autophagosomalen Membranen mit Induktion von Nekroptose (Basit et al. 2013). Somit kommt dem Autophagie-Protein ATG5 eine Schlüsselrolle in der Verbindung zu den Signalwegen des programmierten Zelltodes zu.

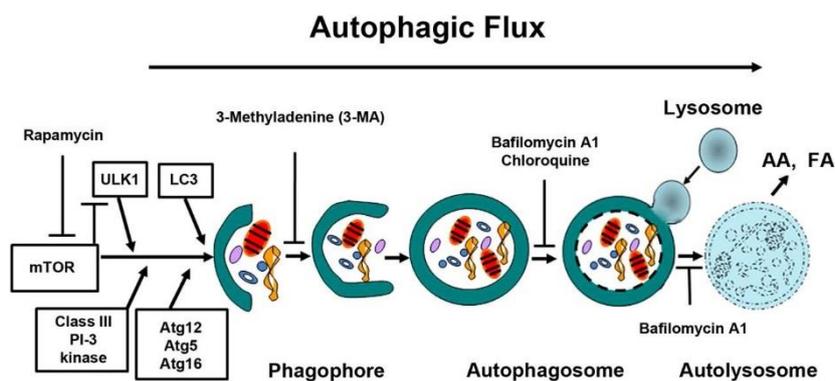


Abbildung 5: Unterschiedliche Ansatzpunkte der Autophagiemodulatoren. Rapamycin aktiviert die Autophagie durch Inhibition von mTOR, was zum Wegfall der Hemmung des ULK1-Komplexes führt. 3-Methyladenin verhindert die Formation des Autophagosoms. Bafilomycin A1 und Chloroquine verhindern die Ansäuerung der Lysosomen und somit die Bildung des Autolysosoms. Modifiziert nach Herzog et al. 2012.

3.7 Tankyrase als Zielstruktur in der Krebstherapie

Die Familie der PARP-Proteine umfasst 16 Mitglieder. Die Bedeutung von PARP1 für die DNA-Reparatur und Zelltod wurde bereits erläutert. Doch auch weitere PARP-Proteine wie Tankyrase 1 und Tankyrase 2 scheinen im Zusammenhang mit Krebs eine relevante Rolle zu spielen. So konnte nachgewiesen werden, dass Tankyrase an der Regulation der Telomerlänge, der Regulation des Wnt-Signalweges, beim Ablauf der Mitose sowie bei der zellulären Insulin-abhängigen Glukose-Aufnahme eine Rolle spielt (Riffell et al. 2012).

Telomerverlängerung spielt für die maligne Entartung von Zellen eine entscheidende Rolle, denn nur durch sie wird eine unbegrenzte Proliferation ermöglicht. Bei jeder DNA Replikation kommt es zwangsläufig zu einer Verkürzung der Telomerenden. Unterschreitet die Telomerlänge eine kritische Grenze, das sogenannte Hayflick-Limit, kommt es zum Verlust kodierender DNA-Abschnitte und in Folge dessen zum Zelltod. Um unbegrenzte DNA-Replikation zu ermöglichen, bedienen sich Körperstammzellen aber auch Krebszellen der Mechanismen der Telomerverlängerung. Eine Schlüsselrolle spielt dabei das Enzym Telomerase, das mit Hilfe eines RNA-Templates als funktionelle reverse Transkriptase die DNA der Telomerenden verlängert. In den meisten Tumorzellen ist die Telomeraseaktivität hochreguliert, alternativ benutzen Tumorzellen jedoch auch das Prinzip des Telomerschwesterchromatid-Austausches zur Telomerverlängerung. Beide Strategien werden kontrolliert durch den Shelterinkomplex, bestehend aus sechs verschiedenen Proteinen, die die Telomerenden umlagern und so unkontrollierte Telomerverlängerung verhindern. Auf dieser Ebene wirkt das Enzym Tankyrase regulatorisch auf die Telomerverlängerung, indem es poly-ADP-Ribose (PAR)-Ketten auf TRF-1, ein Mitglied des Shelterinkomplexes, überträgt (PARsylierung) (Yang et al. 2017; Smith et al. 1998) Durch die PARsylierung von TRF-1 kommt es zu einer Freigabe der Telomerenden durch den Shelterinkomplex, was den Zugang durch Telomerase oder den Telomerschwesterchromatidaustausch ermöglicht (Yang et al. 2017; Smith et al. 1998).

Es ist bewiesen, dass Tankyrase auch Einfluss auf den Wnt-Signalweg nimmt, der eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung, Zelldifferenzierung und Stammzellregeneration spielt und in vielen malignen Zellen fehlreguliert ist (Riffell et al. 2012). Durch extrazelluläre Bindung von Wnt-Liganden an die entsprechenden Rezeptoren der Frizzled Familie und die Korezeptoren LRP5 und LRP6 kommt es zur Inaktivierung von GSK3, welches infolge dessen β -Catenin nicht mehr phosphorylieren kann, das somit vor dem Abbau im Proteasom geschützt ist. β -Catenin gelangt dann zum Zellkern und vermittelt die Transkription zahlreicher Gene, darunter auch der Onkogene Myc und Cyclin D. GSK3 bildet gemeinsam mit AXIN und APC den β -Catenin Destruktionskomplex. Dessen Aktivität ist vor allem durch das Vorhandensein von AXIN limitiert. An diesem Punkt setzt Tankyrase in die Regulation des Wnt-Signalweges ein. Tankyrase PARsyliert AXIN, welches dadurch im Proteasom abgebaut wird. Somit begünstigt Tankyrase den Zerfall des Destruktionskomplexes und erhöht die Aktivität des Wnt-Signalweges durch Steigerung der β -Catenin Konzentration (siehe Abbildung 6) (Haikarainen et al. 2014). Eine gesteigerte Aktivität des Wnt-Signalweges spielt für die Pathophysiologie zahlreicher Tumoren eine wichtige Rolle. In bis zu 95 % aller Kolonkarzinome liegt eine Mutation des APC- oder β -Catenin-Gens vor (Riffell et al. 2012). Tankyrase-Inhibitoren sind in der Lage den Wnt-Signalweg zu unterdrücken, dies konnte bereits an Brustkrebs- oder Neuroblastom-Zelllinien erfolgreich demonstriert werden (Bao et al. 2012; Tian et al. 2013).

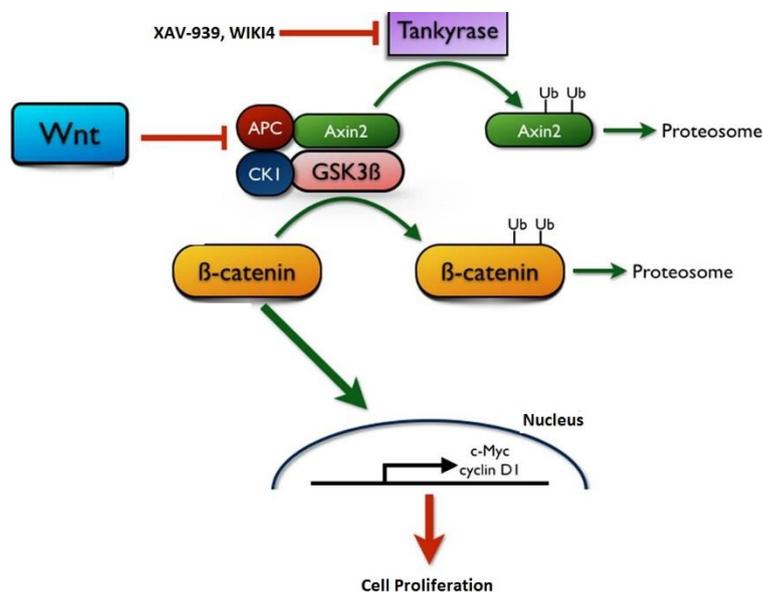


Abbildung 6 Einfluss von Tankyrase auf den Wnt-Signalweg. Tankyrase PARsyliert AXIN, welches daraufhin im Proteasom abgebaut wird. Ohne AXIN ist der Komplex um GSK3 nicht funktionsfähig, weshalb β -Catenin nicht abgebaut wird. β -Catenin fördert u.a. im Zellkern die Genexpression der Onkogene c-Myc und Cyclin D, was zur verstärkten Zellproliferation führt. Die Substanzen XAV-939 und WIKI4 sind in der Lage Tankyrase zu inhibieren. Modifiziert nach Ostrom 2014.

Welchen Einfluss Tankyrase auf den Ablauf der Mitose hat, ist noch nicht ausreichend geklärt. Es gibt aber Hinweise auf eine Beteiligung. Versuche zeigten, dass ein Mangel an Tankyrase zur dauerhaften Verschmelzung der Schwesterchromatiden führt, was vermuten lässt, dass Tankyrase an der Auflösung

solcher verbundener Chromatiden beteiligt ist (Dynek und Smith 2004). Dieser Vorgang erfolgt üblicherweise beim Eintritt in die Mitose. Weitere Studien zeigen, dass Tankyrase das Protein NUMA (nuclear mitotic apparatus protein), das an der Organisation der Mitosespindel beteiligt ist, PARsyliert (Chang et al. 2009).

3.8 Algen-Extrakte in der Krebstherapie

Aus epidemiologischen Analysen geht hervor, dass Krebserkrankungen im asiatischen Raum eine deutlich niedrigere Inzidenz aufweisen als in Europa oder den USA. Dies führte zu einer näheren Untersuchung der Unterschiede in den Umweltfaktoren beider Regionen, wie etwa der Ernährung. Als auffällig stellte sich dabei der vermehrte Konsum von Meerespflanzen in asiatischen Ländern heraus, weshalb Algenextrakte auf eine mögliche krebstherapeutische Wirkung untersucht wurden (Moussavou et al. 2014). Interessanterweise erbrachten diese Analysen Hinweise darauf, dass die pflanzlichen Wirkstoffe auf der Ebene mehrerer Kennzeichen von Malignität wie Apoptose-Resistenz, Fehlregulation von Wachstumssignalen, Angiogenese und Metastasierung wirksam sind (Aravindan et al. 2013). Je nach Algenart, Art der Extraktionsmethode und verwendetem Lösungsmittel enthalten die Algengemische unterschiedliche Wirkstoffe. Für Braunalgen typische Substanzen mit krebstherapeutischer Wirkung sind Polysaccharide wie Fucoidan und Polyphenole. Im Folgenden sollen die Substanzen näher erläutert werden.

Bei Fucoidan handelt es sich um ein sulfatiertes, Fukose-reiches Polysaccharid, das zur Stabilität der pflanzlichen Zellwand beiträgt und vor allem in Braunalgen zu finden ist (Senthilkumar et al. 2013). Experimente zeigten zahlreiche Krebstherapie-relevante Eigenschaften von Fucoidan. Laut Haneji et al. beeinflusst Fucoidan den Zellzyklus von T-Zellen im Sinne eines G1-Arrestes ausgelöst durch verminderte Expression von Cyclin D2 und c-Myc. Außerdem unterbricht Fucoidan dauerhafte Proliferationsstimuli durch Inhibition der MAP-Kinase ERK sowie der Proteine PI3K, Akt und mTOR und verhindert somit die unkontrollierte Vermehrung von Tumorzellen, welche in der Regel durch Fehlregulation dieser Wachstumssignalwege entsteht (Haneji et al. 2005). Des Weiteren scheint Fucoidan in der Lage zu sein Apoptose zu induzieren. Darüber auf welchem Wege dies geschieht besteht noch Uneinigkeit. Zhang et al. beschrieben eine Induktion von Apoptose durch Fucoidan bei MCF-7 Zellen durch mitochondriale Depolarisation in Folge von verminderter Genexpression von Bcl-2 und Bcl-xL sowie vermehrter Expression der proapoptotischen Proteine BAX und BAK (Zhang et al. 2011). Auch gibt es Berichte, dass Fucoidan die Calcium-Homöostase beeinflusst. Erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Werten würden dann zur Apoptose-Induktion führen (Zhang et al. 2013). Wieder andere Studien gehen von einer immunologisch vermittelten Apoptose aus. Ale et al. beschreiben eine Fucoidan vermittelte Aktivierung von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), was zu einer Ausschüttung von Granzym B und Perforin sowie in der Konsequenz zur Aktivierung der Caspase-Kaskade führe (Ale

et al. 2011). Die meisten Studien beschreiben bei Tumorzellen nach Stimulation mit Fucoïdan typische Kriterien von Apoptose, wie Antagonisierbarkeit durch Caspase-Inhibition, Chromatin-Verdichtung, DNA-Fragmentierung etc. Allerdings gibt es auch Schilderungen über einen Caspase-unabhängigen Zelltod, ausgelöst durch niedermolekulares Fucoïdan (Senthilkumar et al. 2013). Neben der Induktion von Zelltod ist Fucoïdan auch auf anderen Ebenen für die Krebstherapie interessant. Es konnte gezeigt werden, dass Fucoïdan durch Inhibition der Matrix-Metallo-Proteinase 2 (MMP2) und durch verminderte Ausschüttung von VEGF zusätzlich auch Zellmigration im Rahmen von Metastasierung sowie Angiogenese unterdrückt (Ye et al. 2005).

Neben Polysacchariden wie Fucoïdan sind Braunalgen ebenfalls reich an Polyphenolen wie Catechin, Epicatechin und Epigallocatechin. Polyphenolen werden zahlreiche gesundheitsfördernde Effekte nachgesagt darunter Wirkungen als Antioxidans und als antiproliferative Substanz. Eine Studie an Pankreaskarzinomzellen zeigte, dass Polyphenole in der Lage sind Apoptose zu induzieren und den NF- κ B-Signalweg zu inhibieren (Aravindan et al. 2013).

Bei Fv1, einem in dieser Arbeit untersuchten Algenextrakt, handelt es sich um einen Azeton-Extrakt der Braunalge *Fucus vesiculosus* aus der Ostsee. Die Wirkstoffe dieses Extraktes sind unbekannt. Geisen et al. fanden heraus, dass Fv1 zu einem Zellzyklus-Arrest in der G2-Phase führt (Geisen et al. 2015).

4 Fragestellung der Arbeit

In der Therapie solider Tumoren stellt in der Regel die Operation die einzige kurative Möglichkeit dar. In fortgeschrittenen Stadien, wenn eine operative Resektion nicht mehr möglich ist, kann eine Chemotherapie meist nur noch mit palliativer Zielsetzung angewendet werden. Ursache ist die Bildung von Resistenzen gegen die verwendeten Medikamente. Die meisten Chemotherapeutika wirken zytotoxisch, das heißt sie schädigen vornehmlich rasch proliferierende Zellen und führen dadurch zur Apoptose dieser Zellen. Resistenzsituationen können entstehen, wenn Krebszellen beispielsweise durch Mutationen von Transportproteinen das verwendete Medikament nicht mehr ausreichend in die Zelle aufnehmen oder verstärkt ausscheiden. Dieser Art von Resistenzbildung kann durch Kombination von verschiedenen Wirkstoffen vorgebeugt werden. Problematisch jedoch sind Resistenzen, die die gemeinsame Endstrecke der Wirkung zytotoxischer Chemotherapeutika betreffen, nämlich den Ablauf der Apoptose. Jeder Chemotherapiezyklus führt zur Selektion von Tumorzellen mit erworbener Apoptose-Resistenz bis es schließlich zum Wirkungsverlust der zytotoxischen Therapie kommt. Für dieses Problem sind alternative regulierte Zelltodprogramme von großer Bedeutung, denn durch deren gezielte Induktion würde man die Therapie Apoptose-resistenter Krebszellen ermöglichen. Zudem könnte man durch Kombination von Induktoren der Apoptose mit Induktoren der alternativen regulierten Zelltodwege eine Resistenzbildung im Verlauf der Therapie weiter vorbeugen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll das Potential von nicht-apoptotischem reguliertem Zelltod in der Therapie maligner Tumoren auf Zellkulturebene weiter erforscht werden. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf der TRAIL-vermittelten Nekroptose. Es sollen verschiedene Ansätze geprüft werden, um die Ansprechrate von Tumorzellen auf diese Form des regulierten Zelltodes zu verbessern. Dabei soll der Frage nachgegangen werden, ob neue TRAIL-Rezeptor-Agonisten, wie der Antikörper APG 350 im Vergleich zum oft verwendeten killerTRAIL in der Induktion von Nekroptose Vorteile mit sich bringen. Des Weiteren soll untersucht werden, in wieweit eine Beeinflussung des intrazellulären pH-Wertes von Tumorzellen durch die Substanzen Cariporid und Omeprazol zu einer Effektivitätssteigerung der TRAIL-vermittelten Nekroptose führt. Als weiteren zu untersuchenden Ansatz gilt es eine mögliche Interaktion von TRAIL-vermittelter Nekroptose mit der Autophagie abzuklären. Dabei soll die Auswirkung der Herunterregulation des Autophagie-Schlüsselproteins ATG5 sowie die Auswirkungen von Autophagie-Induktion und Hemmung mittels Stimulanzen auf den Ablauf der TRAIL-vermittelten Nekroptose untersucht werden. Als weiteres Interaktionsfeld der Nekroptose sollen die Proteine der PARP-Familie abgedeckt werden. Ziel der Untersuchung soll sein, zu klären, ob durch Inhibition oder Herunterregulation von PARP1 bzw. durch Inhibition der Tankyraseaktivität die Effektivität der TRAIL-vermittelten Nekroptose erhöht werden kann.

Neben diesen Versuchen zur Optimierung der TRAIL-vermittelten Nekroptose soll im Rahmen dieser Arbeit außerdem erforscht werden, auf welcher Art von reguliertem Zelltod die effektive Wirkung des Algenextraktes Fv1 beruht. Zu diesem Zweck soll Fv1 mit zahlreichen Inhibitoren gegen verschiedene regulierte Zelltodwege kombiniert werden, um im Falle einer Zelltodinhibition eine Antwort auf diese Frage zu finden.

5 Material und Methodik

5.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

| Hersteller | Produkt |
|---|--|
| Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien | Röntgenfilm Entwicklungsmaschine CP1000 |
| BD Biosciences, Franklin Lakes, USA | Falcon 5 ml Polystyren Rundboden-Röhrchen FACSCalibur Durchflusszytometer FACS Flow Hüllflüssigkeit |
| Bibby Scientific, Staffordshire, UK | Stuart Rollenmischer SRT6 |
| Biometra, Göttingen, Deutschland | Power Pack P25T Niederspannungs-Netzteil |
| Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland | Mikroskop Axiovert 10, 100, 200M |
| Eppendorf, Hamburg, Deutschland | Zentrifuge 5415D, Rotor F45-24-11 Zentrifuge 5415C, Rotor F45-18-11 Zentrifuge 5417R, Rotor F45-30-11 Pipetten 10, 20, 100 ,200, 1000 µl |
| Gilson Inc., Middleton USA | Pipetten 10, 20, 100 ,200, 1000 µl |
| Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich | CellStar Zellkulturflaschen mit Filter 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ² CellStar Röhrchen 15 ml, 50 ml CellStar 6, 12, 24, 48 Well Platten Serologische Pipetten 1, 5, 10, 25, 50 ml |
| Hecht-Assistent, Sondheim/Rhön, Deutschland | Rollenmischer RM5 Neubauer Zählkammer |
| Heraeus, Hanau, Deutschland | Trockenschrank T6760 LaminAir HB 2472K Sterilbank Megafuge 1.0R, Rotor BS4402/A |
| Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland | Pipetus Akku-Pipettierhilfe 9907200 |
| IKA Werke GmbH und Co. KG, Staufen, Deutschland | MS2 Minischüttler MS3 Vortex |
| Julabo, Seelbach, Deutschland | Wasserbad U3/8 |
| Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland | Präzisionswaage 440-47 N |
| Lonza Group AG, Basel, Schweiz | Nucleofector II Gerät |
| Milian AG, Genf, Schweiz | Wasserbad GFL-1003 |
| Merck Millipore, Billerica, USA | Milli-Q Wasserfiltrationsanlage |
| Ritter GmbH, Schwabmünchen, Deutschland | ritips 1.25, 12.5 ml |
| Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland | Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl |
| Sartorius, Göttingen, Deutschland | Analytische Waage A2005 |
| Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA | Scotsman Eis-Maschine AF-10 |
| Tecan Group, Männedorf, Schweiz | Infinite M200 Plattenleser Software i-Control 1.3 |
| Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA | Nunclon Delta Surface 96 Well Platte, Flachboden, weiß und durchsichtig Zell Kultur Brutschrank 3336 |

5.2 Verwendete Stimuli und Inhibitoren

| Name | Produktnummer | Firma | Verdünnung in |
|--------------------------------|---------------|--|---------------------------------------|
| 3-AB, 3-aminobenzamid | A0630 | TCI Europe, Zwijnchecht, Belgien | H ₂ O |
| 3-MA, 3-methyladenin | 189490 | Calbiochem, San Diego, USA | H ₂ O (erhitzt auf 100 °C) |
| ABT888 | sc-202901 | Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA | H ₂ O |
| APG 350 | | Apogenix, Heidelberg, Deutschland | Vorverdünnung in Medium |
| Bafilomycin A1 | B- 1080 | LC Laboratories, Woburn, USA | DMSO |
| BHA, butyliertes hydroxyanisol | B1253 | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland | H ₂ O |
| Chloroquin | C6628 | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland | H ₂ O |
| Cycloheximid (CHX) | C1988 | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland | H ₂ O |
| killerTRAIL human, rekombinant | ALX-201-123 | Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland | Vorverdünnung in Medium |
| Necrostatin-1 | 480065 | Calbiochem, San Diego, USA | DMSO |
| Necrosulfonamid | 5025 | Tocris Bioscience, Bristol, UK | DMSO |
| Obatoclox (mesylat) | 803712-79-0 | Cayman Chemical, Ann Arbor, USA | Ethanol |
| Olaparib, AZD2281 | 1464 | Axon Medchem, Groningen, Niederlande | DMSO |
| Omeprazol | 73590-58-6 | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland | Ethanol |
| Rapamycin (Sirolimus) | 53123-88-9 | Selleckchem, München, Deutschland | Ethanol |
| Sangliferin A | | Novartis Pharma, Basel, Schweiz | Clinoleic 20 |
| WIKI4 | 838818-26-1 | Tocris bioscience, Bristol, UK | DMSO |
| XAV 939 | 284028-89-3 | Tocris bioscience, Bristol, UK | DMSO |
| zVAD-fmk (zVAD) | N-1510 | Bachem, Bubendorf, Schweiz | Ethanol |

5.3 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Krebszelllinien untersucht. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Zellkulturen in RPMI1640 (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) mit 10 % (v/v) FCS, 2 mM Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland) und 0,5 mM Natriumpyruvat (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ in Zellkulturflaschen gehalten. Eine Ausnahme bildet die Zelllinie HT-29, welche in McCoys modified Medium mit 10 % (v/v)

FCS, 0,5 mM Natriumpyruvat und 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland) gehalten wurde. Standardmäßig wurde die Zellkultur 2-3-mal pro Woche gesplittet. Der optimale Zeitpunkt zum Splitten ergab sich aus der optischen Beurteilung von Zelldichte, Zellmorphologie und Medium.

Beim Splitten erfolgten alle Arbeitsschritte unter der Sterilbank. Zunächst wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Adhärente Zellen wurden durch Zugabe von 4,5 ml Accutase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und Inkubation bei 37 °C im Brutschrank vom Flaschenboden gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 15 ml Falcons überführt und zentrifugiert (100 x g, 6 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Aus der entstanden Suspension wurde ein Teil zur Erhaltung der Zellkultur abgenommen und mit frischem Medium in eine Zellkulturflasche überführt.

Tabelle 1: Übersicht über die untersuchten Zellkulturlinien

| Name | Zelltyp | Organismus | Bezugsquelle |
|------------------------|--|-------------------|--|
| A818-4 | Pankreas, duktales Adenokarzinom | human | Prof. H. Kalthoff, Kiel |
| A818-6 | Pankreas, duktales Adenokarzinom | human | Generiert und zur Verfügung gestellt von Prof. H. Kalthoff, Kiel |
| BxPC-3 | Pankreas, duktales Adenokarzinom | human | ATCC, Manassas, VA, USA |
| Colo 357 WT | Pankreas, adenosquamöses Karzinom (Lymphknotenmetastase) Wildtyp | human | Generiert und zur Verfügung gestellt von Prof. H. Kalthoff, Kiel |
| Colo 357 Vektor | Pankreas, adenosquamöses Karzinom, (Lymphknotenmetastase) Stabil transfiziert mit Plasmid ohne Bcl-xL als Negativkontrolle | human | Generiert und zur Verfügung gestellt von Prof. H. Kalthoff, Kiel |
| Colo 357 Bcl-xL | Pankreas, adenosquamöses Karzinom, (Lymphknotenmetastase) Stabil transfiziert mit Plasmid zur Bcl-xL Überexpression | human | Generiert und zur Verfügung gestellt von Prof. H. Kalthoff, Kiel |
| HT-29 | Kolon, Adenokarzinom | human | ATCC, Manassas, VA, USA |
| Mz-ChA-1 | Gallenblase, Gallenblasenkarzinom, (Peritonealmetastase) | human | Prof. H. Kalthoff, Kiel |
| Panc-Tu1 | Pankreas, duktales Adenokarzinom | human | Prof. H. Kalthoff, Kiel |
| PT-45-P1 | Pankreas, duktales Adenokarzinom | human | Prof. H. Kalthoff, Kiel |
| SK-Mel-28 | Haut, malignes Melanom | human | ATCC, Manassas, VA, USA |

5.4 Lebendzellzählung

Die Bestimmung der Konzentration lebender Zellen in einer Zellsuspension erfolgte mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Dazu wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl des anionischen Diazofarbstoffes Trypanblau im Verhältnis 1:1 gemischt und in die Zählkammer pipettiert. Es erfolgte die Auszählung der lebenden, ungefärbten Zellen in 2 Großquadraten mit anschließender Berechnung der gesuchten Zellkonzentration nach folgender Formel:

$$C = \frac{\text{Summe ausgezählter Zellen in Großquadraten}}{\text{Anzahl ausgezählter Großquadrate}} \times 10000 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$C = \text{Zellzahl pro ml Suspension}$$

5.5 Selektion genetisch veränderter Zelllinien

In der Arbeit wurde mit genetisch veränderten Varianten der Zelllinie Colo 357 gearbeitet, mit Zellen einer Bcl-xL-Überexpression bzw. der entsprechenden Vektorkontrolle. Da die Transfektion mittels Vektor nicht dauerhaft stabil ist, mussten die genetisch veränderten Zellen mit der Zeit erneut selektioniert werden. Zu diesem Zweck befand sich auf den verwendeten Vektoren das Puromycin Resistenzgen Puromycin-N-Acetyl Transferase (PAC). Nach Zugabe von Puromycin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) der Konzentration 1µg/ml überlebten nur die Vektor tragenden Zellen.

5.6 siRNA-Transfektion

Ziel der siRNA-Transfektion war die Herunterregulation der Genexpression eines spezifischen Proteins. Die Transfektion erfolgte durch Nukleofektion, bei der die siRNA durch Elektroporation in die Zelle eingebracht wird.

Bei den Zellen, die für die Transfektionsversuche verwendet wurden, handelt es sich um Colo 357- und HT-29-Zellen. Zunächst wurden die Zellen wie in 5.4 beschrieben abgelöst und gezählt. Pro Transfektion wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen verwendet. Die Zellen wurden zunächst pelletiert (100 g, 6 min, RT) und in 110 µl Transfektionslösung R (Lonza Group AG, Basel, Schweiz) resuspendiert. Es folgte die Transfektion mit dem Lonza Nucleofector II unter Verwendung der Programme T20 für Colo 357- und W17 für HT-29-Zellen. Dazu wurden 1,5 µl einer 100 µM siRNA Lösung (siehe Tabelle 2) in die Transfektionsküvette vorgelegt und mit 100 µl der Zellsuspension vermischt. Nach Transfektion wurden die Zellen mit einer Pasteur-Pipette aufgenommen und auf 3 Wells einer 6 Well Platte mit je 2 ml vorgewärmtem und mit CO₂ begastem Medium verteilt.

Nach 24 h bzw. 48 h wurden die transfizierten Zellen auf 12 Well Platten ($1 \cdot 10^5$ Zellen/1 ml/Well) zur durchflusszytometrischen Analyse und auf 96 Well Platten ($1 \cdot 10^4$ Zellen/0,1 ml/Well) zur ATP-Messung ausgesät. Nach weiteren 24 h erfolgte die Stimulation der ausgesäten Zellen und die Herstellung von Zelllysaten aus den restlichen Zellen. Die Zelllysate dienten als Transfektionskontrolle mittels SDS-PAGE und Western Blot. Als Negativkontrolle wurde jeweils eine Probe mit unspezifischer Non-Target siRNA transfiziert. Dabei handelt es sich um eine siRNA, die nachweislich im menschlichen Genom an keine Zielsequenz bindet.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten siRNAs.

| Name der siRNA | Spezifität | Firma |
|--|-------------------|--|
| ATG5 | Human | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| PARP1 | Human | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Non-Target siRNA (Negativkontrolle) | Keine | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |

5.7 Herstellung von Zelllysaten

Zur Untersuchung der intrazellulären Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot wurden Zelllysate hergestellt. Dazu wurden die Zellen zunächst, wie unter 5.3 beschrieben, mittels Accutase abgelöst und zentrifugiert (100 x g, 6 min, RT). Das Zellpellet wurde dreimal mit 4 °C kaltem PBS gewaschen und zentrifugiert (400 x g, 5 min, 4°C). Danach wurde es in 800 µl kaltem PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 400 x g und 4°C wurde der Überstand abgenommen und das Pellet je nach Größe mit 100-300 µl TNE-Lyse-Puffer (50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 2 mM EDTA) 4 % (w/v) Boehringer Complete, 1 M NaF, 0,1 % w/v NaVanadat resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Lysat von den verbleibenden Zelltrümmern durch Zentrifugation (20.000 x g, 15 min, 4°C) getrennt und bei -20°C gelagert.

5.8 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung des Proteingehalts in Zelllysaten war nötig, um diese als Proben bei der SDS-Page mit gleicher Proteinmenge auftragen zu können. Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte durch die Bicinchoninsäure (BCA) – Methode.

Zunächst wurden die Zelllysate im Verhältnis 1:10 und 1:20 mit TNE-Puffer (50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 2 mM EDTA) verdünnt und jeweils 10 µl pro Probe auf eine 96 Well Platte mit Flachboden pipettiert. Außerdem wurde eine Standardreihe, zur späteren Erstellung einer Kalibrierungsgeraden, bestehend aus in TNE-Puffer verdünntem FCS der Proteinkonzentrationen 0-1 mg/ml, mit gleichem Probenvolumen aufgetragen. Zur späteren Mittelwertbildung wurde jede Probe

doppelt aufgetragen. Im Anschluss wurde zu jeder Probe 200 µl des BCA Reagenz pipettiert und die Platte für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorption der entstanden Farbreaktion wurde dann photometrisch für eine Wellenlänge von 562 nm bestimmt und mit Hilfe der Kalibrierungsgerade in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

5.9 SDS-PAGE

Ziel der SDS-PAGE ist es, Proteine im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufzutrennen. Zum Auftrennen wurden Trenngel mit 10 % (v/v) oder 12,5 % (v/v) Polyacrylamid benutzt. Ergänzt wurde jedes Trenngel durch ein Sammelgel (5 % (v/v) Polyacrylamid). Die Gele wurden nach der wie in Tabelle 3 dargestellten Zusammensetzung hergestellt und über Nacht bei 4°C auspolymerisiert.

Tabelle 3: Zusammensetzung der angefertigten Gele

| | Sammelgel 5 % | | Trenngel 10 % | | Trenngel 12,5 % | |
|-----------------------------------|---------------|----|---------------|----|-----------------|----|
| Wasser | 1,00 | ml | - | | - | |
| 0,5 M Tris pH 6,8 | 0,40 | ml | - | | - | |
| SDS 10 % | 16,70 | µl | 58,00 | µl | 58,00 | µl |
| 40 % (v/v) Bisacrylamid/Acrylamid | 0,21 | ml | 1,27 | ml | 1,60 | ml |
| TEMED | 1,70 | µl | 5,00 | µl | 5,00 | µl |
| 10 % (w/v) APS | 16,70 | µl | 25,00 | µl | 25,00 | µl |
| 20 % Glycerin | - | | 2,40 | ml | 2,10 | ml |
| 1,5 M Tris pH 8,8 | - | | 1,30 | ml | 1,30 | ml |

Gleiche Proteinmengen (20 µg) wurden mit jeweils 5 µl 5 x Probenpuffer (10 mM Tris/HCL pH 6,8, 1 % (w/v) SDS, 2,5 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol) vermischt und im Wasserbad bei 100 °C für 2 min erhitzt. Im Anschluss wurden die Proben aufgetragen und bei 25 mA pro Gel aufgetrennt, bis die Bromphenol-Lauffront das Gelende erreicht hatte. Als Elektrodenpuffer diente 25 mM Tris/HCL pH 8,2, 200 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS. Als Marker für das Protein-Molekulargewicht diente PageRuler Prestained Protein Ladder (10-170 kDa, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

5.10 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens wurden die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine 0,2 µm Nitrocellulose-Membran überführt. Dies erfolgte in einer Blot-Kammer bei 100 V über 60 Minuten bei 4°C. Als Laufpuffer wurde 25 mM Tris/HCL pH 8,2, 200 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol verwendet. Im Anschluss wurde die Membran mit 5 % (w/v) Milchpulver geblockt, entweder über eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei 4 °C in den in Tabelle 4 aufgeführten Verdünnungen:

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Antikörper mit entsprechender Verdünnung

| Name | Firma | Verdünnung in PBS/T |
|-----------------|---------------------------|---------------------|
| α -Actin | Santa Cruz, C-11, sc-1615 | 1:10000 |
| ATG5 (N-term) | Abgent, AP1812a | 1:1000 |
| PARP1 | Cell Signaling, #9542 | 1:2000 |

Überschüssige Antikörper wurden durch mehrfaches Waschen mit PBS/T (PBS versetzt mit 0,1% (v/v) Tween 20) entfernt. Danach folgte die Inkubation mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern (anti-goat IgG, anti-mouse IgG, anti-rabbit IgG, Jackson Immuno Research, West Grove, Pennsylvania, USA), verdünnt 1:10.000 in 5% (w/v) Milchpulver, über eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen in PBS/T erfolgte die Detektion der Banden durch Erzeugung von Chemilumineszenz (LumiGLO, Cell Signaling, Danvers, USA), welche auf Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare, München, Deutschland) nachgewiesen wurde.

5.11 Zelltodassay mittels intrazellulärer ATP-Messung

Ein Abfall der intrazellulären ATP-Konzentration gilt als Zeichen eines beginnenden Zelltodes. Somit wurde die intrazelluläre ATP-Messung zur Abschätzung der Viabilität einer Zellpopulation genutzt.

Zunächst wurden die Zellen auf einer 96 Well Platte mit einer Dichte von 10.000 Zellen in 100 μ l pro Well ausgesät. 24 Stunden später erfolgte je nach Experiment die entsprechende Stimulation und nach weiteren 24 Stunden die ATP-Messung unter Verwendung von CellTiterGlo (G7570, Promega, Mannheim, Germany). Im Rahmen einer Luciferase-Reaktion entsteht dabei eine ATP-abhängige Lumineszenz, deren Intensität bei einer Wellenlänge von 560 nm mit dem Infinite M200 Plattenleser bestimmt wurde.

5.12 Zelltodassay mittels Propidium-Iodid Färbung und Durchflusszytometrie

Als wichtigster Zelltodmarker diente in dieser Arbeit der Verlust der Membranintegrität, welcher mit Hilfe der Durchflusszytometrie nach Färbung mit Propidium-Iodid detektiert wurde. Propidium-Iodid ist ein Farbstoff, der in die DNA interkaliert, was dann zu roter Fluoreszenz führt. Dabei kann Propidium-Iodid intakte Zellmembranen jedoch nicht überwinden, weshalb es nur zur Anfärbung von Zellen mit Verlust der Membranintegrität kommt.

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen mit einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen pro Well auf 12 Well Platten ausgesät und über Nacht im Inkubator kultiviert. Die Stimulation erfolgte über 24 Stunden und wurde dann durch Überführen der Platte auf 4 °C beendet. Das Medium sowie die mit Accutase abgelösten Zellen wurden in 5 ml FACS-Röhrchen gesammelt, pelletiert (390 x g, 5 min, 4 °C)

und mit PBS gewaschen (versetzt mit 5 mM EDTA). Nach erneuter Zentrifugation (390 x g, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 50 µl Propidium-Iodid Lösung (4µg/ml) (PI, Immunochemistry Laboratories, Bloomington, USA) der Konzentration 4 µg/ml resuspendiert. Die rote Fluoreszenz wurde pro Probe jeweils an dreimal 10.000 Zellen mit dem FACSCalibur Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm BD CellQuest Pro V.4.0.2 (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Die Einteilung einer Zelle als PI-positiv (Verlust der Membranintegrität) erfolgte unter Betrachtung der Intensität der roten PI-Fluoreszenz.

5.13 Intrazelluläre pH-Wert Messung

Cariporid als Inhibitor des Na⁺/H⁺-Antiporters wurde mit dem Ziel verwendet, das Cytosol anzusäuern. Zur Kontrolle der Cariporid-Wirkung diente die intrazelluläre pH-Wert (pHi) Messung mittels des Indikators 2',7'-Bis-(2-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein tetrakis (acetoxymethyl) ester (BCECF-AM). Bei Anregung mit 440 nm (isosbestischer Punkt) ist die Emissionsintensität pH-Wert unabhängig, bei 490 nm abhängig von der Protonenkonzentration. Der Quotient beider gemessener Emissionen korreliert somit mit der Protonenkonzentration unabhängig von Artefakten wie dem Ausbleichen oder Konzentrationsunterschieden des Farbstoffes.

Zunächst wurden die Zellen auf eine 12 Well Platte ausgesät (1*10⁵ Zellen/ 0,5 ml Medium/ Well) und nach 24 Stunden mit 100 µM Cariporid stimuliert. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Inkubation mit 2,5 µM BCECF-AM für 30 min bei 37 °C. Es folgte die photometrische Auswertung mit dem Infinite M200 Plattenleser (Exzitation bei 440 und 490 nm, Emission bei 560 nm).

6 Ergebnisse

6.1 Die Effektivität des TRAIL-Rezeptor Agonisten APG 350 ist mit der von killerTRAIL vergleichbar.

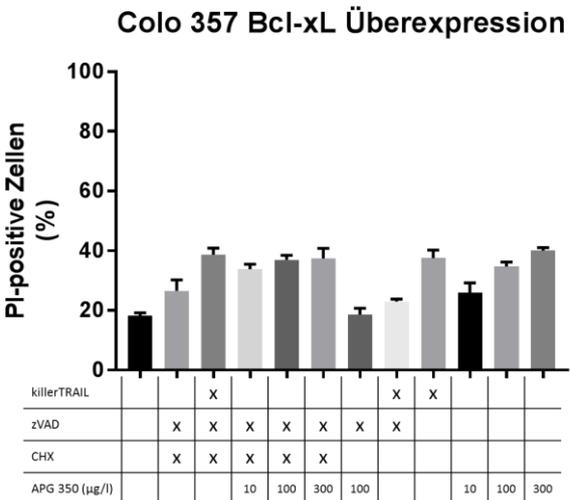
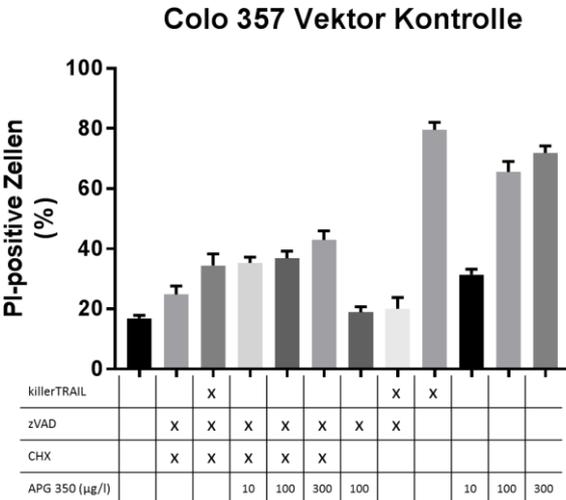
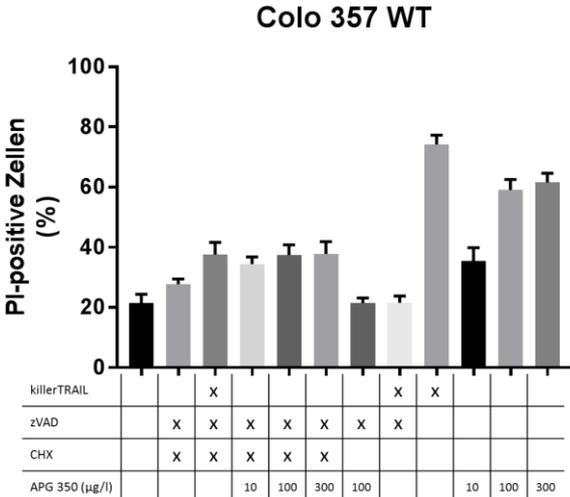
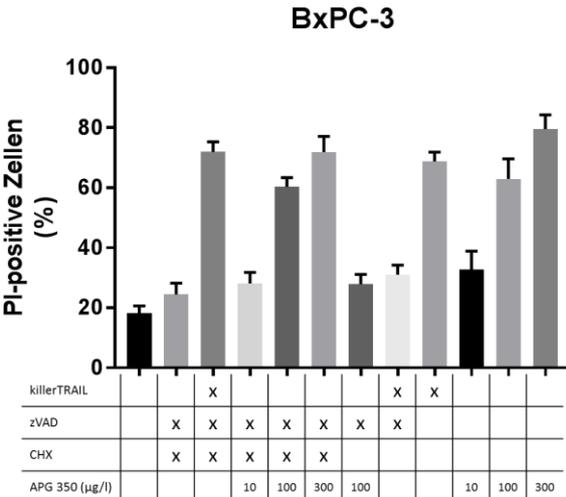
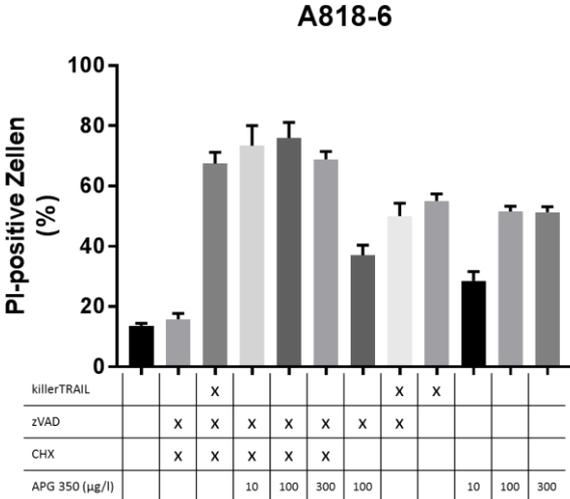
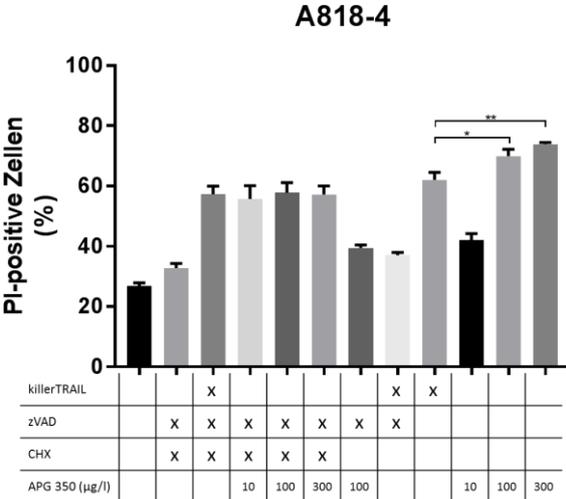
Untersucht wurden mögliche Vorzüge bzw. Nachteile von APG 350 gegenüber dem etablierten TRAIL-Rezeptor Agonisten killerTRAIL. Zu diesem Zweck wurden die Effekte von APG 350 in drei verschiedenen Konzentrationen (10, 100 und 300 ng/ml) mit denen von killerTRAIL in Standarddosierung (100 ng/ml) verglichen. Dabei wurde sowohl die Induktion von Apoptose (TRAIL-Rezeptor Agonist allein) als auch die Induktion von Nekroptose (in Kombination mit zVAD und CHX) untersucht. Durchgeführt wurden die Experimente an 9 verschiedenen humanen Krebszelllinien: A818-4, A818-6, BxPC-3, Colo 357 WT, Colo 357 Vektor Kontrolle, Colo 357 Bcl-xL Überexpression, Mz-ChA-1, Panc-Tu1, PT-45-P1. Die Auswertung erfolgte durch Detektion des Verlustes der Membranintegrität mittels Durchflusszytometrie.

Für alle Zelllinien zeigt sich ein konzentrationsabhängiger Effekt von APG 350 mit steigender Zelltodrate in steigenden Konzentrationen, sowohl für die Apoptose als auch für die Nekroptose. Dabei entsprechen die Effekte von APG 350 und killerTRAIL eingesetzt in gleicher Konzentration (100 ng/ml) weitestgehend einander, allerdings mit wenigen Ausnahmen: Bei den Zelllinien Colo 357 WT und Vektor Kontrolle lag die killerTRAIL vermittelte Apoptoserate um ca. 15% höher als beim Einsatz von APG 350 der gleichen Konzentration. Bei den Zelllinien A818-4 und Panc-Tu1 lag die Apoptoserate unter Verwendung von APG 350 in Konzentrationen ab 100 ng/ml (A818-4) bzw. ab 300 ng/ml (Panc-Tu1) signifikant höher, verglichen mit der Apoptoserate nach Stimulation mit killerTRAIL (siehe Abbildung 7).

Ein besonderes Augenmerk bei dem Vergleich beider Wirkstoffe lag auf den Zelllinien mit Zelltodresistenz, die man durch den Einsatz von APG 350 statt killerTRAIL zu umgehen versuchte. Die Zelllinie PT-45-P1 zeigt eine vollständige Nekroptose-Resistenz, welche sich, wie die Ergebnisse zeigen (siehe Abbildung 7), auch mit APG 350 nicht überwinden lässt. Colo 357-Zellen mit Bcl-xL Überexpression zeichnen sich durch eine ausgeprägte Apoptose-Resistenz aus, welche auch bei Einsatz von APG 350 bestehen bleibt.

Ebenfalls Teil der Betrachtung war der Versuch auf Cycloheximid (CHX) bei der Induktion von Nekroptose zu verzichten. Bei Cycloheximid handelt es sich um ein translationshemmendes Antibiotikum, welches Tumorzellen für den Eintritt in die Nekroptose sensitiviert. Auf Grund seiner Toxizität für eukaryotische Zellen besteht das Bestreben auf diesen Wirkstoff bei einer möglichen Nekroptose-Induktion am Menschen zu verzichten. Wie die Ergebnisse zeigen, führt dies jedoch bei beiden eingesetzten TRAIL-Rezeptor Agonisten bei den meisten Zelllinien zu einem starken Abfall der

Nekroptose-Rate auf Werte, die nur noch knapp oberhalb der Negativkontrolle liegen (siehe Abbildung 7). Am ehesten könnte man laut der Daten auf Cycloheximid bei der Zelllinie A818-6 verzichten, bei der die Nekroptose-Rate zwar abfällt, jedoch auf einem relativ hohen Wert von ca. 50% verbleibt.



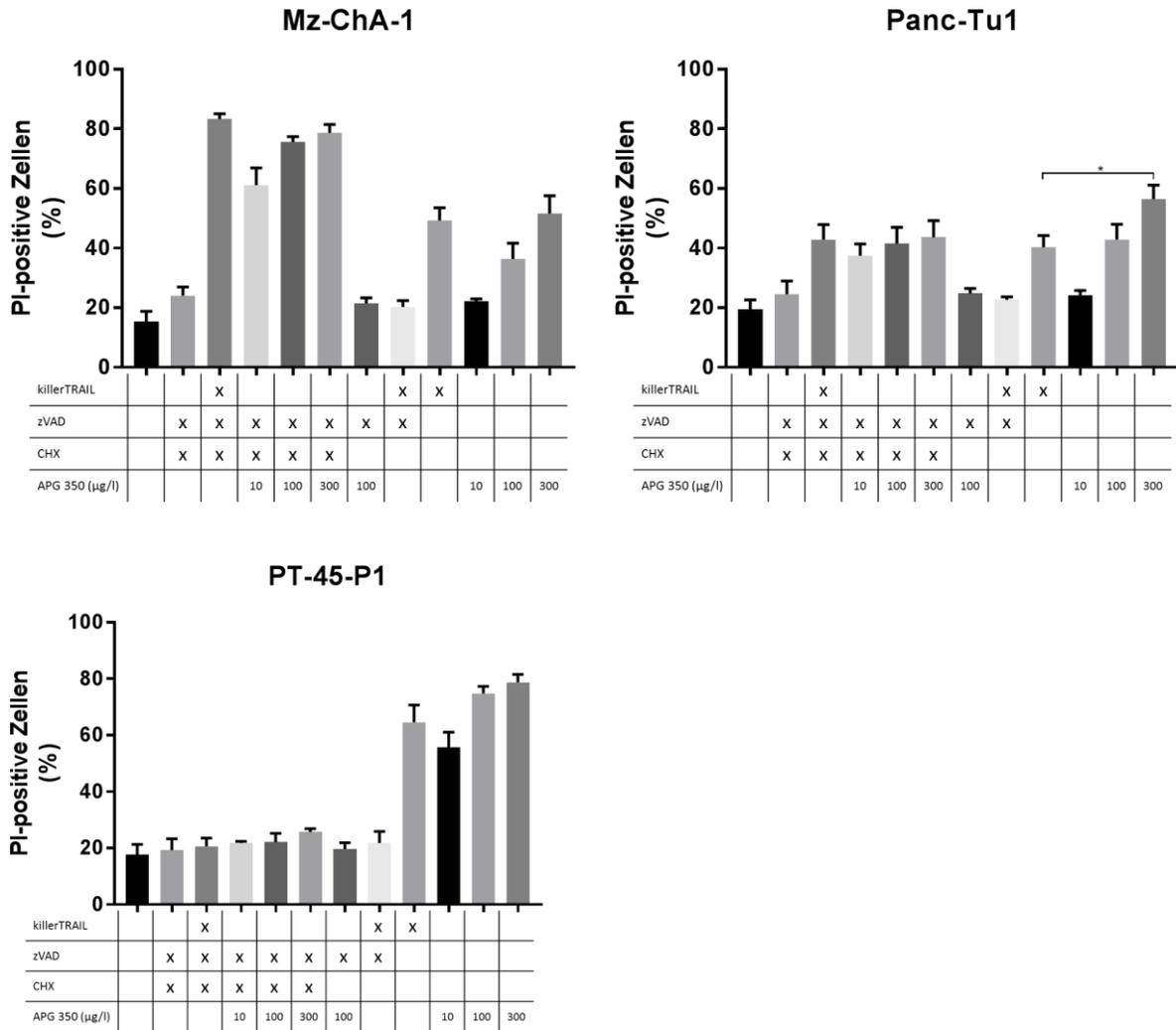


Abbildung 7: Vergleich APG 350 und killerTRAIL anhand der Zelllinien A818-4, A818-6, BxPC-3, Colo 357 WT, Colo 357 Vektor Kontrolle, Colo 357 Bcl-xL Überexpression, Mz-ChA-1, Panc-Tu1, PT-45-P1. Die Zellen verblieben unbehandelt oder wurden zur Induktion von Nekroptose mit 50 µM zVAD und CHX prästimuliert. Die CHX Konzentration war zelllinienabhängig: A818-4 (10 µg/ml), A818-6 (1 µg/ml), BxPC-3 (1 µg/ml), Colo 357 WT (5 µg/ml), Colo 357 Vektor Kontrolle (5 µg/ml), Colo 357 Bcl-xL Überexpression (5 µg/ml), Mz-ChA-1 (2 µg/ml), Panc-Tu1 (10 µg/ml), PT-45-P1 (0,1 µg/ml). Nach einer Stunde erfolgte die Stimulation mit killerTRAIL (100 ng/ml) oder APG 350 mit Konzentrationen von 10, 100 und 300 ng/ml. Die Zugabe von TRAIL-Rezeptor-Agonisten ohne vorherige Prästimulation diente der Induktion von Apoptose. Nach 24 Stunden wurden die Zelltodraten durch PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Werte verkörpern die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten (n=2) mit jeweils drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung. Mit Sternen versehene Klammern zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA): *(p≤0,05), **(p≤0,01)

Bei der Fragestellung ob APG 350 möglicherweise effektiver ist als killerTRAIL, muss die Tatsache berücksichtigt werden, dass die Stoffe in gleichen Massenkonzentrationen verglichen wurden, APG 350 (170 kDa) allerdings ein deutlich höheres Molekulargewicht besitzt als killerTRAIL (24 kDa). Eine Massenkonzentration von 100 ng/ml entspricht einer molaren Konzentration von 4,17 nM für killerTRAIL und nur 0,588 nM für APG 350. Aus diesem Grund wurden beide Substanzen in gleicher molarer Konzentration von 0,588 nM anhand der Kolonkarzinom Zelllinie HT-29 miteinander verglichen. Das Experiment zeigt bei der Induktion von Nekroptose zwischen beiden TRAIL-Rezeptor-Agonisten keinen Unterschied (siehe Abbildung 8), jedoch erscheint die Apoptoserate mit Gebrauch von APG 350 erhöht.

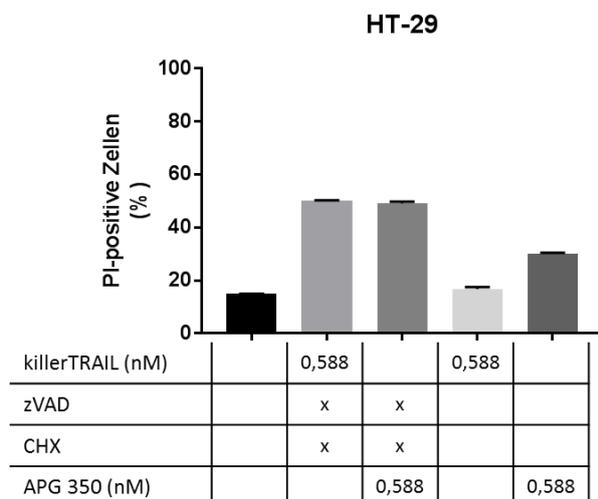


Abbildung 8: Vergleich APG 350 und killerTRAIL in gleicher molarer Konzentration. Die Zellen verblieben unbehandelt oder wurden zur Induktion von Nekroptose mit 50 μ M zVAD und 5 μ g/ml CHX prästimuliert. Nach einer Stunde erfolgte die Stimulation mit killerTRAIL oder APG 350 mit der Konzentration von 0,588 nM. Nach 24 Stunden wurden die Zelltodraten durch PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Werte verkörpern die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten (n=2) mit jeweils drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung.

6.2 Kostimulation mit Cariporid hat keinen Einfluss auf die Nekroptose-Rate

In vorherigen Untersuchungen konnte bereits nachgewiesen werden, dass der Ablauf der TRAIL-vermittelten Nekroptose durch Ansäuerung des extrazellulären pH-Wertes begünstigt wird (Jouan-Lanhouet et al. 2012). In dieser Arbeit sollte der Einfluss einer intrazellulären pH-Wert Erniedrigung untersucht werden. Mit Cariporid steht ein Medikament zur Verfügung, das über die Blockade des Na^+/H^+ Austauschers (NHE1) zu einer Steigerung der Protonenkonzentration im Cytoplasma führt. Daher sollte untersucht werden, ob die Verwendung von Cariporid die TRAIL-vermittelte Nekroptose steigert. Die Experimente erfolgten an den Pankreaskarzinomzelllinien BxPC-3, Panc-Tu1, PT-45-P1, Colo 357 WT, Vektor Kontrolle und Bcl-xL Überexpression. Die Auswertung erfolgte durch Detektion des Verlustes der Membranintegrität mittels Durchflusszytometrie.

Als maximale nicht-toxische Konzentration konnte für Cariporid eine Dosierung von 100 μ M ermittelt werden. Es wurden nun die Effekte von Cariporid sowohl auf die TRAIL-vermittelte Apoptose als auch Nekroptose untersucht. Bei keiner der getesteten Zelllinien konnte Cariporid die TRAIL-vermittelte Nekroptose steigern. Hingegen konnte die Apoptose-Rate bei den Zelllinien Colo 357 Vektor Kontrolle und Colo 357 Bcl-xL Überexpression signifikant gesteigert werden (siehe Abbildung 9).

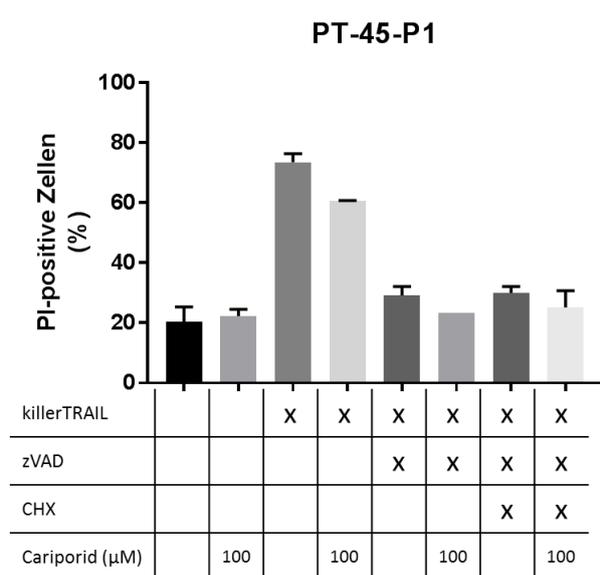
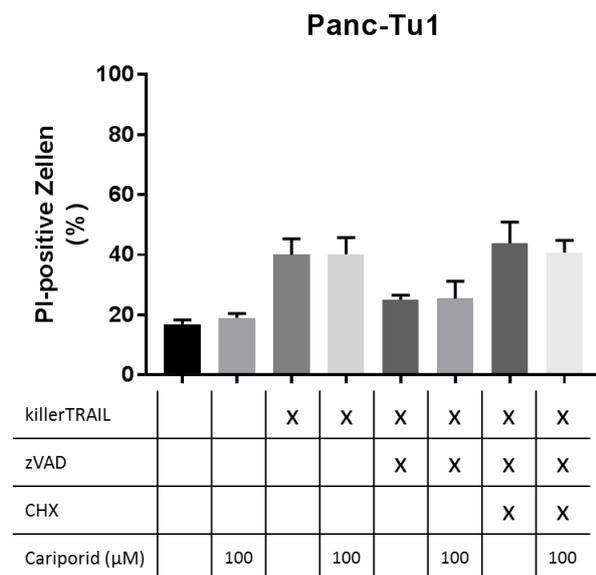
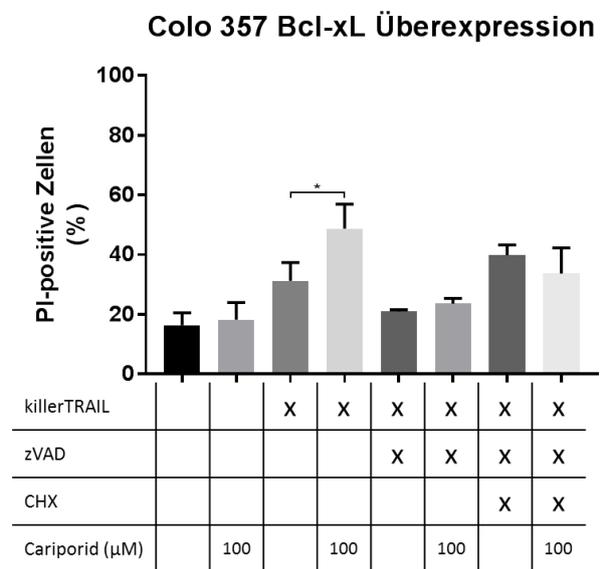
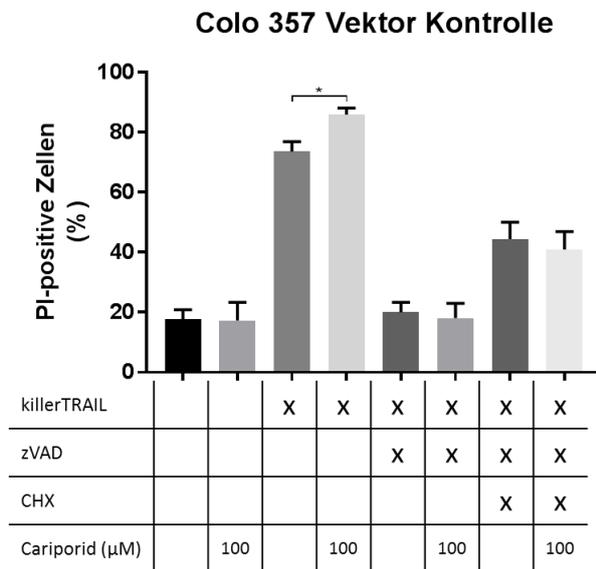
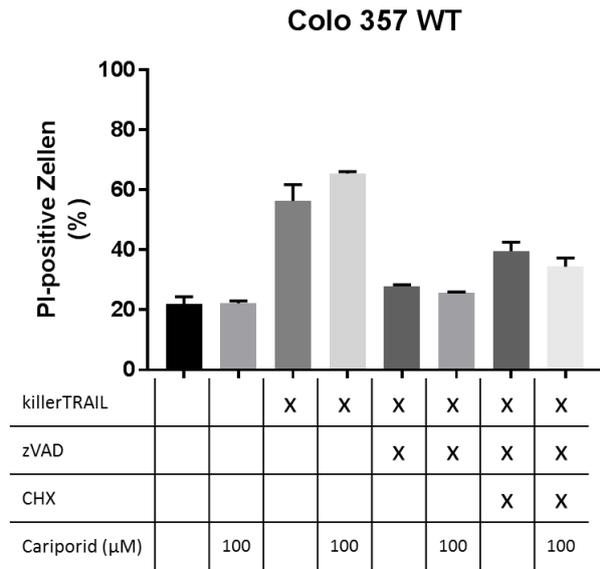
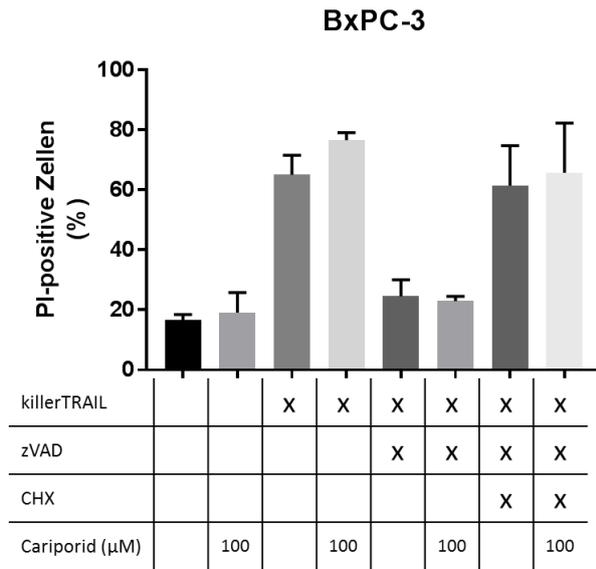


Abbildung 9: Überprüfung der Auswirkungen von Cariporid auf den Ablauf von killerTRAIL vermittelter Apoptose und Nekroptose anhand der Zelllinien BxPC-3, Colo 357 WT, Colo 357 Vektor Kontrolle, Colo 357 Bcl-xL Überexpression, Panc-Tu1 und PT-45-P1. Die Zellen verblieben unbehandelt oder wurden mit Cariporid (100 μ M) für eine Stunde prästimuliert. Zur Induktion von Nekroptose erfolgte die Prästimulation mit zVAD (50 μ M) und CHX für ebenfalls eine Stunde. Die CHX-Konzentration war zelllinienabhängig: BxPC-3 (1 μ g/ml), Colo 357 WT (5 μ g/ml), Colo 357 Vektor Kontrolle (5 μ g/ml), Colo 357 Bcl-xL Überexpression (5 μ g/ml), Panc-Tu1 (10 μ g/ml), PT-45-P1 (0,1 μ g/ml) Es folgte die Stimulation mit killerTRAIL (100 ng/ml). Nach 24 Stunden wurden die Zelltodraten durch PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Werte verkörpern die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten (n=2) mit jeweils drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung. Mit Sternen versehene Klammern zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (t-test): *(p \leq 0,05)

Sollte Cariporid zu einer Sensitivierung der Zellen für die Nekroptose beitragen, bestünde ggf. die Möglichkeit auf Cycloheximid aus den oben genannten Gründen zu verzichten. Wie aus den Daten ersichtlich wird, vermag Cariporid jedoch Cycloheximid nicht zu ersetzen (siehe Abbildung 9).

Um die vermutete Wirkung von Cariporid auf die zelluläre pH-Wert Regulation bestätigen zu können und die gemachten Beobachtungen in ihrem kausalen Zusammenhang besser einordnen zu können, musste abschließend der Einfluss von Cariporid auf den intrazellulären pH-Wert untersucht werden. Dabei ergab die pH_i Messung mit BCECF-AM einen niedrigeren Emissionsquotienten für die Cariporid behandelten Zellen, als für die unbehandelten Zellen, was einer höheren zytoplasmatischen Protonenkonzentration entspricht (siehe Abbildung 10). Quantitative Aussagen im Sinne des Umfangs der pH-Wert Verschiebung waren mit dieser Methode jedoch nicht möglich, zumal der gemessene Unterschied als statistisch nicht signifikant einzustufen ist. Die Experimente wurden an der Zelllinie Colo 357 Vektor Kontrolle durchgeführt, da durch Cariporid in dieser Zelllinie die Apoptoserate signifikant gesteigert werden konnte (siehe Abbildung 9).

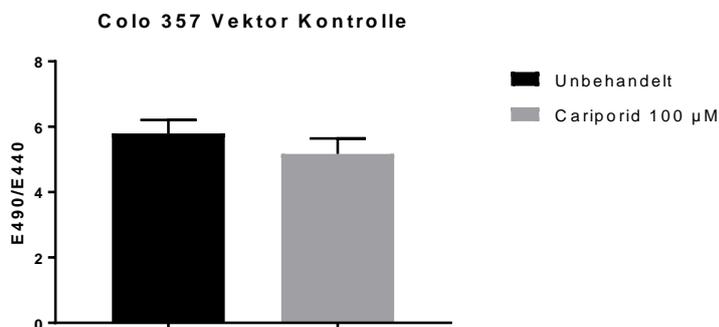


Abbildung 10: Intrazelluläre pH-Wert Messung mittels BCECF-AM. Colo 357 Vektor Zellen verblieben unbehandelt oder wurden mit Cariporid (100 μ M) stimuliert. Nach 24 Stunden erfolgte die Inkubation mit BCECF-AM (2,5 μ M) über 30 Min. mit anschließender photometrischer Auswertung. Gemessen wurde die Emission von Licht der Wellenlänge 560 nm nach Anregung durch einen 440 nm und einen 490 nm Laser und daraus wurden die Quotienten gebildet. Die Werte verkörpern die Mittelwerte dieser Quotienten von drei unabhängigen Experimenten (n=3) mit jeweils drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung.

Mit dem Gedanken, dass in menschlichen Tumorgewebe auf Grund schlechter Vaskularisation oft niedrige pH-Werte vorherrschen und um die Abhängigkeit der Zellen von einer funktionierenden pH-Wert Regulation zu erhöhen, wurden die Zellen in weiteren Versuchen in mit Salzsäure angesäuertem Medium (pH = 6,5) gehalten. Im Verlauf folgte die Stimulation nach dem wie in der Legende zu Abbildung 9 beschriebenen Schema. Bei den getesteten Zelllinien Panc-Tu1, PT-45-P1, Colo 357 Vektor

und Colo 357 Bcl-xL Überexpression konnten Screening-Experimente ebenfalls keinen Cariporid-vermittelten Effekt im Hinblick auf einen Anstieg der Nekroptose-Rate zeigen (siehe Abbildung 11).

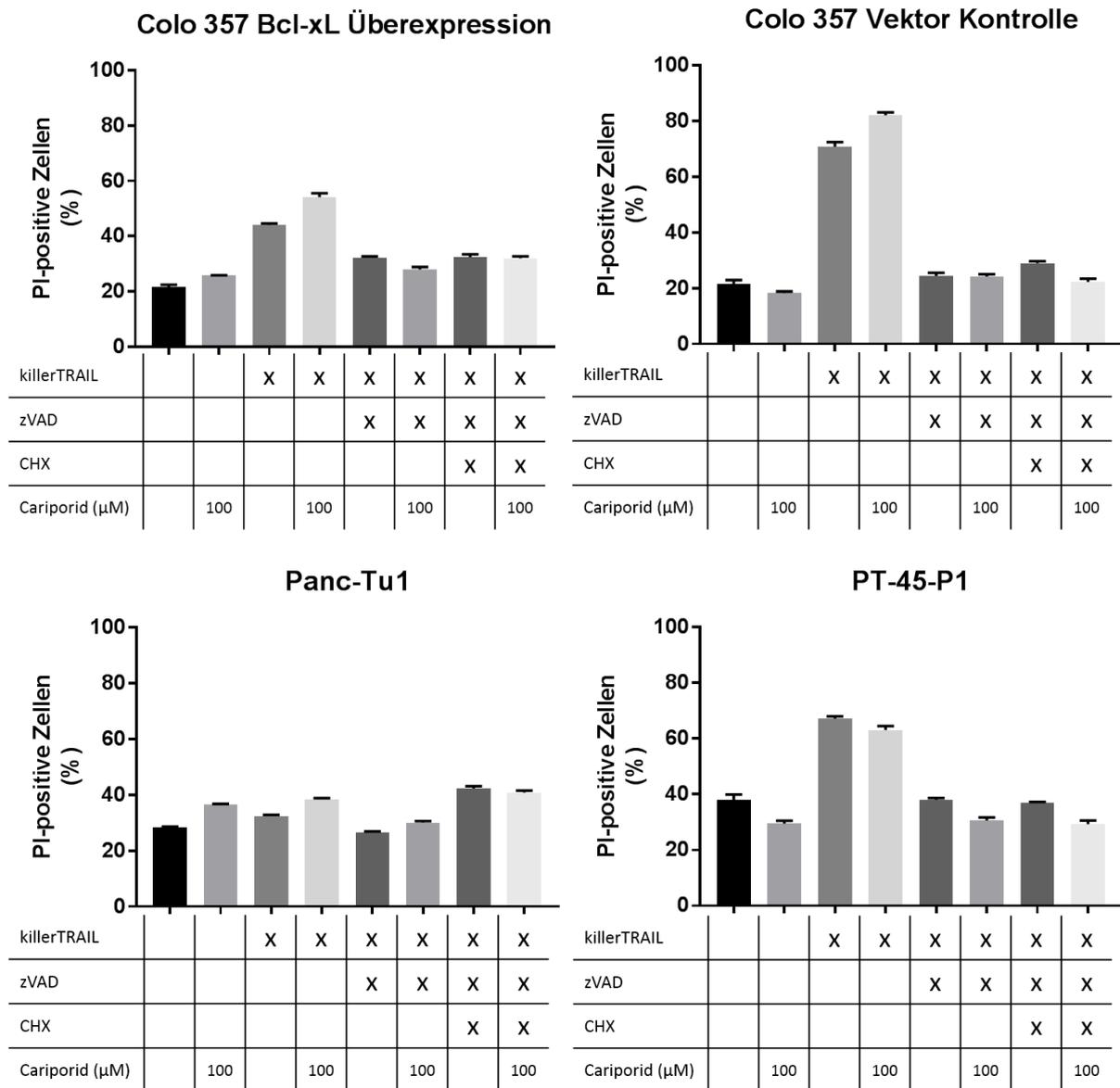


Abbildung 11: Überprüfung der Auswirkungen von Cariporid auf den Ablauf von killerTRAIL vermittelter Apoptose und Nekroptose unter sauren Zellkulturbedingungen (pH 6,5) anhand der Zelllinien Colo 357 Vektor Kontrolle, Colo 357 Bcl-xL Überexpression, Panc-Tu1 und PT-45-P1. Die Zellen verblieben unbehandelt oder wurden mit Cariporid (100 µM) für eine Stunde prästimuliert. Zur Induktion von Nekroptose erfolgte die Prästimulation mit zVAD (50 µM) und CHX für ebenfalls eine Stunde. Die CHX-Konzentration war zelllinienabhängig: Colo 357 Vektor Kontrolle (5 µg/ml), Colo 357 Bcl-xL Überexpression (5 µg/ml), Panc-Tu1 (10 µg/ml), PT-45-P1 (0,1 µg/ml). Es folgte die Stimulation mit killerTRAIL (100 ng/ml). Nach 24 Stunden wurden die Zelltodraten durch PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Über die gesamte Dauer des Experiments von 24 Stunden vor Beginn der Stimulation bis zur durchflusszytometrischen Messung wurden die Zellen in angesäuertem Medium (pH 6,5) gehalten. Die Werte verkörpern die Mittelwerte von einem Experiment (n=1) mit drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung.

6.3 Omeprazol ist zelllinienabhängig in der Lage die Nekroptose leicht zu steigern

In einer Publikation von Marino et al. konnte gezeigt werden, dass Omeprazol in der Lage ist, den intrazellulären pH-Wert zu senken (Marino et al. 2010). Bei Omeprazol handelt es sich um einen weit

verbreiteten Arzneistoff aus der Gruppe der Protonen-Pumpen-Hemmer, der vor allem bei gastroösophagealer Refluxkrankheit und zur Behandlung sowie Prophylaxe von Magengeschwüren eingesetzt wird. Alternativ zu Cariporid wurde nun versucht, mit Omeprazol eine Steigerung der TRAIL-vermittelten Nekroptose zu erzielen. Überprüft wurde dies an den Zelllinien A818-4, Colo 357 WT, PT-45-P1 und HT-29. Als maximale nicht-toxische Konzentration konnte in Vorversuchen für Omeprazol ein Bereich von 50-100 μM ausgemacht werden. Prästimulation in dieser Dosierung führte außer bei HT-29 Zellen zu keiner Steigerung der TRAIL-vermittelten Nekroptose. Bei HT-29-Zellen lag eine signifikante Steigerung von etwa 20 % vor (siehe Abbildung 12).

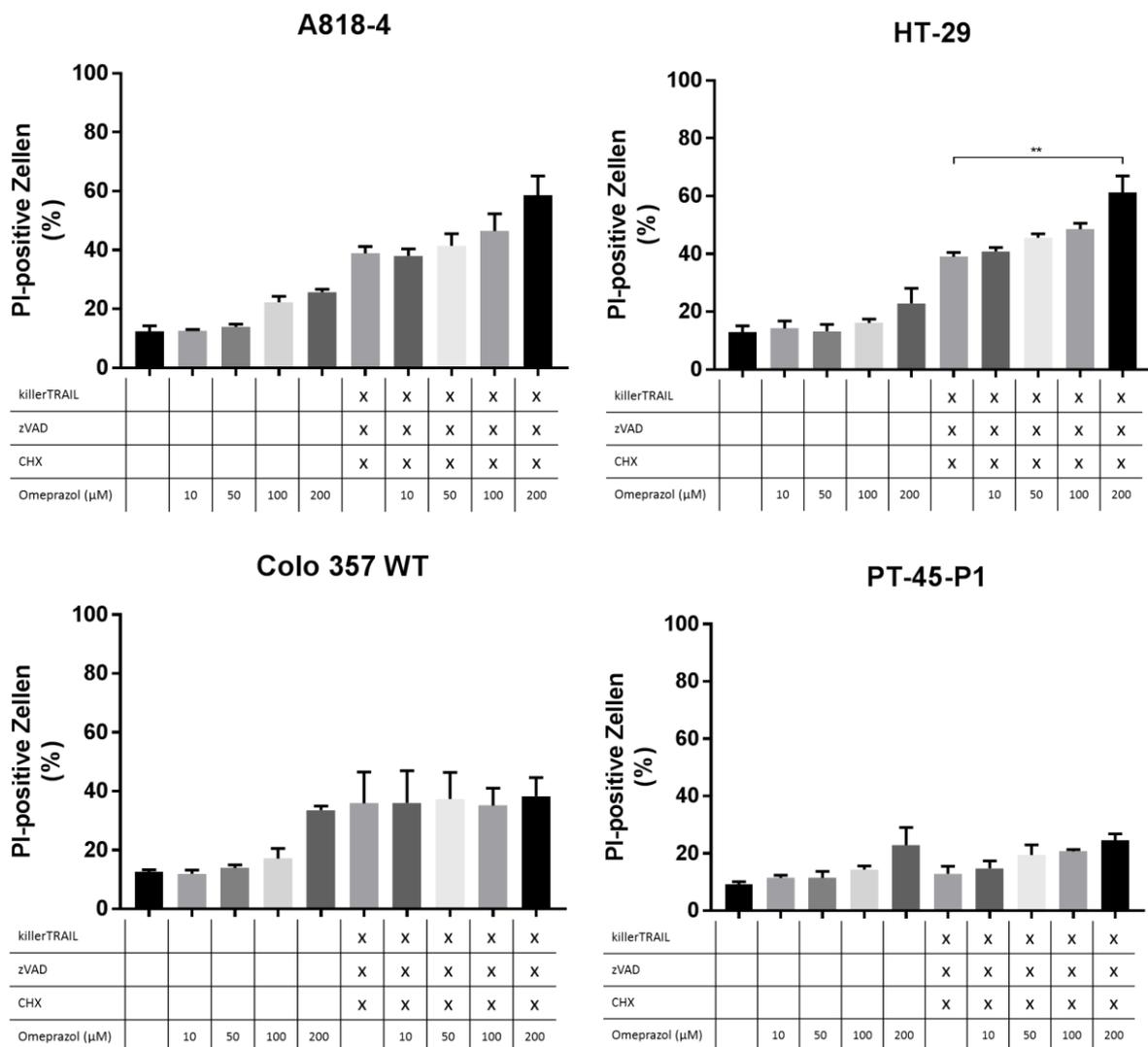
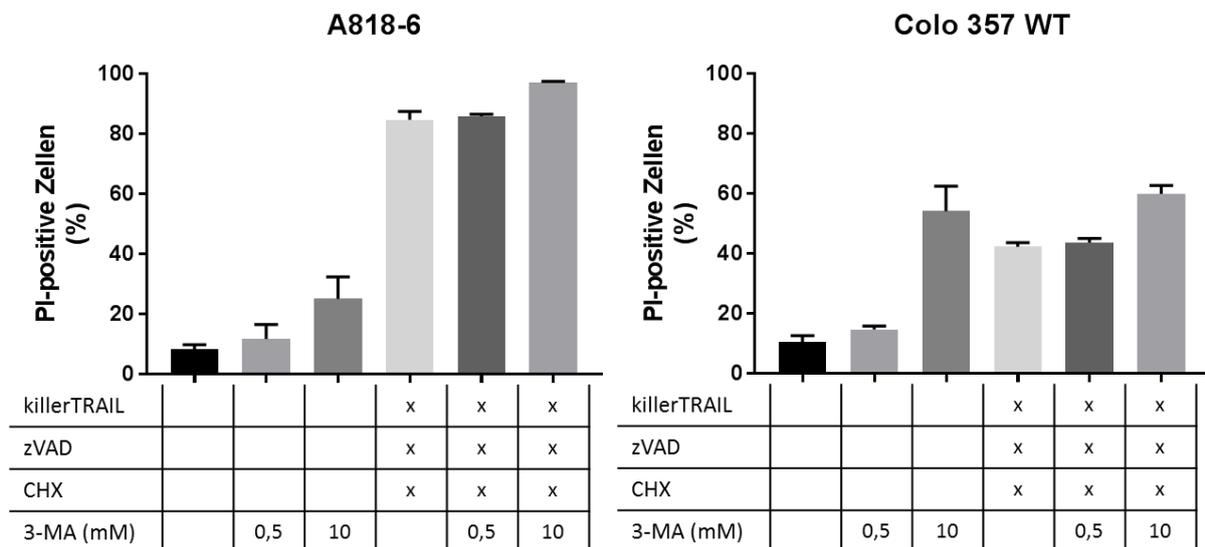


Abbildung 12: Überprüfung der Auswirkungen von Omeprazol auf den Ablauf von killerTRAIL vermittelter Nekroptose anhand der Zelllinien A818-4, Colo 357 WT, HT-29 und PT-45-P1. Die Zellen verblieben unbehandelt oder wurden mit Omeprazol der Konzentrationen 10, 50, 100, 200 μM für eine Stunde prästimuliert. Zur Induktion von Nekroptose erfolgte die Prästimulation mit zVAD (50 μM) und CHX für ebenfalls eine Stunde. Die CHX Konzentration war zelllinienabhängig: A818-4 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Colo 357 WT (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), HT-29 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und PT-45-P1 (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Es folgte die Stimulation mit killerTRAIL (100 ng/ml). Nach 24 Stunden wurden die Zelltodraten durch PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Werte verkörpern die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten ($n=2$) mit jeweils drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung. Mit Sternchen versehene Klammern zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA): **($p \leq 0,01$)

6.4 Nekroptose und Autophagie sind als voneinander unabhängige Zelltodprogramme zu betrachten

Um die Nekroptose als separates Zelltodprogramm klar von der Autophagie abzugrenzen, wurden Tumorzelllinien zur Nekroptose stimuliert und gleichzeitig mit Autophagie-Inhibitoren behandelt. Im Falle eines Zusammenhangs der beiden Zelltodprogramme sollte sich die Nekroptoserate durch Verwendung der Inhibitoren supprimieren lassen.

Als erster Inhibitor wurde 3-Methyladenin (3-MA) verwendet. 3-MA blockiert die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-K) und somit einen initialen Schritt der Autophagosom-Formation. Experimente an den Zelllinien A818-6, Colo 357 WT und PT-45-P1 zeigen sowohl in normaler (0,5 mM) als auch in hoher Dosierung (10 mM) keinen Nekroptose-supprimierenden Effekt von 3-MA. Eine völlige Übereinstimmung von Nekroptose und Autophagie scheint somit ausgeschlossen (siehe Abbildung 13).



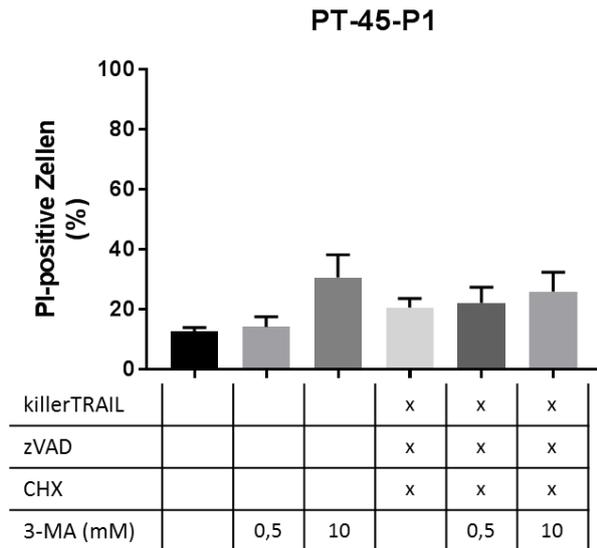


Abbildung 13: Untersuchung zur Supprimierbarkeit der Nekroptoserate an den Zelllinien A818-6, Colo 357 WT und PT-45-P1 durch den Autophagieinhibitor 3-Methyladenin. Die Zellen verblieben unbehandelt oder wurden mit 3-Methyladenin (3-MA) der Konzentrationen 0,5 und 10 mM für eine Stunde prästimuliert. Zur Induktion von Nekroptose erfolgte die Prästimulation mit zVAD (50 μ M) und CHX für ebenfalls eine Stunde. Die CHX Konzentration war zelllinienabhängig: A818-6 (1 μ g/ml), Colo 357 WT (5 μ g/ml), PT-45-P1 (0,1 μ g/ml). Es folgte die Stimulation mit killerTRAIL (100 ng/ml). Nach 24 Stunden wurden die Zelltodraten durch PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Werte verkörpern die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten (n=2) mit jeweils drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung.

Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, ob Nekroptose und Autophagie in ihrem Ablauf auf ähnliche Mechanismen zurückgreifen. Aus diesem Grund wurden Autophagie-Inhibitoren verwendet, die in ihrem Angriffspunkt dem von 3-MA mittelbar nachgeschaltet sind. Chloroquin akkumuliert in Lysosomen, verhindert deren Ansäuerung und somit die Fusion mit dem Autophagosom. Bafilomycin A1 verhindert ebenfalls die Ansäuerung von Lysosomen durch Blockieren der H⁺-ATPase. Beide Inhibitoren wurden ebenfalls bezüglich einer möglichen Nekroptose-Suppression sowohl im Niedrig-, als auch Hochdosisbereich an den Zelllinien A818-6 und PT-45-P1 untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass weder Chloroquin noch Bafilomycin A1 die TRAIL-vermittelte Nekroptose-Rate bei einer der getesteten Zelllinien vermindern konnte (siehe Abbildung 14). Dies stützt die Auffassung, dass Nekroptose auch ohne Autophagie ablaufen kann. Offen bleibt die Frage, ob Autophagie-vermittelter Zelltod auch ohne Nekroptose ablaufen kann.

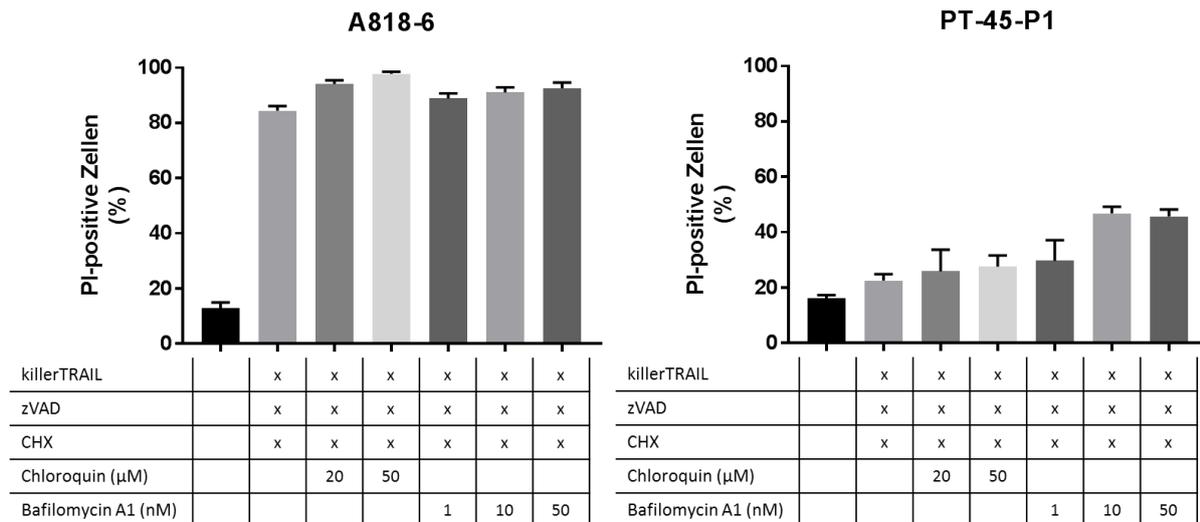


Abbildung 14: Untersuchungen zur Supprimierbarkeit der Nekroptose der Zelllinien A818-6 und PT-45-P1 durch die Autophagieinhibitoren Chloroquin und Bafilomycin A1. Die Zellen verblieben unbehandelt oder wurden mit Chloroquin der Konzentrationen 20 und 50 μM oder mit Bafilomycin A1 der Konzentrationen 1, 10 und 50 nM für eine Stunde prästimuliert. Zur Induktion von Nekroptose erfolgte die Prästimulation mit zVAD (50 μM) und CHX (A818-6: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PT-45-P1: 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für ebenfalls eine Stunde. Es folgte die Stimulation mit killerTRAIL (100 ng/ml). Nach 24 Stunden wurden die Zelltodraten durch PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Werte verkörpern die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten ($n=2$) mit jeweils drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung.

6.5 Herrunterregulation von ATG5 bietet keinen Schutz vor TRAIL-vermittelter

Nekroptose

Aufgrund der in 6.4 gemachten Beobachtungen, die zeigen, dass Nekroptose auch ohne Autophagie ablaufen kann, sollten Autophagie und Nekroptose differenziert voneinander betrachtet werden. Es scheint aber durchaus Schnittpunkte beider Zelltodprogramme zu geben. Möglicherweise handelt es sich bei ATG5, einem Schlüsselprotein der Autophagosomen-Formation, um ein solches Beispiel. In vorangegangenen Experimenten zeigten Mausembryonal-Fibroblasten mit kompletter ATG5-Defizienz einen fast vollständigen Schutz vor TRAIL-vermittelter Nekroptose (Sosna et al. 2016). In weiteren Experimenten sollte nun die Auswirkung einer ATG5-Herrunterregulation auf den Ablauf der TRAIL-vermittelten Nekroptose bei menschlichen Tumorzellen untersucht werden.

Zunächst sollte der Zeitpunkt der größtmöglichen Herrunterregulation von ATG5 bestimmt werden. Menschliche Kolonkarzinomzellen vom Typ HT-29 wurden mit siRNA gegen ATG5 transfiziert und im ersten Ansatz 48 Stunden, im 2. Ansatz 72 Stunden später mit einer Kombination aus killerTRAIL, zVAD und CHX zur Nekroptose stimuliert. In beiden Ansätzen erbrachte die Zelltodanalyse sowohl mittels FACS (siehe Abbildung 15), als auch mittels ATP-Messung (siehe Abbildung 16) keine Protektion der Zellen mit ATG5-Herrunterregulation vor TRAIL-vermittelter Nekroptose. Der erste Kontroll-Western Blot mit einem monoklonalem Antikörper gegen ATG5 zeigte keine erfolgreiche Herrunterregulation. Daraufhin wurde der Western Blot mit einem anderen polyklonalen Antikörper wiederholt und es konnte eine deutliche Herrunterregulation des ATG5/ATG12 Komplexes nach 72 Stunden bei ca. 55

kDa nachgewiesen werden (siehe Abbildung 17). Da ATG5 fast ausschließlich im Komplex mit ATG12 vorliegt, lässt sich eine Herunterregulation von ATG5 (33 kDa) in ungebundener Form kaum darstellen. Wiederholungen der siRNA-Transfektion erfolgten daraufhin immer mit Stimulation nach 72 Stunden, erbrachten aber die gleichen zuvor beschriebenen Ergebnisse.

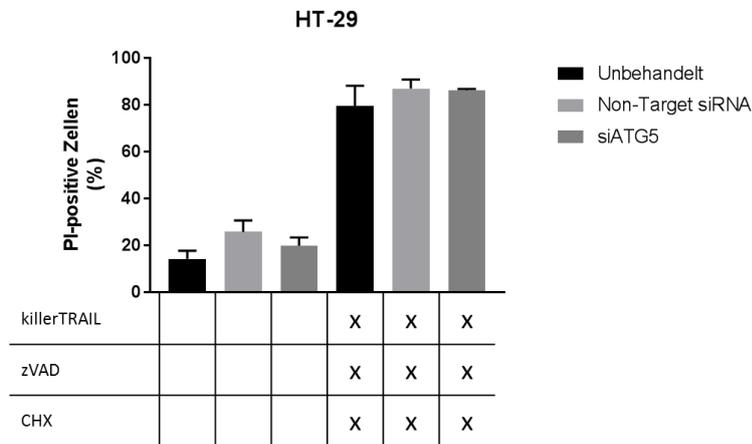


Abbildung 15: Untersuchung auf mögliche Auswirkungen auf den Ablauf der Nekroptose durch Herunterregulation von ATG5 bei HT-29-Kolonkarzinomzellen. 72 Stunden nach Transfektion mit siRNA gegen ATG5 (siATG5) oder der Negativkontrolle (Non-Target siRNA) verblieben die Zellen unbehandelt oder wurden mit zVAD (50 μ M) und CHX (5 μ g/ml) prästimuliert. Nach einer Stunde folgte die Stimulation mit killerTRAIL (100 ng/ml). Nach 24 Stunden wurden die Zelltodraten durch PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Werte verkörpern die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten (n=2) mit jeweils drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung.

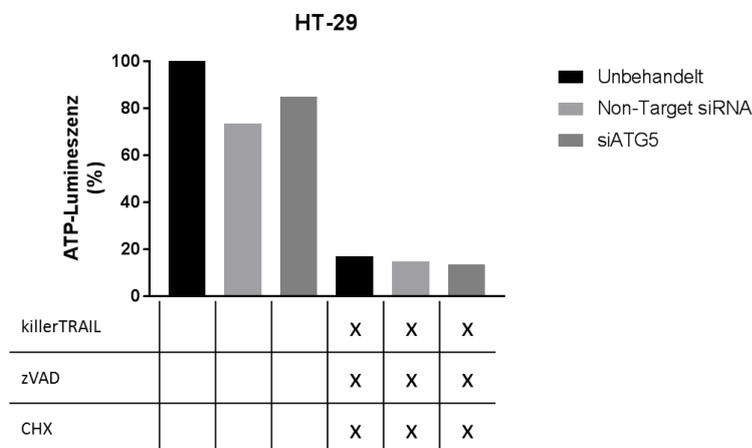


Abbildung 16: Untersuchung auf mögliche Auswirkungen auf den Ablauf der Nekroptose durch Herunterregulation von ATG5 bei HT-29-Kolonkarzinomzellen. 72 Stunden nach Transfektion mit siRNA gegen ATG5 (siATG5) oder der Negativkontrolle (Non-Target siRNA) verblieben die Zellen unbehandelt oder wurden mit zVAD (50 μ M) und CHX (5 μ g/ml) prästimuliert. Nach einer Stunde folgte die Stimulation mit killerTRAIL (100 ng/ml). Nach 24 Stunden wurde die Zellviabilität durch Messung der intrazellulären ATP-Spiegel ermittelt. Die Messwerte der ATP-Lumineszenz wurden ins Verhältnis gesetzt zum Wert der nicht-transfizierten (Unbehandelt) und nicht Nekroptose-stimulierten Probe. (n=1)

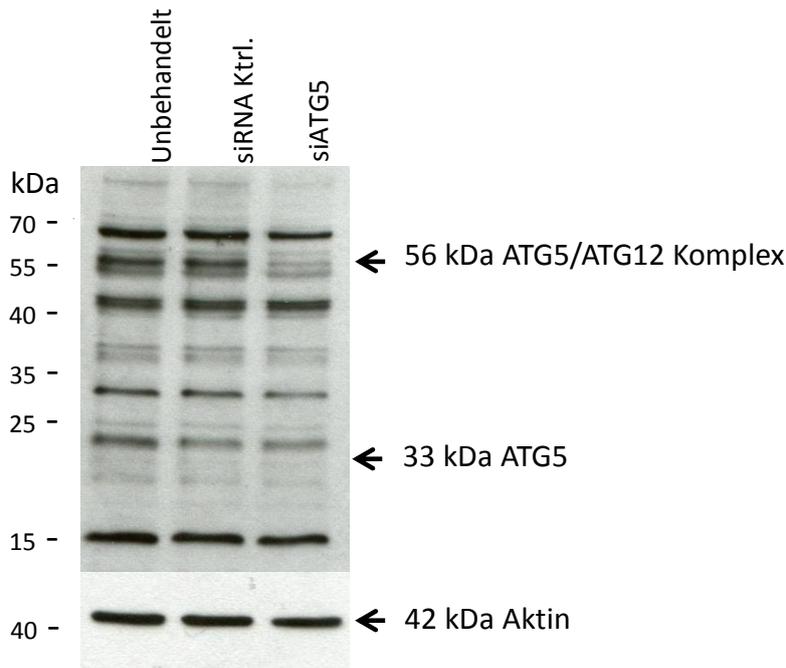


Abbildung 17: Herunterregulation von ATG5 bei HT-29-Kolonkarzinomzellen. Die Transfektion erfolgte wie im Punkt 5.6 beschrieben. Als Transfektionskontrolle wurden die Zellen 72 Stunden nach Transfektion lysiert und die Lysate im Western Blot analysiert. Als Negativkontrollen dienten unbehandelte Zellen (Unbehandelt) und mit Non-Target siRNA transfizierte Zellen (siRNA Ktrl.). Im Vergleich zu diesen zeigen die mit siRNA ATG5 transfizierten Zellen (siATG5) eine deutliche Herunterregulation des ATG5/ATG12-Komplexes bei 56 kDa. Als Ladekontrolle diente ein Reblot mit Antikörpern gegen Aktin.

6.6 Induktion von Autophagie durch Rapamycin und Obatoclax führt zelllinienabhängig zu einer gesteigerten Nekroptoserate

Die fehlende Protektion vor TRAIL-vermittelter Nekroptose durch Herunterregulation von ATG5 schließt einen Zusammenhang von Nekroptose und Autophagie keinesfalls aus, denn in jedem Fall muss bei der Herunterregulation durch siRNA-Transfektion von einer Restaktivität des entsprechenden Proteins ausgegangen werden, welche sich auch deutlich in Abbildung 17 an der entsprechenden Bande zeigt. Eine weitere Möglichkeit Hinweise für den Zusammenhang zwischen Autophagie und Nekroptose zu sammeln besteht darin, die Auswirkung von Autophagie-induzierenden Substanzen auf den Ablauf der TRAIL-vermittelten Nekroptose zu untersuchen. Als solche Substanzen stehen der mTOR-Inhibitor Rapamycin sowie Obatoclax zur Verfügung.

Vorversuche lieferten als maximale nicht-toxische Konzentrationen von Rapamycin Werte von 25 μ M bei HT-29-Zellen. Eine Prästimulation mit der maximalen nicht-toxischen Dosis von Rapamycin führte zu einer leichten Steigerung der TRAIL-vermittelten Nekroptose (+10 %). Auffällig ist, dass die Rapamycin-Prästimulation bei HT-29-Zellen in ansteigender Konzentration bis ca. 10 nM zunächst mit steigender Toxizität einhergeht, die Nekroptoserate jedoch zunächst leicht supprimiert. Wird die Dosis jedoch weiter erhöht, sinkt die Toxizität des Rapamycins während die Nekroptoserate ansteigt (siehe

Abbildung 18). Vorversuche mit erhöhter Rapamycin-Dosis von 50 μM führten zwar zu einer stark erhöhten Nekroptoserate, jedoch beruhend auf einer starken Toxizität von ca. 50 % Zelltod in der Kontrolle. Eine weitere Dosisescalation über 25 μM stellt daher unter Anbetracht der Ergebnisse keine Therapieoption zur Nekroptosesteigerung dar. In Screening-Experimenten an A818-4- und PT-45-P1-Zellen blieb Rapamycin ohne Effekt auf die TRAIL-vermittelte Nekroptose (siehe Abbildung 19).

HT-29

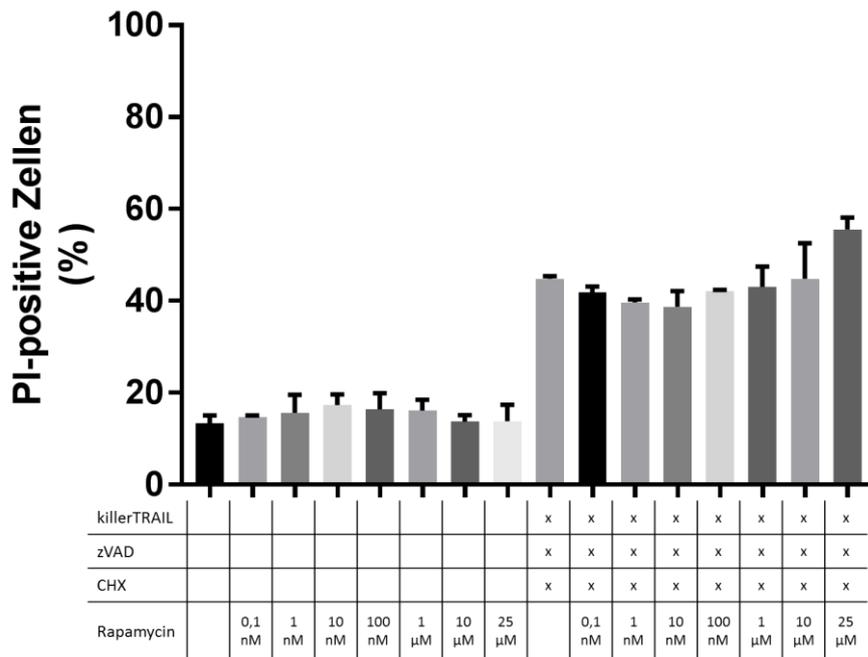


Abbildung 18: Steigerung der Nekroptoserate von HT-29-Kolonkarzinomzellen durch Rapamycin. Die Zellen verblieben unbehandelt oder wurden mit Rapamycin der Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 nM, 1, 10 und 25 μM für eine Stunde prästimuliert. Zur Induktion von Nekroptose erfolgte die Prästimulation mit zVAD (50 μM) und CHX (5 $\mu\text{g/ml}$) für ebenfalls eine Stunde. Es folgte die Stimulation mit killerTRAIL (100 ng/ml). Nach 24 Stunden wurden die Zelltodraten durch PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Werte verkörpern die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten ($n=2$) mit jeweils drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung.

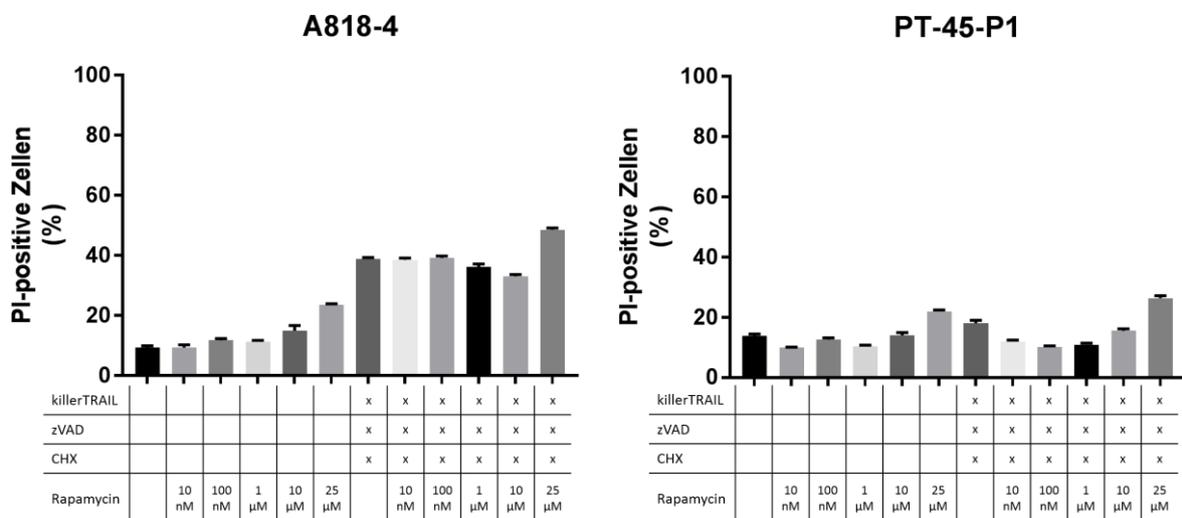


Abbildung 19: Untersuchungen zur Steigerung der Nekroptoserate von A818-4 und PT-45-P1-Pankreaskarzinomzellen durch Rapamycin. Die Zellen verblieben unbehandelt oder wurden mit Rapamycin der Konzentrationen 10, 100 nM, 1, 10 und 25 μ M für eine Stunde prästimuliert. Zur Induktion von Nekroptose erfolgte die Prästimulation mit zVAD (50 μ M) und CHX (A818-4: 10 μ g/ml, PT-45-P1: 0,1 μ g/ml) für ebenfalls eine Stunde. Es folgte die Stimulation mit killerTRAIL (100 ng/ml). Nach 24 Stunden wurden die Zelltodraten durch PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Werte verkörpern die Mittelwerte von einem Experiment (n=1) mit drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung.

Die Versuche mit Obatoclox wurden an den Zelllinien A818-4, HT-29 und PT-45-P1 durchgeführt. Dabei ergab sich als maximale nicht-toxische Konzentration 200 nM für A818-4, bei den anderen beiden Zelllinien lag diese deutlich darunter, konnte allerdings auf Grund von methodischen Problemen, im Sinne einer Eigenfluoreszenz von Obatoclox im PI spezifischen Bereich, nicht genau bestimmt werden. Dieses Artefakt konnte lediglich bei A818-4-Zellen durch Verwendung eines anderen Detektors vermieden werden, für die anderen beiden Zelllinien erfolgte der Zelltodassay daher durch ATP-Messung. Wie die Ergebnisse zeigen, konnte die Prästimulation von A818-4-Zellen mit Obatoclox der Konzentration 200 nM das Ansprechen auf TRAIL-vermittelte Nekroptose von 40 auf 90 % mehr als verdoppeln (siehe Abbildung 20). Für HT-29-Zellen konnte bei der intrazellulären ATP-Messung eine Eigentoxizität von Obatoclox bei steigender Konzentration nachgewiesen werden, jedoch keine Steigerung der Nekroptoserate (siehe Abbildung 21). Für PT-45-P1-Zellen ergaben sich komplex zu interpretierende Ergebnisse. Eine Stimulation mit Obatoclox der Konzentration von 100 nM führte zu einer signifikant gesteigerten Nekroptoserate, jedoch auch zu einer signifikanten Toxizität von Obatoclox per se. Interessanterweise sind bei Dosiserhöhung auf 200 nM Obatoclox sowohl die Eigentoxizität, als auch die Steigerung der Nekroptoserate aufgehoben (siehe Abbildung 21).

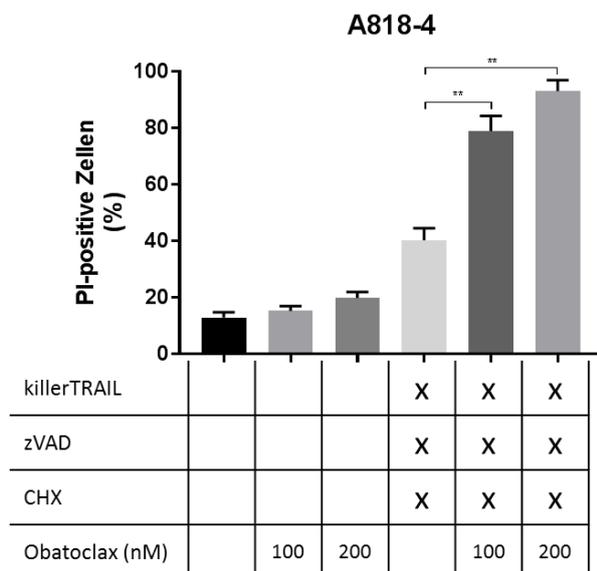


Abbildung 20: Untersuchung zur Steigerung der Nekroptoserate von A818-4-Pankreaskarzinomzellen durch Obatoclox. Die Zellen verblieben unbehandelt oder wurden mit Obatoclox der Konzentrationen 100 und 200 nM für eine Stunde prästimuliert. Zur Induktion von Nekroptose erfolgte die Prästimulation mit zVAD (50 μ M) und CHX (10 μ g/ml) für ebenfalls eine Stunde. Es folgte die Stimulation mit killerTRAIL (100 ng/ml). Nach 24 Stunden wurden die Zelltodraten durch PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Werte verkörpern die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten (n=2) mit jeweils drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung. Mit Sternen versehene Klammern zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA): **($p \leq 0,01$)

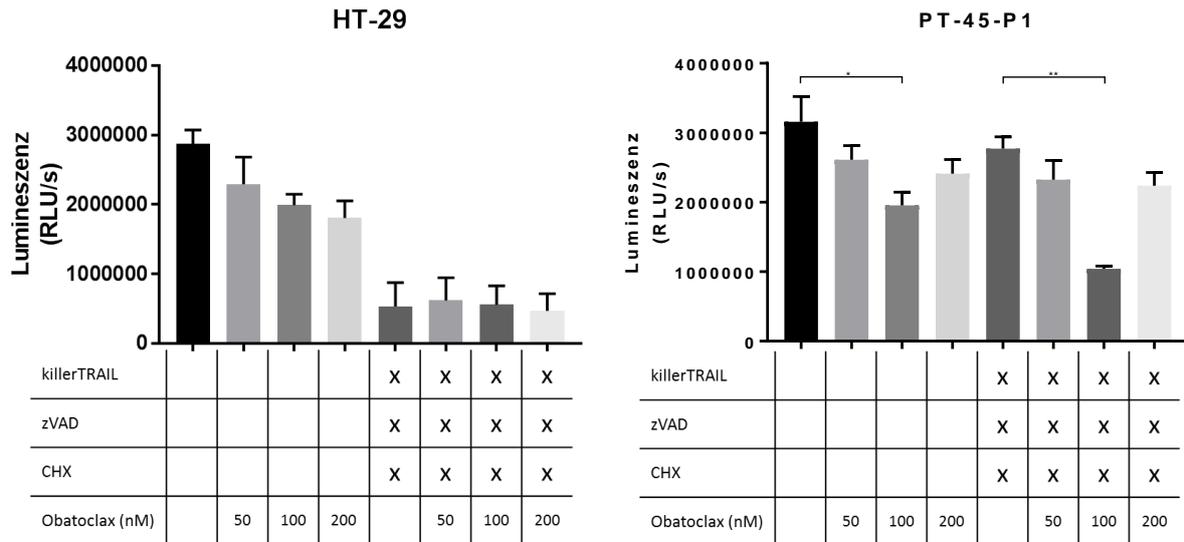


Abbildung 21: Untersuchung zur Steigerung der Nekroptoserate von HT-29- und PT-45-P1-Zellen durch Obatoclox. Die Zellen verblieben unbehandelt oder wurden mit Obatoclox der Konzentrationen 50, 100 und 200 nM für eine Stunde prästimuliert. Zur Induktion von Nekroptose erfolgte die Prästimulation mit zVAD (50 μ M) und CHX (HT-29: 5 μ g/ml, PT-45-P1: 0,1 μ g/ml) für ebenfalls eine Stunde. Es folgte die Stimulation mit killerTRAIL (100 ng/ml). Nach 24 Stunden wurde die Zellviabilität durch Messung der intrazellulären ATP-Spiegel ermittelt. Die Werte verkörpern die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten (n=2) mit jeweils drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung. Mit Sternen versehene Klammern zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA): *($p \leq 0,05$), **($p \leq 0,01$)

Zusammenfassend geben die Ergebnisse von HT-29-Zellen mit Rapamycin-Stimulation und insbesondere die Ergebnisse der Obatoclox stimulierten A818-4-Zellen Hinweise auf einen Zusammenhang der beiden Zelltodprogramme Autophagie und Nekroptose. Weshalb dieser Zusammenhang nur zelllinienspezifisch nachgewiesen werden kann, bleibt unklar.

6.7 PARP-Herrunterregulation hat keine Steigerung der TRAIL-vermittelten Nekroptose zur Folge

Ergebnisse von Sosna et al. zeigten bei MEFs mit PARP1 Knockout ein stark gesteigertes Ansprechen der Zellen auf TRAIL-vermittelte Nekroptose im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen (Sosna et al. 2016). Nun sollten die Auswirkungen einer PARP1-Herrunterregulation mittels siRNA-Transfektion auf menschliche Tumorzellen vom Typ Colo 357 WT und HT-29 untersucht werden. Aus Vorversuchen ging eine maximale Herrunterregulation von PARP1 72 Stunden nach Transfektion hervor. Die erfolgreiche Herrunterregulation zeigt sich im angefertigten Western Blot (siehe Abbildung 22). Eine Sensitivierung für TRAIL-vermittelte Nekroptose konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Sowohl im Zelltodassay mittels Durchflusszytometrie (siehe Abbildung 23) als auch bei der ATP-Messung (siehe Abbildung 24) ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede zu den mit Non-Target siRNA transfizierten Zellen.

Die bestehende PARP1 Restaktivität, wie im Western Blot zu sehen, erklärt möglicherweise den fehlenden Anstieg der Nekroptose-Rate. Durch Verwendung von PARP-Inhibitoren sollte daher versucht werden, die PARP-Aktivität im höheren Maße zu supprimieren.

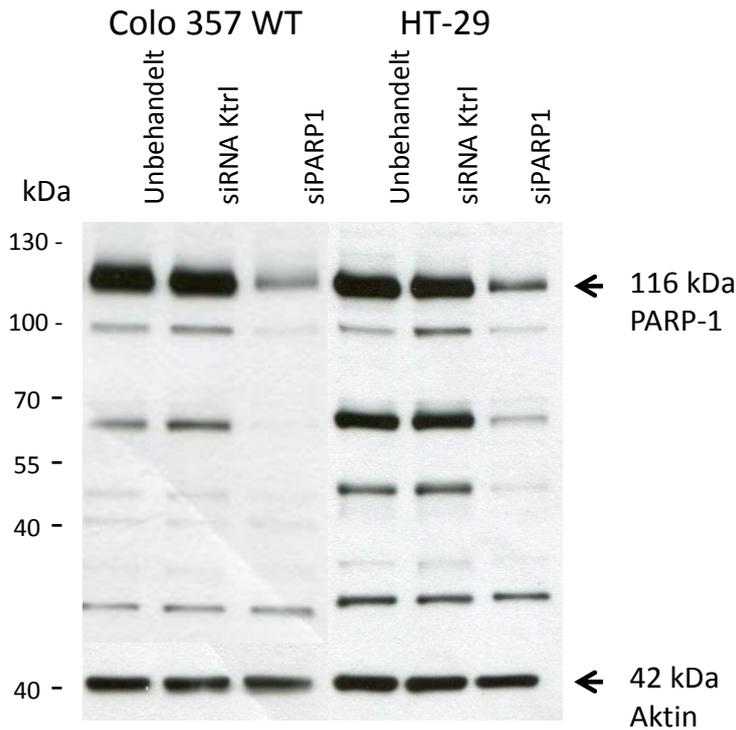


Abbildung 22: Herunterregulation von PARP1 bei Colo 357 WT Pankreaskarzinomzellen und HT-29-Kolonkarzinomzellen. Die Transfektion erfolgte wie im Punkt 5.6 beschrieben. Als Transfektionskontrolle wurden die Zellen 72 Stunden nach Transfektion lysiert und die Lysate im Western Blot analysiert. Als Negativkontrollen dienten unbehandelte Zellen (Unbehandelt) und mit Non-Target siRNA transfizierte Zellen (siRNA Ktrl.). Im Vergleich zu den Kontrollen (siRNA Ktrl.) zeigen die mit siRNA gegen PARP1 transfizierten Zellen (siPARP1) eine deutliche Herunterregulation des PARP1 Proteins bei 116 kDa. Als Ladekontrolle dient ein Aktin-Reblot.

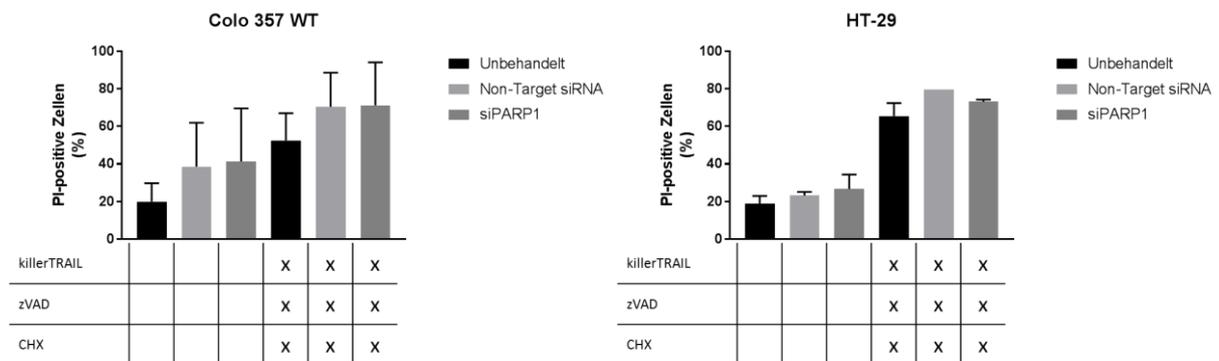


Abbildung 23: Untersuchung auf mögliche Auswirkungen auf den Ablauf der Nekroptose durch Herunterregulation von PARP1 bei Colo 357 WT- und HT-29-Zellen. 72 h nach Transfektion mit siRNA gegen PARP1 (siPARP1) oder der Negativkontrolle (Non-Target siRNA) verblieben die Zellen unbehandelt oder wurden mit zVAD (50 μ M) und CHX (5 μ g/ml) prästimuliert. Nach einer Stunde folgte die Stimulation mit killerTRAIL (100 ng/ml). Nach 24 Stunden wurden die Zelltodraten durch PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Werte verkörpern die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten (n=2) mit jeweils drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung.

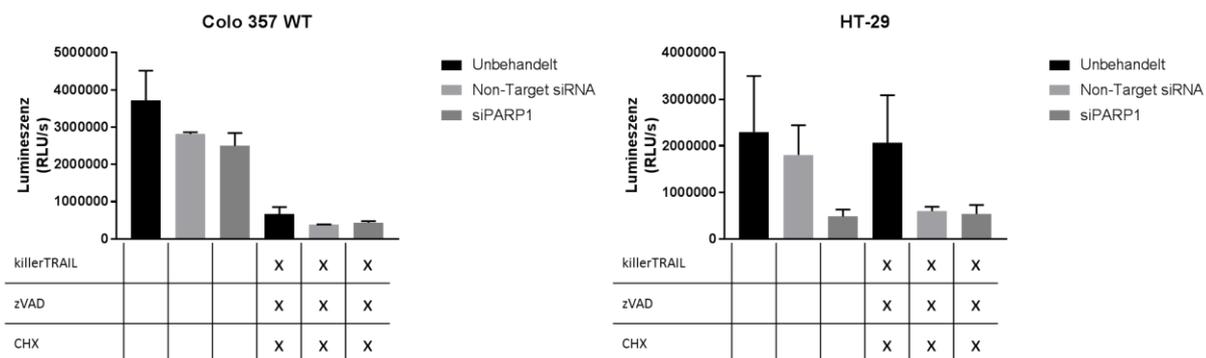


Abbildung 24: Untersuchung auf mögliche Auswirkungen auf den Ablauf der Nekroptose durch Herunterregulation von PARP1 bei Colo 357 WT- und HT-29-Zellen. 72 h nach Transfektion mit siRNA gegen PARP1 (siPARP1) oder der Negativkontrolle (Non-Target siRNA) verblieben die Zellen unbehandelt oder wurden mit zVAD (50 μ M) und CHX (5 μ g/ml) prästimuliert. Nach einer Stunde folgte die Stimulation mit killerTRAIL (100 ng/ml). Nach 24 Stunden wurde die Zellviabilität durch Messung der intrazellulären ATP-Spiegel ermittelt. Die Werte verkörpern die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten (n=2) mit jeweils drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung.

6.8 Die PARP1-Inhibitoren ABT-888 und Olaparib erhöhen zelllinienabhängig das Ansprechen auf TRAIL-vermittelte Nekroptose

Mit ABT-888 und Olaparib stehen zwei PARP1-Inhibitoren zur Verfügung, die bereits klinisch in der Behandlung von BRCA-Mutation positivem Brustkrebs verwendet werden. Hintergrund ist die Überlegung, dass bei Tumorzellen mit BRCA-Mutation, also mit bereits bestehendem Defekt in der DNA-Reparatur, das PARP-Protein als DNA-Reparatur-Enzym umso essentieller für das Überleben und die Proliferation von Tumorzellen ist (Lee et al. 2014). Des Weiteren regulieren Proteine der PARP-Proteine durch PARsylierung die Aktivität anderer Proteine. Ein möglicher additiver Effekt auf die Zelltodrate bei TRAIL-vermittelter Nekroptose wurde daraufhin untersucht.

Beide Inhibitoren wurden an den Tumorzelllinien A818-4, Colo 357 WT, HT-29 und PT-45-P1 getestet. Als maximale nicht-toxische Konzentrationen ergaben sich die in Tabelle 5 aufgeführten Werte.

Tabelle 5: Übersicht über die maximalen nicht-toxischen Konzentrationen von ABT-888 und Olaparib in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie.

| Zelllinie | ABT-888 | Olaparib |
|-------------|-------------|------------|
| A818-4 | 100 μ M | 10 μ M |
| Colo 357 WT | 50 μ M | 10 μ M |
| HT-29 | 200 μ M | 10 μ M |
| PT-45-P1 | 200 μ M | 5 μ M |

Die Ergebnisse der Zelltodassays mittels Durchflusszytometrie zeigen, dass mit beiden PARP-Inhibitoren eine signifikante Steigerung der Nekroptose-Rate um 10-20 % bei HT-29-Kolonkarzinomzellen möglich ist (siehe Abbildung 25 und Abbildung 26). Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit den Beobachtungen der PARP-Herunterregulation, lässt sich jedoch durch einen ggf.

höheren PARP-Aktivitätsverlust unter Verwendung der Inhibitoren erklären. Für diese These spricht der fehlende Effekt von Olaparib und ABT-888 in niedrigerer Konzentration.

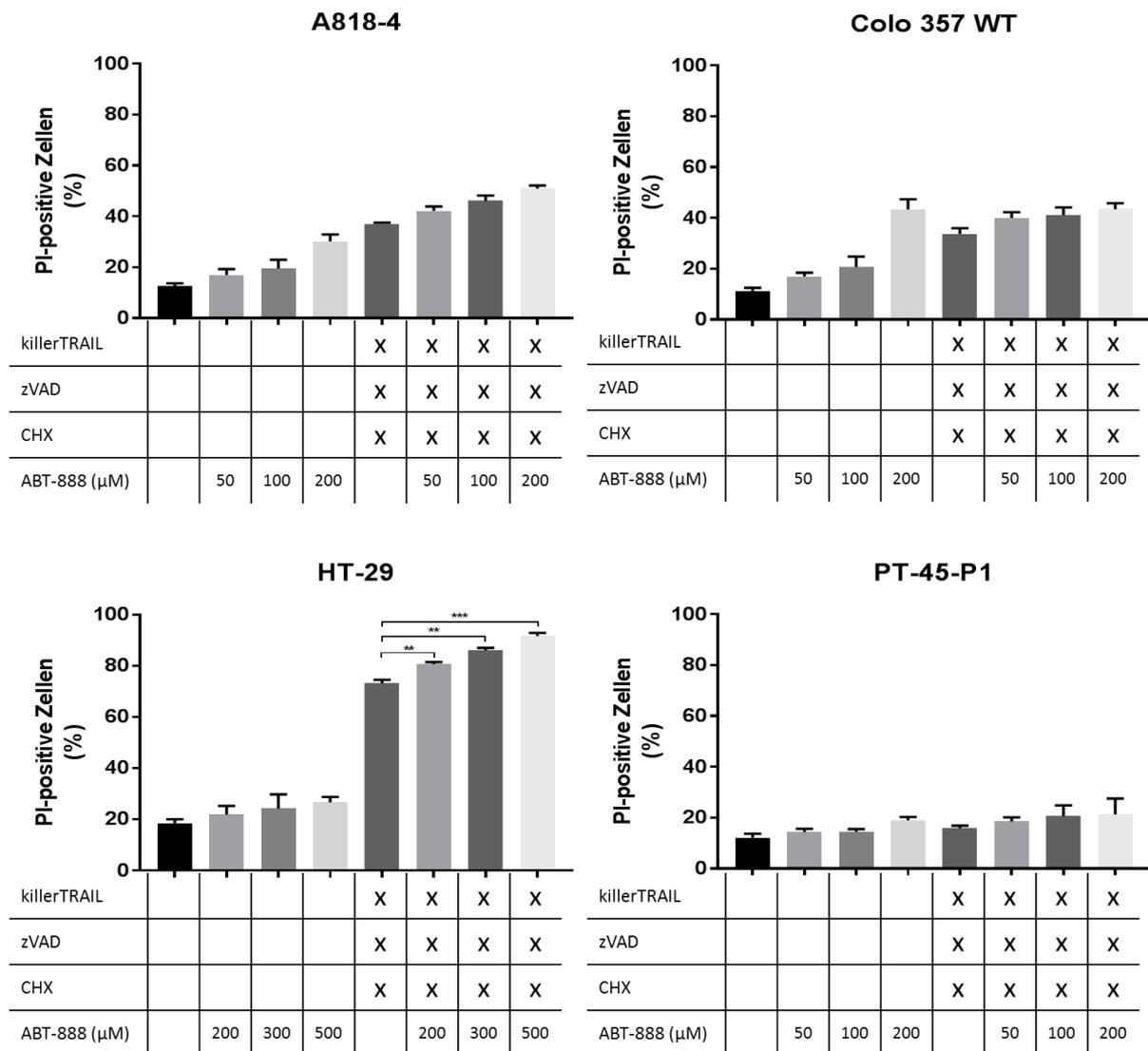


Abbildung 25: Untersuchungen zur Steigerung der Nekroptoserate durch den PARP-Inhibitor ABT-888 an den Zelllinien A818-4, Colo 357 WT, HT-29 und PT-45-P1. Die Zellen verblieben unbehandelt oder wurden mit ABT-888 der Konzentrationen 200, 300 und 500 μM für eine Stunde prästimuliert. Zur Induktion von Nekroptose erfolgte die Prästimulation mit zVAD (50 μM) und CHX (A818-4: 10 μg/ml, Colo 357 WT 5 μg/ml, HT-29: 5 μg/ml, PT-45-P1: 0,1 μg/ml) für ebenfalls eine Stunde. Es folgte die Stimulation mit killerTRAIL (100 ng/ml). Nach 24 Stunden wurden die Zelltodraten durch PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Werte verkörpern die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten (n=2) mit jeweils drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung. Mit Sternen versehene Klammern zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA): *(p<0,05), **(p<0,01), ***(p<0,001)

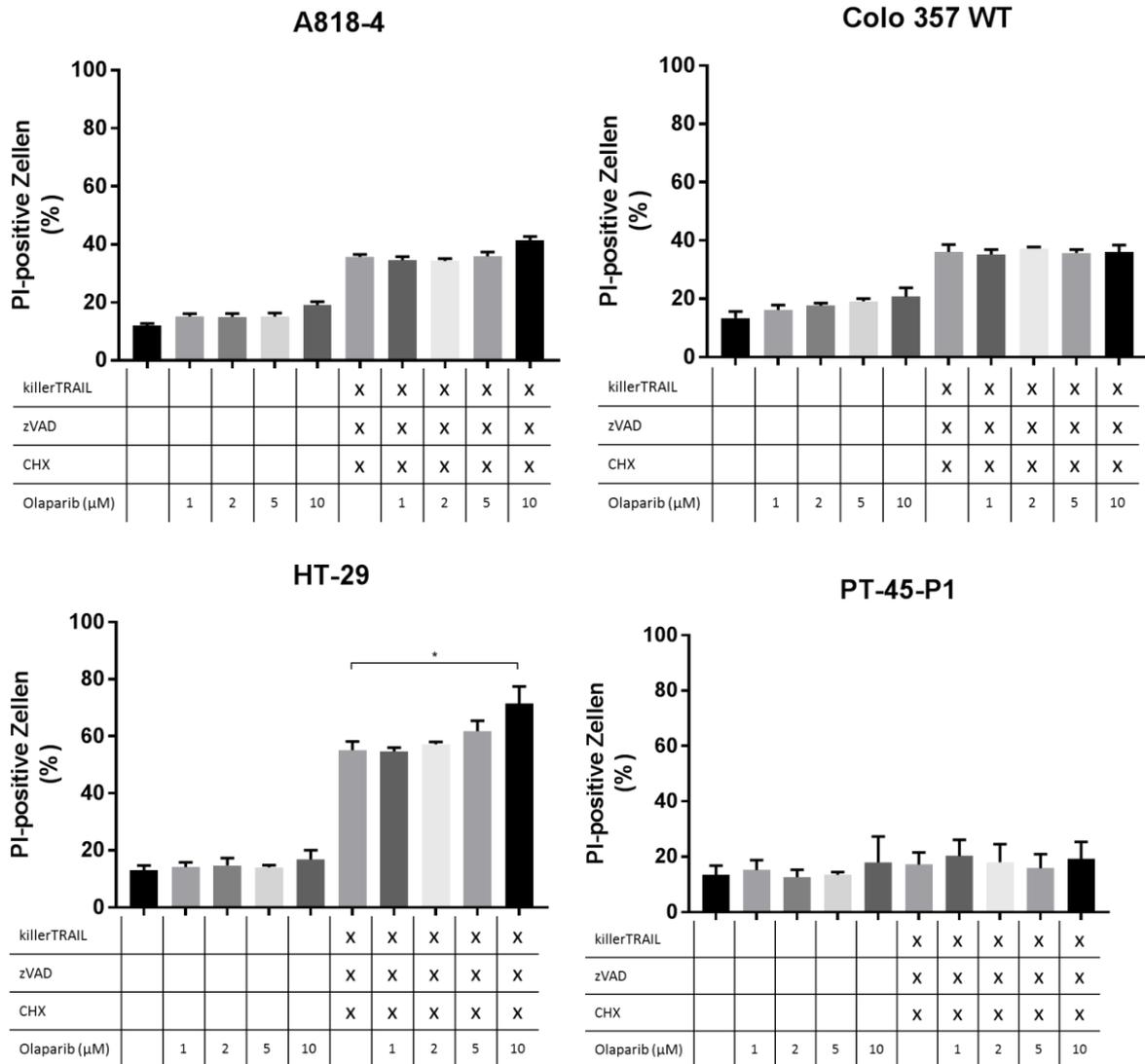


Abbildung 26: Untersuchungen zur Steigerung der Nekroptoserate durch den PARP-Inhibitor Olaparib an den Zelllinien A818-4, Colo 357 WT, HT-29 und PT-45-P1. Die Zellen verblieben unbehandelt oder wurden mit Olaparib der Konzentrationen 1, 2, 5 und 10 μM für eine Stunde prästimuliert. Zur Induktion von Nekroptose erfolgte die Prästimulation mit zVAD (50 μM) und CHX (A818-4: 10 μg/ml, Colo 357 WT 5 μg/ml, HT-29: 5 μg/ml, PT-45-P1: 0,1 μg/ml) für ebenfalls eine Stunde. Es folgte die Stimulation mit killerTRAIL (100 ng/ml). Nach 24 Stunden wurden die Zelltodraten durch PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Werte verkörpern die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten (n=2) mit jeweils drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung. Mit Sternchen versehene Klammern zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA): *(p<0,05)

Bei den drei Pankreaskarzinom-Zelllinien hingegen zeigt sich keine Sensitivierung für TRAIL-vermittelte Nekroptose nach Prästimulation mit PARP1-Inhibitoren (siehe Abbildung 25 und Abbildung 26). Dies entspricht somit auch den Ergebnissen der PARP1-Herrunterregulation von Colo 357 WT-Zellen. Die Auswirkungen eines PARP1 Knockouts bei MEFs lassen sich durch Herrunterregulation und Verwendung von Inhibitoren nur teilweise bei menschlichen Tumorzellen reproduzieren. Die Annahme einer Notwendigkeit eines starken Verlustes der PARP1-Aktivität zur Erhöhung der TRAIL-vermittelten Nekroptose-Rate liegt nahe.

6.9 Inhibition der Tankyrase-Aktivität durch XAV-939 und WIKI4 führt

zelllinienabhängig zu einer Steigerung der TRAIL-vermittelten Nekroptose

Neben der Möglichkeit zur DNA-Reparatur bedürfen Tumorzellen auch der Fähigkeit der Telomereelongation, ohne die eine unbegrenzte Proliferation nicht möglich wäre. Des Weiteren ist der Wnt-Signalweg bei vielen Malignomen verstärkt aktiv und fördert die Zellproliferation. Ein Protein, das sowohl die Telomereelongation, als auch den Wnt-Signalweg fördert, ist das Enzym Tankyrase. Somit erschien der Einsatz von Tankyrase-Inhibitoren in der Krebsbehandlung sinnvoll und sollte im Rahmen dieser Arbeit auf seine additiven Effekte auf die TRAIL-vermittelte Nekroptose-Rate hin untersucht werden.

Die Tankyraseinhibitoren WIKI4 und XAV-939 wurden an den Tumorzelllinien A818-4, Colo 357 WT, HT-29 und PT-45-P1 erprobt. In Vorversuchen wurde zunächst die maximale nicht-toxische Stimulationsdosis ermittelt (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Übersicht über die maximalen nicht-toxischen Konzentrationen von XAV-939 und WIKI4 in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie.

| Zelllinie | XAV-939 | WIKI4 |
|------------------|----------------|--------------|
| A818-4 | 50 µM | 10 µM |
| Colo 357 WT | 50 µM | 10 µM |
| HT-29 | 30 µM | 25 µM |
| PT-45-P1 | 50 µM | 100 µM |

Die Ergebnisse belegen, dass sich durch Prästimulation sowohl mit XAV-939 als auch mit WIKI4 in nicht-toxischen Dosen die Nekroptose-Raten für HT-29-Kolonkarzinomzellen um bis zu 30 % signifikant steigern lassen (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28). Ein additiver Effekt der Ko-Therapie bestehend aus Nekroptose-Stimulation und Tankyrase-Inhibition scheint somit für diese Zelllinie bewiesen. Für die drei anderen getesteten Pankreaskarzinomzelllinien konnten ähnliche Beobachtungen nicht gemacht werden. Lediglich bei A818-4-Zellen ließ sich die Nekroptose-Rate durch Prästimulation mit WIKI4 erhöhen, allerdings erst in Konzentrationen, die per se bereits leicht toxisch sind (siehe Abbildung 27).

Zusammenfassend bietet die Tankyrase-Inhibition die Möglichkeit eine Nekroptose-Therapie deutlich effektiver zu gestalten, allerdings handelt es sich dabei um einen Tumorzelllinien spezifischen Effekt. Der Verdacht auf entscheidende Rolle der Tumorentität beim Ansprechen auf die Tankyrase-Inhibition liegt auf Grund der gemachten Beobachtungen nahe.

Da ein Effekt durch Beeinflussung der Telomereelongation wohl erst nach mehreren durchlaufenen Zellzyklen zu erwarten ist, muss man davon ausgehen, dass die gemachten Beobachtungen nach Tankyrase-Inhibition vor allem auf die Beeinflussung des Wnt-Signalweges zurückzuführen sind. Eine Verbindung zwischen Nekroptose- und Wnt-Signalweg ist demzufolge denkbar.

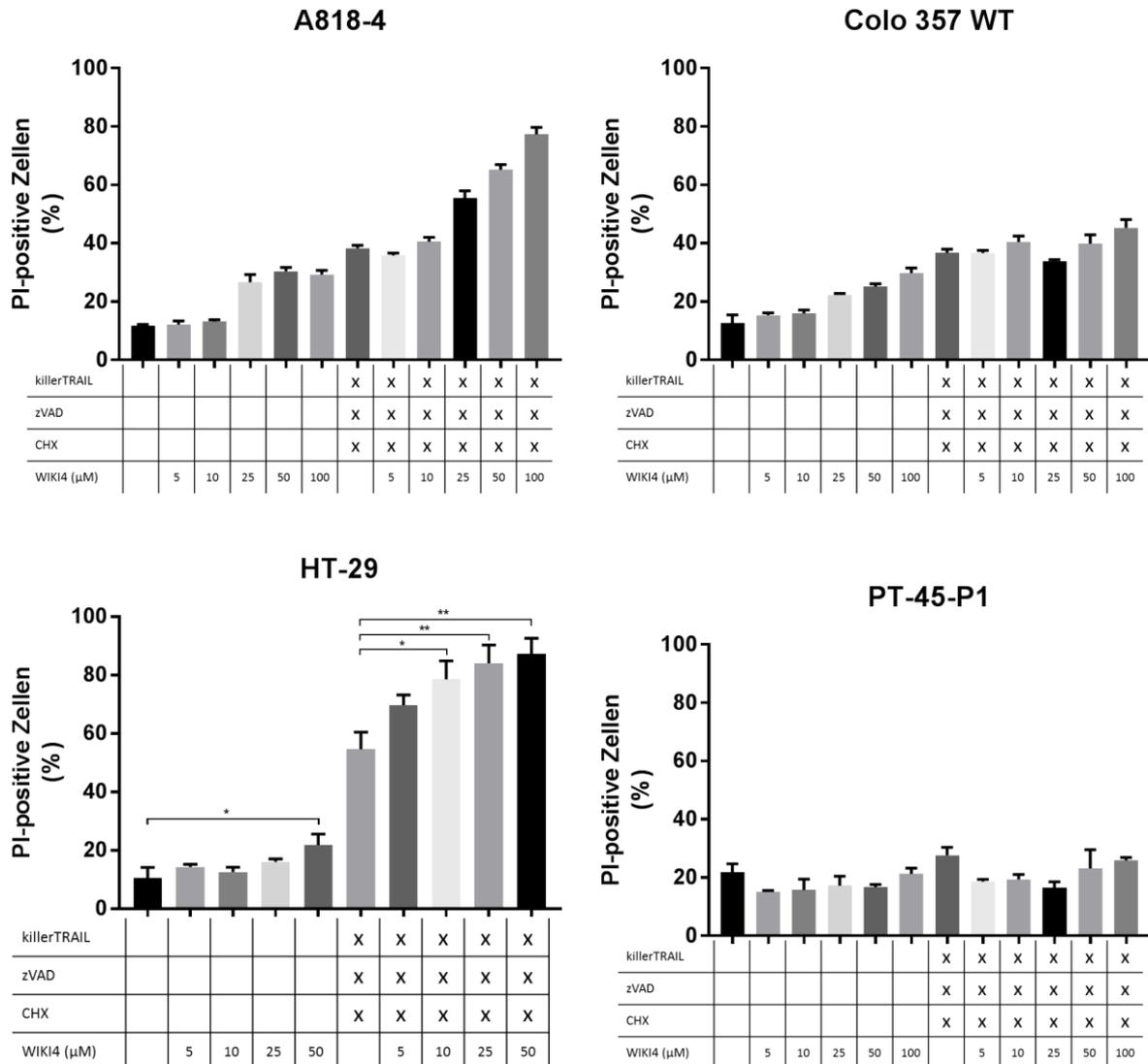


Abbildung 27: Untersuchungen zur Steigerung der Nekroptoserate durch den Telomerase- und Wnt-Signalweg-Inhibitor WIKI4 an den Zelllinien A818-4, Colo 357 WT, HT-29 und PT-45-P1. Die Zellen verblieben unbehandelt oder wurden mit WIKI4 der Konzentrationen 5, 10, 25, 50 und 100 μM für eine Stunde prästimuliert. Zur Induktion von Nekroptose erfolgte die Prästimulation mit zVAD (50 μM) und CHX (A818-4: 10 μg/ml, Colo 357 WT 5 μg/ml, HT-29: 5 μg/ml, PT-45-P1: 0,1 μg/ml) für ebenfalls eine Stunde. Es folgte die Stimulation mit killerTRAIL (100 ng/ml). Nach 24 Stunden wurden die Zelltodraten durch PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Werte verkörpern die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten (n=2) mit jeweils drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung. Mit Sternen versehene Klammern zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA): *(p<0,05), **(p<0,01)

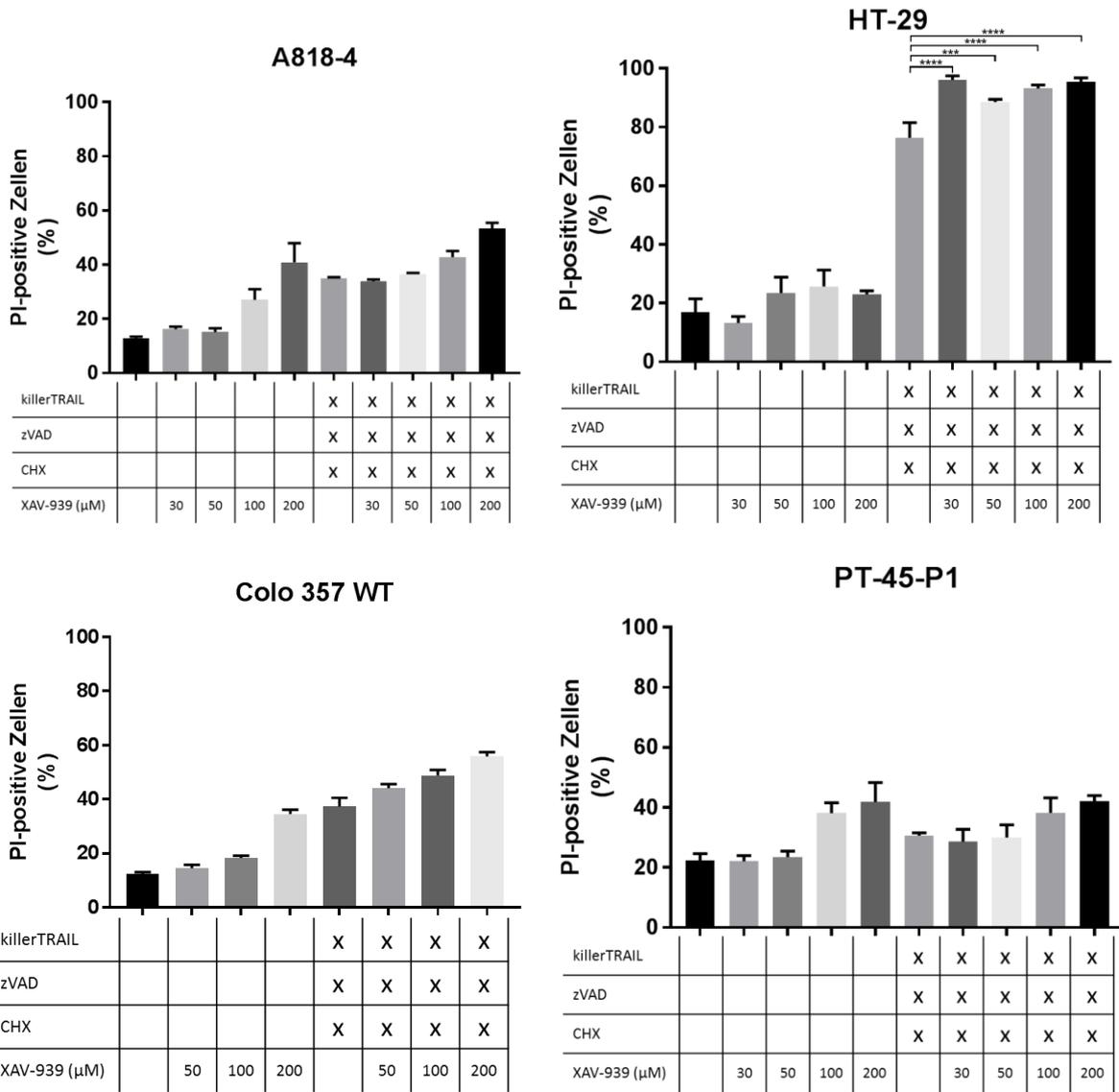


Abbildung 28: Untersuchungen zur Steigerung der Nekroptoserate durch den Telomerase-Inhibitor XAV-939 an den Zelllinien A818-4, Colo 357 WT, HT-29 und PT-45-P1. Die Zellen verblieben unbehandelt oder wurden mit XAV-939 der Konzentrationen 30, 50, 100 und 200 µM für eine Stunde prästimuliert. Zur Induktion von Nekroptose erfolgte die Prästimulation mit zVAD (50 µM) und CHX (A818-4: 10 µg/ml, Colo 357 WT 5 µg/ml, HT-29: 5 µg/ml, PT-45-P1: 0,1 µg/ml) für ebenfalls eine Stunde. Es folgte die Stimulation mit killerTRAIL (100 ng/ml). Nach 24 Stunden wurden die Zelltodraten durch PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Werte verkörpern die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten (n=2) mit jeweils drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung. Mit Sternen versehene Klammern zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA): ***(p≤0,001), ****(p≤0,0001)

6.10 Der durch den Algenwirkstoff Fv1 vermittelte Zelltod bleibt ungeklärt.

Bei Fv1 handelt es sich um einen Azeton-Extrakt der Braunalge *Fucus vesiculosus* aus der Ostsee. In Arbeiten von Geisen et al. zeigte sich eine hohe Toxizität dieses Wirkstoffes gegenüber Tumorzellen, welche durch eigene Versuche an Colo 357 WT- und PT-45-P1-Zellen bestätigt werden konnte. (Geisen et al. 2015)

In der Folge sollte nun der Fv1-vermittelte Zelltod näher beleuchtet werden und auf Schnittstellen mit bekannten regulierten Zelltodprogrammen hin überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden Colo 357 WT-Zellen mit Fv1 in Kombination mit dem jeweiligen Inhibitor eines Zelltodprogrammes stimuliert:

- Inhibition von Apoptose: zVAD-fmk (pan-Caspase-Inhibitor)
- Inhibition von Nekroptose: Necrostatin-1 (RIP1-Inhibitor), Necrosulfonamid (MLKL-Inhibitor)
- Inhibition von PARP-vermittelter Nekrose: Olaparib, 3-Aminobenzamid (beide PARP-Inhibitoren)
- Reactive Oxygen Species (ROS) vermittelte Nekrose: Butylhydroxyanisol (BHA, Antioxidans)
- Cyclophilin D vermittelte Nekrose: Ciclosporin A, Sangliferin A (Cyclophilin D-Inhibitoren)
- Inhibition von Autophagie: 3-MA, Chloroquin, Bafilomycin A1

Die Versuche ergaben unter anderem eine von 70 % auf 60 % erniedrigte Zelltodrate durch die Kombination mit zVAD. Apoptose spielt offenbar bei dem Fv1 vermittelten Zelltod eine Rolle, vermag diesen jedoch nicht vollständig zu erklären. Die Nekroptose-Inhibitoren Nec-1 und NSA blieben wirkungslos, ebenso wie Olaparib, 3-AB und BHA. Nekroptose, PARP-vermittelte Nekrose sowie ROS-vermittelte Nekrose erscheinen daher für den vorliegenden Zelltod irrelevant. Die beiden eingesetzten Cyclophilin-D Inhibitoren lieferten widersprüchliche Ergebnisse. Sangliferin A schien den Zelltod fast vollständig auf 30 % zu inhibieren, Ciclosporin A hingegen verstärkte ihn auf nahezu 90 %. Bei Sangliferin A handelt es sich um eine schwerlösliche Substanz, die daher in „Clinoleic“ verdünnt wurde, eine Substanz zur künstlichen Ernährung von Patienten basierend vor allem auf Oliven- und Sojaölen. Eine Lösungsmittel-Kontrolle zeigte signifikant, dass der Zelltod-inhibierende Effekt allein auf Clinoleic zurückzuführen war (siehe Abbildung 29). Dies erklärt die zuvor auffällige Diskrepanz zwischen Sangliferin A und Ciclosporin A und lässt auch die Cyclophilin D vermittelte Nekrose als Zelltodmechanismus von Fv1 ausscheiden.

Interessanterweise führte die Prästimulation mit Autophagieinhibitoren zu einer starken Steigerung des Fv1-vermittelten Zelltodes. Jedes der drei Autophagieinhibitoren führte zu einer statistisch signifikanten Steigerung des Zelltodes von 45 % auf ca. 80 % (siehe Abbildung 30). Offensichtlich spielt Autophagie als Überlebensmechanismus nach Stimulation mit Fv1 eine Rolle.

Colo 357 WT

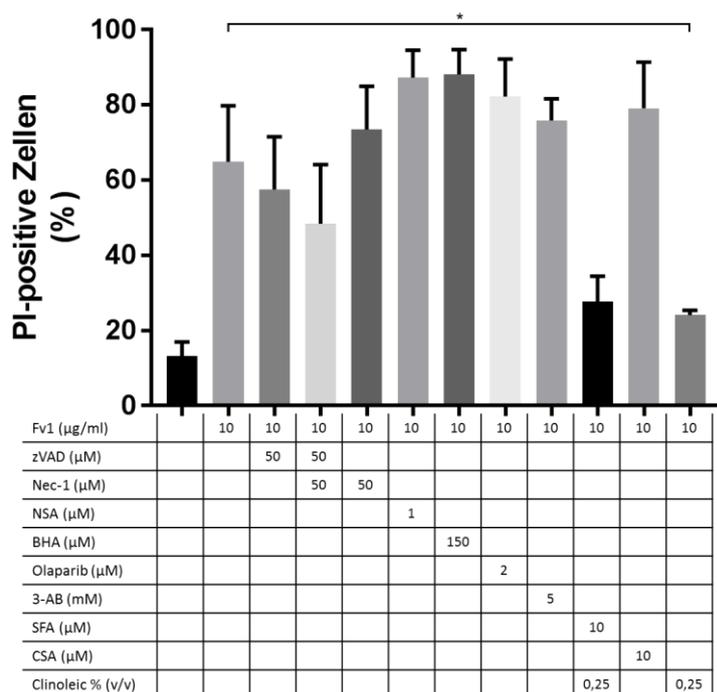


Abbildung 29: Untersuchungen zur Identifizierung des dem Fv1-vermittelten Zelltod zugrunde liegenden Mechanismus an Colo 357 WT-Zellen. Die Zellen verblieben unbehandelt oder wurden mit verschiedenen Zelltodinhhibitoren für zwei Stunden prästimuliert: Necrostatin1 (Nec-1, 50 µM), Necrosulfonamid (NSA, 1 µM), Butylhydroxyanisol (BHA, 150 µM), Olaparib (2 µM), 3-Aminobenzamid (3-AB, 5 mM), Sanglifehrin A (SFA, 10 µM), Ciclosporin A (CSA, 10 µM), Clinoleic (0,25% v/v). Es folgte die Prästimulation mit zVAD (50 µM) für eine Stunde und im Anschluss die Stimulation mit Fv1-Algenextrakt (10 µg/ml). Nach 24 Stunden wurden die Zelltodraten durch PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Werte verkörpern die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten (n=2) mit jeweils drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung. Mit Sternchen versehene Klammern zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA): *(p<0,05)

Colo 357 WT

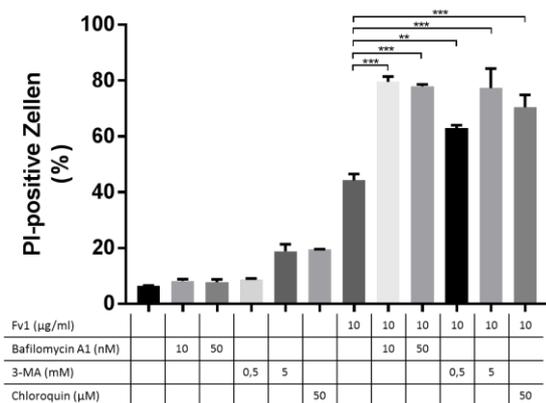


Abbildung 30: Untersuchungen zur Auswirkung von Autophagieinhibition auf den Fv1 vermittelten Zelltod an Colo 357 WT-Zellen. Die Zellen verblieben unbehandelt oder wurden mit den verschiedenen Autophagieinhibitoren für zwei Stunden prästimuliert: Bafilomycin A1 (10 nM, 50 nM), 3-MA (0,5 mM, 5 mM), Chloroquin (50 µM). Im Anschluss folgte die Stimulation mit Fv1-Algenextrakt (10 µg/ml). Nach 24 Stunden wurden die Zelltodraten durch PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Werte verkörpern die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten (n=2) mit jeweils drei Einzelmessungen, die Fehlerbalken die Standardabweichung. Mit Sternchen versehene Klammern zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA): ***(p<0,001), ***(p<0,001)

7 Diskussion

7.1 Induktion von Nekroptose durch TRAIL Rezeptor Agonisten

Die Tatsache, dass TRAIL in maligne entarteten Zellen in der Lage ist den extrinsischen Weg der Apoptose auszulösen, dabei jedoch gesunde Zellen nicht beeinträchtigt, macht TRAIL zu einem vielversprechenden Objekt der Krebsforschung (Hellwig und Rehm 2012). Ein Kriterium des optimalen Krebstherapeutikums, nämlich das Prinzip der targeted-therapy, scheint TRAIL bereits zu erfüllen. Probleme gibt es jedoch mit der Effektivität der Zelltodinduktion und mit der Resistenz vieler humaner Krebszelllinien. Mit APG 350 steht ein alternativer TRAIL-Rezeptor Agonist zur Verfügung, der in Bezug auf seine Effektivität im Rahmen dieser Arbeit mit der etablierten Substanz killerTRAIL verglichen wurde. In keiner der neun getesteten Zelllinien zeigte sich eine überlegene Effektivität von APG 350 in der Induktion von Nekroptose. Diese Beobachtung lässt zwei Rückschlüsse zu: Entweder ist APG 350 nicht effektiver als killerTRAIL oder die begrenzte Nekroptoseantwort ist nicht Ausdruck einer mangelnden Effektivität der TRAIL-Rezeptor Agonisten, sondern begründet durch intrinsische zelluläre Resistenzmechanismen. Für die letztere Hypothese spricht, dass die Ergebnisse im Vergleich zu killerTRAIL vereinzelt Steigerungen in der TRAIL-vermittelten Apoptose durch APG 350 insbesondere bei gleicher molarer Dosierung zeigen, was möglicherweise auf eine höhere Effektivität als TRAIL-Rezeptor Agonist hindeutet. Eine vollständige Nekroptose-Resistenz, wie etwa bei der Zelllinie PT-45-P1 beobachtet, konnte auch durch APG 350 nicht aufgehoben werden. Als wahrscheinliche Nekroptose-Resistenzmechanismen konnten von Voigt et al. bereits ein Mangel an RIP3, MLKL sowie eine erniedrigte ASMase-Aktivität festgestellt werden (Voigt et al. 2014).

Um die Effektivität der TRAIL-Rezeptor Agonisten abschließend vergleichen zu können, wären jedoch *in vivo* Experimente nötig. So konnten bei einem Vergleich von verschiedenen TRAIL-agonistischen Antikörpern mit APG 350 deutliche Unterschiede beim Ansprechen der Zellen zwischen *in vitro* und *in vivo* Experimenten beobachtet werden. Gieffers et al. machen für diesen Effekt das Vorliegen von Fc-Rezeptor tragenden Zellen *in vivo* verantwortlich, die durch Bindung der Antikörper das Clustering und somit die Signaltransduktion der TRAIL-Rezeptoren deutlich steigern können (Gieffers et al. 2013). Außerdem erhofft man sich für den Menschen eine gute Verträglichkeit von APG 350. Da es sich um ein Fusionsprodukt aus dem Fc-Teil von humanem IgG mit humanen TRAIL Ketten handelt, sind kaum Allergien zu erwarten. Außerdem erscheinen die pharmakokinetischen Eigenschaften mit einer Halbwertszeit von 28 Stunden (gemessen in Mäusen und Makakenaffen) günstig. Aufgrund der im Vergleich zu killerTRAIL längeren Halbwertszeit ist *in vivo* mit einer höheren Effektivität von APG 350 zu rechnen. In Verträglichkeitsstudien mit Mäusen und Makaken konnten keine unerwünschten Nebenwirkungen festgestellt werden (Gieffers et al. 2013).

Der Versuch, auf das schlecht verträgliche Cycloheximid zur Sensibilisierung der Tumorzellen für die Nekroptose bei der Verwendung von APG 350 zu verzichten, erbrachte keinen Erfolg. Auch das deutet darauf hin, dass APG 350 im Vergleich zu killerTRAIL zwar gleichwertig den TRAIL-Rezeptor aktiviert, jedoch keinen zusätzlichen positiven Effekt auf den intrazellulären Ablauf der Nekroptose-Signalkaskade aufweist. Nichts desto trotz scheint das Problem um Cycloheximid als toxischen aber bisher notwendigen Sensitizer gelöst. In zusätzlichen, in dieser Arbeit nicht dargestellten Experimenten konnte ich gemeinsam mit anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Prof. D. Adam zeigen, dass Homoharringtonin Tumorzellen effektiver als Cycloheximid für den Ablauf der Nekroptose sensibilisiert, dabei jedoch für den Menschen ein sehr gutes Verträglichkeitsprofil aufweist (Philipp et al. 2015).

Nach abschließender Betrachtung der Ergebnisse scheint APG 350 der etablierten Substanz killerTRAIL als TRAIL-Rezeptor Agonist mindestens ebenbürtig zu sein. Es ist aber davon auszugehen, dass sich bestehende Nekroptose-Resistenzen nicht durch die Entwicklung effektiverer TRAIL-Rezeptor Agonisten überwinden lassen, vielmehr muss man versuchen, die Resistenzen durch Beeinflussung intrazellulärer Signalwege aufzuheben.

7.2 pH-Wert Einflüsse auf die Nekroptose-Therapie

Fehlregulation in der pH-Wert Homöostase stellt für die Krebsforschung/-therapie aus folgenden Gründen einen entscheidenden Angriffspunkt dar: (1) pH-Wert Verschiebungen gelten als Kennzeichen maligner Transformation und treiben diese weiter voran, (2) die Wirkung von Chemotherapeutika ist pH-Wert-abhängig und (3) der Ablauf von programmierten Zelltodprogrammen wird durch pH-Wert Änderungen beeinflusst. Im Rahmen dieser Arbeit sollte vor allem der letzte Punkt näher beleuchtet werden.

Ursache der pH-Wert Verschiebung im Tumorgewebe ist eine gesteigerte Expression und Aktivität von membranständigen Transportsystemen von H^+ -Ionen, in erster Linie des Na^+/H^+ Antiporters NHE1 sowie der ATP-abhängigen Protonenpumpe V_{ATP}ase. Somit stellt die Hemmung dieser Systeme eine wichtige Therapieoption dar. In früheren Publikationen konnte gezeigt werden, dass sowohl Cariporid als Hemmstoff des NHE1 als auch V_{ATP}ase Hemmstoffe wie Omeprazol gleichermaßen in der Lage sind den pHi zu senken (Marino et al. 2010; Harguindey et al. 2013). Die in dieser Arbeit durchgeführte intrazelluläre pH-Wert-Messung der mit Cariporid behandelten Zellen scheint diese Ergebnisse zu bestätigen, auch wenn lediglich ein pH-Trend ohne quantitative Aussage nachgewiesen werden konnte. Für quantitative Analysen ist eine Wiederholung der Experimente mit Erstellung einer Standardreihe intrazellulärer pH-Werte nötig (Verwendung von Nigericin). Des Weiteren zeigten Experimente von Cho et al., dass die durch NHE1-Inhibition vermittelte pHi-Senkung zu einer gesteigerten Apoptose-Antwort nach TRAIL-Stimulation führt (Cho et al. 2005). Für die Zelllinien Colo

357 WT, Colo 357 Vektor Kontrolle, Colo 357 Bcl-xL Überexpression und BxPC-3 konnten diese Ergebnisse im Sinne einer leichten Steigerung der Apoptose-Rate um 10-20 % durch Prästimulation mit Cariporid bestätigt werden. Für die weiteren untersuchten Zelllinien Panc-Tu1 und PT-45-P1 konnte ein solcher Effekt nicht nachgewiesen werden. Es ist jedoch zu erwähnen, dass Cho et al. Amilorid statt Cariporid zur NHE1-Inhibition benutzten. Im Gegensatz zu Cariporid ist Amilorid kein selektiver NHE1 Inhibitor, sondern hemmt zusätzlich weitere Ionenkanäle, wie den epithelialen Natrium-Kanal (ENaC) oder den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter (NCX). NCX-Inhibition hat gesteigerte intrazelluläre Ca^{2+} Spiegel zur Folge, was wiederum auch zur Induktion von Zelltodprogrammen führen kann. Möglicherweise erklärt die zusätzliche NCX-Inhibition von Amilorid, weshalb sich die Ergebnisse im Hinblick auf die Steigerung der TRAIL-vermittelten Apoptose nur teilweise bestätigen ließen. Diese Hypothese lässt sich durch die Publikation von Hegde et al. stützen, in der gezeigt wurde, dass Amilorid per se einen zytotoxischen Effekt auf maligne Gliomzellen hat, der von der NHE1-Inhibition unabhängig ist. Vielmehr führt die NCX-Inhibition mit daraus resultierenden erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Spiegeln zum Zelltod (Hegde et al. 2004).

Im weiteren Ansatz wurde überprüft, ob durch Veränderungen der pH-Regulation eine Beeinflussung der TRAIL-vermittelten Nekroptose möglich ist. Sowohl die Prästimulation mit Cariporid als auch mit Omeprazol führte jedoch zu keiner Veränderung im Ansprechverhalten der getesteten Zelllinien (für Cariporid: BxPC-3, Colo 357 WT, Colo 357 Vektor Kontrolle, Colo 357 Bcl-xL, Panc-Tu1, PT-45-P1, für Omeprazol: A818-4, Colo 357 WT, PT-45-P1 und HT-29). Lediglich bei HT-29-Kolonkarzinomzellen zeigt sich eine signifikante Steigerung der Nekroptose um ca. 10 %. Die Tatsache, dass es sich außer bei HT-29-Zellen bei allen weiteren Zelllinien um Pankreaskarzinomzelllinien handelt, legt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Ansprechverhalten um einen Tumorentität spezifischen Effekt handeln könnte, möglicherweise auf Grund unterschiedlicher Expression der VATPase in beiden Gewebetypen. Die Frage, wie ein Absinken des pH_i den Signalweg der Nekroptose beeinflusst, lässt sich mit den vorliegenden Daten nicht beantworten. Zum einen, weil eine quantitative pH_i -Messung nicht möglich war, zum anderen, weil es Berichte darüber gibt, dass für den Abfall des cytosolischen pH-Wertes durch Inhibition von Protonentransportern ein gewisses Maß an Caspase-Aktivität notwendig ist (Milito et al. 2010). Durch die Zugabe von zVAD zur Stimulation von TRAIL-vermittelter Nekroptose ist eine Caspase-Aktivität jedoch auszuschließen. Somit ist eine wirksame Senkung des pH_i durch Cariporid oder Omeprazol unter gleichzeitiger Stimulation mit zVAD zu bezweifeln.

Dazu, in wie weit der extrazelluläre pH-Wert den Ablauf der Nekroptose beeinflusst, existieren bereits Untersuchungen. Jouan-Lanhouet et al. konnten u.a. an Hand von HT-29-Zellen zeigen, dass ein Abfall des pH_e zu einem Wechsel von Apoptose zu Nekroptose in Folge von TRAIL-Stimulation führt (Jouan-Lanhouet et al. 2012). Da im Tumorgewebe in der Regel ein saurer pH_e vorliegt, ist diese Entdeckung

von großer Bedeutung. Die Behandlung mit Cariporid oder Omeprazol könnte diese Ansäuerung des extrazellulären Raumes aufheben und somit die TRAIL-vermittelte Apoptose bevorzugen. Die Ergebnisse zeigen jedoch bei keiner untersuchten Zelllinie einen Abfall der TRAIL-vermittelten Nekroptose in Folge von Prästimulation mittels Cariporid oder Omeprazol. Allerdings wurden die Zellen in gepuffertem Medium gehalten, weshalb von keiner großen extrazellulären pH-Wert Verschiebung ausgegangen werden kann.

Die Arbeitsgruppe um Fukumoto et al. fand heraus, dass die Pharmakodynamik von Cariporid stark von dem pH-Wert des extrazellulären Raumes abhängig ist. So liegt der IC₅₀ Wert für pH=6,7 bei 120 nM während er für pH=6,2 bei 22 nM liegt (Fukumoto et al. 2002). Daher wurde in dieser Arbeit die Wirkung von Cariporid auch an Zellen getestet, die in saurem Medium bei pH=6,5 gehalten wurden. Es konnte jedoch kein Unterschied im Ansprechverhalten der Zellen im Vergleich zu normalem Medium festgestellt werden. In Anbetracht der Tatsache, dass in den Versuchen bereits eine Dosis von 100 µM verwendet wurde, was mehr als dem 800 fachen des IC₅₀-Wertes bei pH 6,7 entspricht, ist davon auszugehen, dass eine insuffiziente Inhibition von NHE1 nicht für die fehlenden Effekte verantwortlich ist.

Dass Protonenpumpen-Inhibitoren per se auch zytotoxische Effekte auf maligne Zellen haben, zeigte die Arbeitsgruppe von Milito et al. So konnte bei Mäusen, die mit Tumoren des malignen Melanoms versehen wurden, durch die Verwendung von Esomeprazol die Größenprogredienz des Tumors aufgehalten werden und die Überlebenszeit nahezu verdoppelt werden. Ursächlich machten sie hierfür einen Esomeprazol vermittelten Caspase-abhängigen Zelltod der Melanomzellen fest, welcher jedoch fast ausschließlich bei saurem pH_e abläuft (Milito et al. 2010). Später konnten die genauen Zelltodmechanismen von Marino et al. näher beleuchtet werden. So wurde gezeigt, dass es durch die Behandlung von Esomeprazol zur verstärkten Produktion von reactive oxygen species (ROS) kommt, was wiederum zur Caspase-Aktivierung führt. Des Weiteren kommt es durch Stimulation mit Esomeprazol zu verstärkter Autophagie, u.a. durch Inhibition des mTOR-Signalweges. Die Autophagie wurde in diesem Zusammenhang als Überlebensmechanismus gewertet, denn durch Herunterregulation von ATG5 konnte der Esomeprazol vermittelte Zelltod noch zusätzlich gesteigert werden (Marino et al. 2010). Diese Beobachtungen lassen sich gut mit den eigenen Ergebnissen mit Omeprazol an Pankreas- und Kolonkarzinomzellen in Einklang bringen. So weist die Stimulation mit Omeprazol in Dosierungen von 100 µM und 200 µM bei allen untersuchten Zelllinien einen dosisabhängigen toxischen Effekt auf. Die Wirkung scheint also nicht auf Melanomzellen begrenzt zu sein. Interessant wären in diesem Zusammenhang weiterführende Experimente zur Untersuchung, in wie fern sich die toxischen Wirkungen von Omeprazol bei saurem pH_e und unter Inhibition der Autophagie beispielsweise mit Chloroquin oder Bafilomycin steigern lassen.

7.3 Einflüsse von Autophagie-Modulatoren auf die TRAIL-vermittelte Nekroptose

Betrachtet man die Ergebnisse der Auswirkungen von Autophagieinhibitoren auf die TRAIL-vermittelte Nekroptose, lässt sich daraus keine überlebenssichernde Rolle der Autophagie ableiten. In keiner der getesteten Zelllinien führte die Kostimulation mit 3-MA, Chloroquin oder Bafilomycin A1 zu einer signifikant erhöhten Zelltodrate. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Versuche *in vitro* mit ausreichender Nährstoff- und Wachstumsfaktorversorgung stattfanden. Autophagie scheint hingegen besonders in Zeiten von nutritivem Stress als Überlebenssignalweg von Bedeutung zu sein (Degenhardt et al. 2006). Somit können Berichte, dass es durch Autophagie-Inhibition zu einem Abfall des zellulären Energielevels mit anschließender Nekroptose-Induktion kommt, durch die erfolgten *in vitro* Versuche nicht verifiziert werden. Die Nekroptose-Resistenz von PT-45-P1-Zellen konnte auch durch Autophagieinhibition nicht überwunden werden. Der Mangel an RIP3 scheint die Resistenz dieser Zelllinie weiterhin ausreichend zu erklären (Voigt et al. 2014).

Im Rahmen von Nekroptose-Stimulation durch mTOR-Inhibitoren beim Nierenzellkarzinom, konnte Autophagie als Überlebensweg bei RIP-abhängiger Nekroptose definiert werden (Bray et al. 2012). Im Vergleich zur TRAIL-vermittelten Nekroptose ist der Mechanismus der Zelltodinduktion jedoch ein anderer. Durch mTOR-Inhibition kommt es nämlich zur Hemmung der Glykolyse mit vermehrtem oxidativen Stoffwechsel. Dies in Kombination mit mTOR-Inhibition vermittelter Mitophagie führt zu vermehrter ROS-Bildung und Induktion von RIP-vermittelter Nekroptose. Durch Verwendung von Chloroquin lässt sich die Mitophagie und somit auch der Zelltod verhindern. Insofern stellt Autophagie in diesem Kontext, nicht aber für die TRAIL-vermittelte Nekroptose einen Resistenzmechanismus dar, was die Ergebnisse dieser Arbeit belegen.

Neben der Zellüberlebens-sichernden Rolle wird auch immer wieder eine Nekroptose begünstigende Komponente von Autophagie diskutiert. So gibt es Berichte, dass es an autophagosomalen Membranen zur Formation des Nekrosoms kommt. Obatoclax fördert in diesem Zusammenhang die Bildung von Autophagosomen sowie die Interaktion von ATG5 mit dem Nekrosom und induziert auf diese Weise effektiv Nekroptose (Basit et al. 2013). Auf die Frage, ob Obatoclax somit geeignet ist die Effektivität von TRAIL-vermittelter Nekroptose-Induktion zu erhöhen, liefern die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse keine eindeutige Antwort. Bei der Zelllinie A818-4 kommt es zu einer immensen Steigerung des Ansprechverhaltens um etwa 100%, bei der Zelllinie HT-29 bleibt diese Steigerung jedoch gänzlich aus. Interessant zu interpretieren sind die Ergebnisse für PT-45-P1-Zellen, bei denen Stimulation mit Obatoclax in einer Dosis von 100 nM die TRAIL-vermittelte Nekroptose signifikant steigerte, in höherer Dosierung von 200 nM jedoch nicht. Möglicherweise liegt die Erklärung darin, dass in niedriger Dosierung die Nekroptose-Induktion durch Obatoclax dominiert, während bei höherer Dosierung eine starke Autophagieinduktion das Zellüberleben sichert. Für das mangelhafte

Ansprechen von HT-29-Zellen gibt es keine eindeutige Erklärung. Die Tatsache, dass die Zelllinie HT-29 generell gut auf Stimulation zur TRAIL-vermittelten Nekroptose anspricht, macht einen Defekt im Nekrosom unwahrscheinlich. Basit et al. konnten zeigen, dass die autophagosomalen Proteine ATG5 und ATG7 für die Obatoclastax-vermittelte Nekroptose essenziell sind. Möglicherweise ist somit ein Mangel von ATG5 oder ATG7 oder anderer Strukturen der Autophagosomen für das mangelhafte Ansprechverhalten von HT-29-Zellen ursächlich. Ein Fehlen von ATG5 konnte im Western Blot jedoch erfolgreich ausgeschlossen werden.

Für eine Interaktion des Nekrosoms mit Autophagosomen sprechen auch weitere Publikationen. So konnte an Mausmodellen ebenfalls eine Rekrutierung des Nekrosoms an autophagosomalen Membranen festgestellt werden (Bonapace et al. 2010). Glukokortikoid-Resistenzen bei kindlicher ALL konnten im Sinne eines Nekroptoseintritts durch Autophagieinduktion mit Obatoclastax oder Rapamycin überwunden werden (Bonapace et al. 2010). Um zu klären, ob es sich bei der Interaktion mit dem Autophagosom um einen essenziellen oder lediglich fördernden Zusammenhang mit Nekroptose handelt, wurden Versuche mit ATG5 herunterregulierten Zellen durchgeführt. Trotz erfolgreicher Herunterregulation von ATG5 durch siRNA-Transfektion ergab sich keine Protektion vor TRAIL-vermittelter Nekroptose bei HT-29-Kolonkarzinomzellen. Dies lässt sich durch zwei verschiedene Annahmen erklären. Zum einen ist es möglich, dass die ATG5-Restaktivität nach siRNA-Transfektion für den erfolgreichen Ablauf der Nekroptose ausreichend ist. Diese Hypothese wird gestützt durch Beobachtungen an ATG5 Knockout Mausembryonalfibroblasten, die ich gemeinsam mit anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. D. Adam machte. Diese Zellen zeigten eine fast vollständige Protektion vor TRAIL-vermittelter Nekroptose (Sosna et al. 2016). Zum anderen ist es denkbar, dass die Interaktion mit dem Autophagosom dem nekrosomalen Signalweg zwar verstärkend vorgeschaltet, jedoch nicht essenziell für dessen Ablauf ist und somit von der ATG5-Herunterregulation keine Protektion vor TRAIL-vermittelter Nekroptose ausgeht.

Verfolgt man die Hypothese, dass sich Autophagie verstärkend auf die Nekroptose auswirkt, ist es denkbar, dass sich TRAIL-vermittelte Nekroptose durch den gezielten Einsatz von Autophagieinduktoren steigern lässt. Zur Autophagieinduktion stehen klassischerweise mTOR-Inhibitoren wie der Prototyp Rapamycin (Sirolimus) zur Verfügung. In den Versuchen konnte jedoch bei den getesteten HT-29-Zellen durch Prästimulation mit Rapamycin im nicht-toxischen Bereich nur eine leichte Steigerung der TRAIL-vermittelten Nekroptose verzeichnet werden. In Screening-Experimenten an A818-4- und PT-45-P1-Zellen blieb Rapamycin ohne Effekt auf die TRAIL-vermittelte Nekroptose. Der Resistenzmechanismus von PT-45-P1-Zellen wurde oben bereits erläutert und lässt sich auch durch Rapamycin nicht überwinden. Interessant ist, dass die Zelllinie A818-4 auf Stimulation mit Obatoclastax anspricht, auf Rapamycin hingegen nicht. Beide Substanzen induzieren die Bildung von

Autophagosomen, die Folgen der mTOR-Inhibition durch Rapamycin scheinen jedoch weitreichender zu sein. So wurde beschrieben, dass durch mTOR-Inhibition ein Abbau von RIP-Kinasen erfolgt, der Schlüsselenzyme des Nekroptosesignalweges (Bray et al. 2012). Auch wurde beschrieben, dass mTOR-Inhibition zwar zur gesteigerten ROS-Produktion mit Zelltodinduktion führt, dies jedoch durch die gleichzeitig gesteigerte Mitophagie wieder antagonisiert wird. Somit wird Autophagie als Resistenzmechanismus der mTOR-vermittelten Nekroptose betrachtet, die durch Einsatz von Chloroquin überwunden werden kann (Bray et al. 2012). Fasst man die Ergebnisse zusammen, gelangt man zu der Hypothese, dass in bestimmten Zelllinien durch isolierte Stimulation der Autophagosomenbildung die TRAIL-vermittelte Nekroptose gesteigert werden kann. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus der Behandlung von Apoptose-resistenten ALL-Zellen mit einer Kombination von Glukokortikoiden mit Obatoclax bzw. Rapamycin. In beiden Fällen konnten die ALL Zellen durch Obatoclax oder Rapamycin für den Eintritt in die Nekroptose sensibilisiert werden, in beiden Fällen war dies jedoch durch den Einsatz von 3-MA, also einem Inhibitor der Autophagosomenbildung antagonisierbar (Bonapace et al. 2010).

Es ist bekannt, dass exzessive Autophagie zum Zelltod führt und somit auch als eigenständige Form des regulierten Zelltodes betrachtet werden muss (Turcotte et al. 2008). Bei der offensichtlichen Verbindung der Signalwege von Autophagie und Nekroptose gilt es die TRAIL-vermittelte Nekroptose als eigenständigen Zelltod abzugrenzen. Auch dies ist mit den Ergebnissen aus den Versuchen mit Autophagie-Inhibitoren möglich. Sowohl die Inhibition der Autophagosomenbildung (3-MA) als auch die Inhibition nachgeschalteter Autophagiemechanismen (Chloroquin, Bafilomycin A1) konnten die Zelltodrate der mit TRAIL/zVAD/CHX stimulierten Zellen nicht supprimieren. Dies spricht für die TRAIL-vermittelte Nekroptose als eigenständigen regulierten Zelltod, der nicht auf Prinzipien der Autophagie angewiesen ist.

7.4 Einflüsse von PARP auf die TRAIL-vermittelte Nekroptose

Bisher wurde den PARP-Proteinen im Rahmen der Krebstherapie vor allem eine Relevanz für die Modulation intrinsischer Zelltodprogramme zugesprochen. In der Rolle von DNA-Reparatur-Enzymen, sind PARP-Proteine in der Lage DNA-Doppelstrangbrüche zu beheben. Alternativ stehen dazu nur Proteine der homologen Rekombination zur Verfügung, namentlich vor allem BRCA-Proteine. Familiäre Formen von Brust- oder Ovarialkarzinomen, aber auch Pankreaskarzinome zeichnen sich durch Mutationen mit Funktionsverlust der BRCA-Proteine und somit auch der autologen Rekombination aus. In diesen Tumorzellen sind PARP Proteine für die DNA-Reparatur und somit auch für das Überleben essentiell. Aus diesem Gedanken heraus erwuchs die Idee zur Verwendung von PARP-Inhibitoren in der Krebstherapie. Aktuell werden PARP-Inhibitoren wie Olaparib oder ABT-888 erfolgreich in klinischen Studien zur Behandlung BRCA-Mutation positiver Krebsformen eingesetzt (Lee

et al. 2014). Außerdem besteht die Vorstellung durch Inhibition der DNA-Reparatur Tumorzellen für genau solche Therapien zu sensitivieren, die auf der Schädigung von DNA beruhen, wie beispielsweise Strahlentherapie oder alkylierende Chemotherapeutika.

Neuere Untersuchungen sprechen jedoch für eine weitaus komplexere Funktion der PARP-Proteine, die über bloße DNA-Reparatur hinausgeht. So vermutet man, dass PARP-Proteine in der Lage sind die Aktivität anderer Enzyme durch Übertragung von poly-ADP-Ribose Ketten zu modulieren und durch Bindung an Promotoren die DNA-Expression zu beeinflussen. Daher existieren nun auch zahlreiche Untersuchungen in Bezug auf die Rolle von PARP auf die Signalwege der regulierten Zelltodprogramme. Die PARP-vermittelte Nekrose wird dabei sogar als eigene Form des regulierten Zelltodes definiert. Mit besonderer Relevanz für die Experimente dieser Arbeit sind die Erkenntnisse über die Rolle von PARP im Ablauf des TRAIL-vermittelten Zelltodes. In einer Veröffentlichung von S. Jouan-Lanhouet aus dem Jahr 2012 wurde PARP1 als entscheidendes Protein in der Signalkaskade der TRAIL-vermittelten Nekroptose definiert, welches entweder direkt oder indirekt durch den RIP1/RIP3-Komplex reguliert wird (Jouan-Lanhouet et al. 2012). Herunterregulation oder Inhibition von PARP1 bei HT-29-Kolonkarzinomzellen verhinderte dabei den Ablauf der Nekroptose und führte stattdessen zur Apoptose. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können diese Ergebnisse nicht bestätigen. Sowohl die Herunterregulation von PARP1 bei HT-29- und Colo 357 WT-Zellen, als auch die PARP-Inhibition mittels Olaparib und ABT-888 bei HT-29-, Colo 357 WT-, A818-4- und PT-45-P1-Zellen führte zu keiner Inhibition der TRAIL-vermittelten Nekroptose. Im Gegenteil, bei HT-29-Zellen führten ABT-888 und Olaparib zu einer statistisch signifikanten Steigerung der TRAIL-vermittelten Nekroptose. Die eigenen Ergebnisse sprechen daher gegen eine essentielle Rolle von PARP im Nekroptose-Signalweg unterhalb von RIP1/RIP3. Allerdings ist zu erwähnen, dass sich die Methode der Induktion von Nekroptose in dieser Arbeit zu der von S. Jouan-Lanhouet et al. unterscheidet. Hier erfolgte die Stimulation durch TRAIL, zVAD und CHX, bei S. Jouan-Lanhouet et al. erfolgte die Nekroptoseinduktion durch TRAIL und einen sauren extrazellulären pH-Wert von 6,5. Möglicherweise gibt es also keinen universellen Nekroptose-Signalweg, sondern es existieren Unterschiede, je nach Art der Induktion. Möglicherweise führt ein saurer extrazellulärer pH-Wert zu DNA-Schäden und somit zu starker PARP-Aktivierung. Das wiederum würde zu raschem Abfall des ATP-Spiegels führen und die TRAIL-vermittelte Nekroptose anstelle der TRAIL-vermittelten Apoptose begünstigen. Wird in diesem Szenario PARP herunterreguliert oder inhibiert, bleibt der Abfall des ATP-Spiegels aus und es kommt zur TRAIL-vermittelten Apoptose anstelle von Nekroptose. Dies würde eine Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse darstellen, zur endgültigen Klärung sind aber weitere Untersuchungen von Nöten, die zeigen, welche Auswirkungen ein saurer pH-Wert auf die Zelle hat und wie es in diesem Zusammenhang zur PARP-Aktivierung kommt.

Interessant bleibt die Tatsache, dass PARP-Inhibition sowohl mit ABT-888, als auch mit Olaparib zur Steigerung der TRAIL-vermittelten Nekroptose bei HT-29-Kolonkarzinomzellen führt, während sich bei den Pankreaskarzinomzellen Colo 357 WT, A818-4 und PT-45-P1 kein Effekt zeigt. Für die Zelllinie PT-45-P1 ist die Antwort einfach, PT-45-P1-Zellen exprimieren kein RIP3, sind daher nicht zur Nekroptose fähig, weshalb auch keine Steigerung der TRAIL-Rezeptor-vermittelten Nekroptose zu erwarten ist (Voigt et al. 2014). In diesem Zusammenhang sind neue Veröffentlichungen von Bedeutung, die zeigen, dass es durch PARP-Inhibition und -Herunterregulation zur Steigerung der TRAIL-vermittelten Apoptose kommt. Sowohl Yuan et al. als auch Meng et al. konnten dies 2013 bzw. 2014 unabhängig voneinander beweisen (Yuan et al. 2013; Meng et al. 2014). Unterschiedlich sind jedoch die Erklärungsansätze beider Arbeiten. Yuan et al. zeigten, dass es durch PARP-Aktivität zu einer Übertragung von poly-ADP-Ribose auf Caspase 8 kommt, was zum Funktionsverlust der Caspase und somit zu gehemmtem Ablauf der Apoptose führt. Dementsprechend ließe sich durch Verwendung von PARP-Inhibitoren oder durch Herunterregulation die TRAIL-Rezeptor-vermittelte Apoptose steigern. Dieses Phänomen ist jedoch nicht in der Lage zu erklären, weshalb es unter PARP-Inhibition auch zu gesteigerter Nekroptose kommt, denn durch die Verwendung von zVAD ist der gesamte intrazelluläre Signalweg als Caspase-unabhängig zu betrachten. Eine PARP-vermittelte Regulation der Caspase-8 Aktivität wäre somit irrelevant. Meng et al. gehen von einer anderen Erklärung aus. Sie konnten beweisen, dass PARP-Inhibition zu einer verstärkten Expression von TRAIL-Rezeptor 2 führt und auf diesem Wege eine Steigerung der TRAIL-vermittelten Apoptose bedingt. Sie zeigten, dass PARP die Bindung des Transkriptionsfaktors SP1 an den Promotor des TRAIL-Rezeptor 2 Gens stört (Meng et al. 2014). Herunterregulation von PARP1 oder 2 oder deren Inhibition führen demnach zu einer gesteigerten Expression des Rezeptors. Dieses Modell wäre auch in der Lage zu erklären, weshalb es bei HT-29-Zellen durch PARP-Inhibition zur Steigerung der Nekroptose kommt und bei den anderen drei Zelllinien nicht. In der Veröffentlichung von Voigt et al. von 2014 zeigt nämlich eine durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von TRAIL-Rezeptor (TRAIL-R) 1 und 2, für Colo 357- und A818-4-Zellen eine reichhaltige Oberflächenexpression sowohl von TRAIL-R1 als auch TRAIL-R2, während bei HT-29-Zellen fast ausschließlich TRAIL-R2 exprimiert wird (Voigt et al. 2014). Daher kann durch PARP-vermittelte verstärkte TRAIL-R2 Expression unter Umständen bei HT-29-Zellen eher eine Steigerung der Nekroptose erreicht werden als bei den übrigen Zelllinien, die von vornherein ein hohes Expressionsniveau für beide TRAIL-Rezeptoren aufweisen.

Die Transfektion mit siRNA für PARP1 führte zwar sowohl bei Colo 357 WT- als auch bei HT-29-Zellen zu einer deutlichen Herunterregulation der PARP1 Expression, allerdings kam es in Folge dessen nicht zu einer gesteigerten TRAIL-vermittelten Nekroptose wie bei der Verwendung von PARP-Inhibitoren oder Stimulation von PARP1 Knockout MEFs (Sosna et al. 2016). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist die PARP1 Restaktivität, die sich auch im Western Blot nachweisen lässt. Offenbar ist die

Wirkung der Herunterregulation nicht stark genug im Vergleich mit dem Einsatz von Inhibitoren in hohen Konzentrationen oder des kompletten Knockouts.

7.5 Tankyrase-Inhibition in der Krebstherapie

Betrachtet man die Ergebnisse der Tankyrase-Inhibition, so findet sich erneut ein Zelllinien-abhängiger Effekt. Nur bei HT-29-Zellen führte die Kostimulation mit Tankyrase-Inhibitoren zu einer Steigerung der TRAIL-vermittelten Nekroptose, nicht jedoch bei den getesteten Pankreaskarzinomzelllinien. Für dieses Phänomen gibt es verschiedene Erklärungen. Eine Erklärung ergibt sich aus dem Wnt-Signalweg inhibierenden Effekt der Tankyrase-Inhibitoren. Eine Überaktivität des Wnt-Signalweges stellt einen häufigen Pathomechanismus in Krebszellen dar. Typische Mutationen sind dabei ein Funktionsverlust des APC-Proteins sowie eine Überfunktion von β -Catenin. Für Kolonkarzinomzellen sind diese Mutationen geradezu klassisch, denn sie liegen bei ca. 95 % aller Kolonkarzinomzelllinien vor, so auch bei der Zelllinie HT-29 (Yang et al. 2006). Da Tankyrase-Inhibitoren den Wnt-Signalweg unterdrücken, ist es denkbar, dass sie besonders dann effektiv wirken, wenn sie bei Zellen mit Überfunktion dieses Signalweges eingesetzt werden, wie bei HT-29-Zellen der Fall. Gegen diese Hypothese sprechen jedoch Versuche, die zeigen, dass XAV-939 auch gegen Brustkrebszellen ohne APC- oder β -Catenin-Mutation einen Tumor supprimierenden Effekt aufweist (Bao et al. 2012). Ein weiteres Gegenargument bildet die Beobachtung, dass, im Gegensatz zu zahlreichen anderen Kolonkarzinomzelllinien mit APC-Mutation, bei HT-29-Zellen durch Einsatz des Tankyrase-Inhibitors G007-LK lediglich eine AXIN-Stabilisierung, nicht aber ein Abfall des β -Catenin-Spiegels erreicht werden konnte (Lau et al. 2013). Somit kann durch Tankyrase-Inhibition bei HT-29-Zellen möglicherweise keine Unterdrückung des Wnt-Signalweges erreicht werden. Dass dies bei anderen Zelllinien durch den Einsatz von XAV-939 möglich ist, wird jedoch als bewiesen angesehen (Huang et al. 2009). Weshalb sowohl XAV-939 als auch WIKI4 die TRAIL-vermittelte Nekroptose bei HT-29-Zellen fördert, bleibt weiterhin zu klären. Möglicherweise ist dies auf die Inhibition der Telomereelongation zurückzuführen. Diese Option erscheint jedoch unwahrscheinlich, da sich ein solcher Effekt wohl erst langfristig nach mehreren Zellzyklen bemerkbar machen dürfte, nicht aber nach lediglich 24 Stunden Stimulationsdauer. Ein Defekt beim Ablauf der Mitose könnte gegebenenfalls Zellstress bewirken, der den Ablauf von Nekroptose begünstigen könnte. Wahrscheinlicher erscheint jedoch die Möglichkeit, dass der beobachtete Effekt nicht auf Tankyrase-Inhibition allein, sondern auf genereller PARP-Inhibition beruht. In höheren Konzentrationen sind die verwendeten Inhibitoren nämlich keinesfalls Tankyrase-spezifisch. Um Effekte zu erzielen, musste bei XAV-939 eine Konzentration von mindestens 30 μ M eingesetzt werden, bei WIKI4 mindestens 5 μ M. Laut Literatur liegt der IC50 Wert von XAV-939 für PARP1 bei 5,5 μ M, von WIKI4 bei >10 μ M (Haikarainen et al. 2014). Bei den Ergebnissen von XAV-939 muss also eine starke PARP1-Inhibition berücksichtigt werden, bei den Ergebnissen mit WIKI4

zumindest eine leichte. Bei der Kostimulation mit Olaparib und ABT-888 fiel ebenfalls auf, dass eine Steigerung der TRAIL-vermittelten Nekroptose nur bei der Zelllinie HT-29 zu erreichen war. Es ist also denkbar, dass die beobachteten Effekte von XAV-939 und WIKI4 ebenfalls auf PARP1-Inhibition beruhen. Die Tatsache, dass die Verwendung der Tankyrase-Inhibitoren in niedrigeren Konzentrationen ohne Effekt bleibt, spricht somit gegen eine Verbindung von Tankyrase auf die TRAIL-vermittelte Nekroptose. Gleichzeitig bestätigen die Ergebnisse jedoch den Verdacht einer zelllinienabhängigen Beeinflussbarkeit der TRAIL-vermittelten Nekroptose durch Inhibition von PARP1.

7.6 Der Algenextrakt Fv1 in der Krebstherapie

Fv1 ist bei den getesteten Pankreaskarzinomzelllinien in der Lage, effektiv Zelltod zu induzieren. Bereits nach 24 Stunden Stimulation mit der Konzentration 10 µg/ml führt Fv1 zu Zelltodraten von 50-90 %. In zahlreichen in vitro Studien wurden bereits andere Braunalgenextrakte erfolgreich zur Behandlung von Malignomzellen eingesetzt. Dabei wurde in der Regel Apoptose als Zelltodmechanismus festgestellt. Als Art der Apoptose-Induktion wurden zahlreiche Mechanismen beschrieben wie beispielsweise eine direkte Caspase-Aktivierung oder die verminderte Expression antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 oder Bcl-xL. In diesen Studien ließ sich der Algenextrakt-vermittelte Zelltod durch Caspaseinaktivierung antagonisieren. Prästimulation von Zellen mit dem pan-Caspaseinhibitor zVAD-fmk in dieser Arbeit führte jedoch nur zu einer leichten Protektion vor der Stimulation von Fv1 im Sinne einer Zelltodreduktion um ca. 10 %. Dies spricht gegen eine Induktion von Apoptose durch Fv1. Dass zVAD die Zelltodrate zumindest leicht erniedrigt, ließe sich möglicherweise damit erklären, dass es in einigen Zellen im Rahmen von Fv1 vermitteltem Zellstress zu Caspase-Aktivierung kommt, die den Fv1-vermittelten Zelltod verstärkt. Interessant in diesem Zusammenhang ist eine Veröffentlichung von Zhang et al., in der gezeigt wird, wie ein Fucoidanhaltiger Braunalgenextrakt einen Caspase-unabhängigen Zelltod auslöst. Dabei kommt es zur Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien mit daraus resultierender DNA-Schädigung, die dann zum Zelltod führt (Zhang et al. 2011). Um zu überprüfen, ob Fv1 eine andere Form des regulierten Zelltodes induziert, wurden zahlreiche Versuche mit weiteren Inhibitoren unternommen. Inhibition von RIP1 und MLKL als Schlüsselproteine des Nekrosoms erbrachte ebenfalls keine Zelltodprotektion. Daher kann die Induktion von Nekroptose durch Fv1 ausgeschlossen werden, ebenso wie die PARP-vermittelte Nekrose, da die Prästimulation mit PARP-Inhibitoren ebenfalls ohne Effekt blieb. Eine Beteiligung des mitochondrialen Porenkomplexes am Ablauf des Zelltodes konnte nach Inhibition von Cyclophilin D ebenfalls ausgeschlossen werden. Die meisten Studien beschreiben eine antioxidative Wirkung von Algenextrakten, allerdings gibt es auch eine Studie, die einen Anstieg der intrazellulären ROS-Produktion durch einen Extrakt der Grünalge *Ulva fasciata* beschreibt (Ryu et al. 2013). Ein durch oxidativen Stress ausgelöster Zelltod durch Fv1 konnte jedoch durch Prästimulation mit dem ROS-

Inhibitor BHA ausgeschlossen werden. Interessanterweise erbrachte eine Lösungsmittelkontrolle das Ergebnis, dass die Wirkung von Fv1 durch das Fettgemisch „Clinoleic“ fast vollständig aufgehoben wurde. Eine Interpretation ist in diesem Zusammenhang schwierig, aber es ist denkbar, dass der Effekt von Clinoleic nicht auf der Beeinflussung zellulärer Signalwege beruht, sondern lediglich die Aufnahme von Fv1 in die Zelle stört. Da es sich bei Fv1 um einen Azeton-Extrakt handelt, ist davon auszugehen, dass die enthaltenen Wirkstoffe lipophil sind. Möglicherweise gehen diese mit den in Clinoleic enthaltenen Fetten eine Verbindung ein und werden somit von den Zellen nicht mehr aufgenommen.

Des Weiteren wurde eine Beteiligung von Autophagie an der Wirkung von Fv1 überprüft. Interessanterweise führte die Verwendung von jedem der drei getesteten Autophagieinhibitoren zu einer statistisch-signifikanten Steigerung des Fv1 vermittelten Zelltodes um bis zu 100 %. Autophagie scheint demnach eine überlebenssichernde Funktion für Zellen nach Stimulation mit Fv1 darzustellen. Es ist bekannt, dass Autophagie das Zellüberleben vor allem bei nutritivem Stress sichert. (Noda und Ohsumi 1998) Möglicherweise besteht also ein Hinweis, dass Fv1 den Energiestoffwechsel der Zelle beeinflusst und auf diesem Wege Zelltod einleitet. Passend zu dieser Hypothese ist eine Beobachtung, dass ein Fucoïdan-haltiger Algenextrakt zu ATP-Zerfall in Tumorzellen führt (Zhang et al. 2011). Sollte Fv1 *in vivo* zur Therapie maligner Tumoren getestet werden erscheint eine Kombination mit Autophagieinhibitoren sinnvoll.

Die Ergebnisse zeigen eine effektive Induktion von Zelltod an malignen Zellen durch Fv1, der zu Grunde liegende Mechanismus bleibt jedoch ungeklärt. Es konnten jedoch Einflüsse auf den Zellzyklus durch Fv1 festgestellt werden. Im Rahmen eines Projektes der Arbeitsgruppe um Holger Kalthoff, an dem ich auch beteiligt war, wurde ein Fv1 induzierter Zyklusarrest in der G2-Phase festgestellt. Ausgelöst ist dies durch verstärkte Expression von p57 (Geisen et al. 2015).

8 Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten konnte mit der Entwicklung klassischer zytotoxischer Chemotherapeutika kein neuer Durchbruch mehr erlangt werden, was auf die Selektion Apoptose-resistenter Tumorzellen zurückzuführen ist. Diese Tatsache verdeutlicht die Wichtigkeit, neben der Apoptose alternative regulierte Zelltodprogramme besser zu verstehen, um sie für Therapie nutzen zu können. Es war bekannt, dass mit der TRAIL-vermittelten Nekroptose ein vielversprechendes Konzept zur Verfügung steht, das auf ein solches alternatives reguliertes Zelltodprogramm zurückgreift und mit TRAIL eine natürliche Substanz benutzt, die gezielt auf Krebszellen wirkt, ohne gesunde Zellen zu schädigen. Auf der Optimierung dieses Konzeptes *in vitro* lag das Hauptaugenmerk dieser Arbeit.

Mit APG 350 wurde eine neue Generation von TRAIL-Rezeptor-Agonisten untersucht und bestätigt, dass diese mit der Effektivität von etablierten Substanzen wie killerTRAIL *in vitro* vergleichbar ist. Aufgrund der guten Erfahrungen, welche den Nutzen und die Verträglichkeit von Antikörper-basierten Therapien in der Onkologie betreffen, kann man aufgrund der Ergebnisse einem Einsatz von APG 350 als TRAIL-Rezeptor-Agonist *in vivo* optimistisch entgegen blicken.

Es war zudem bekannt, dass der Ablauf von regulierten Zelltodprogrammen, wie alle enzymatischen Reaktion im Körper, von äußeren Faktoren wie dem pH-Wert abhängt. Durch gezielte Beeinflussung des intrazellulären pH-Wertes durch die Substanzen Cariporid und Omeprazol wurde in dieser Arbeit versucht den Ablauf der TRAIL-vermittelten Nekroptose zu fördern. Dies gelang zelllinienabhängig nur mit dem Wirkstoff Omeprazol. Durch Cariporid konnte lediglich zelllinienabhängig die TRAIL-vermittelte Apoptose gesteigert werden.

Wie jeder andere intrazelluläre Signalweg so darf auch die TRAIL-vermittelte Nekroptose niemals isoliert betrachtet werden. Die Verflechtung mit anderen Signalwegen ist komplex. Bei gesunden Zellen halten sich verschiedene Signale zum Zellüberleben mit Signalen des Zelltodes die Waage. Im Fall von Krebserkrankungen sind diese Signale drastisch zu Gunsten des Zellüberlebens verschoben. Die Induktion von TRAIL-vermittelter Nekroptose ist ein Versuch dieses Ungleichgewicht zu beheben. Effektiver ist aber mit Sicherheit eine Kombination mit weiteren Zelltod-fördernden Signalwegen oder die gleichzeitige Inhibition von überlebensfördernden Signalwegen. Dieses Konzept lässt sich durch die Ergebnisse dieser Arbeit absolut bestätigen, denn mit jeder Kombination zur TRAIL-vermittelten Nekroptose konnten zelllinienabhängig Verbesserungen erzielt werden. Durch Induktion von Autophagie konnte zelllinienabhängig die TRAIL-vermittelte Nekroptose teilweise verdoppelt werden, vor allem nach Stimulation mit Obatoclox, weniger ausgeprägt nach Stimulation mit Rapamycin. Die Inhibition von PARP1 durch ABT-888 und Olaparib vermochte zelllinienabhängig die TRAIL-vermittelte

Nekroptose zu steigern ebenso wie die Hemmung des Wnt-Signalweges durch die Tankyrase-Inhibitoren XAV-939 und WIKI4.

Die Tatsache, dass alle in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen stark von Zelllinie zu Zelllinie variierten, unterstreicht die These, dass der Begriff „Krebs“ keine gut abgrenzbare Erkrankung darstellt, sondern lediglich als Oberbegriff für eine heterogene Gruppe von Erkrankungen gelten darf, die auf unterschiedlichen pathophysiologischen Mechanismen beruhen. In der Krebstherapie der Zukunft wird es möglich sein, jede maligne Neoplasie auf seine ursächliche Pathophysiologie hin zu analysieren und darauf beruhend eine Therapie zusammenzustellen.

Neben den Untersuchungen zur TRAIL-vermittelten Nekroptose sollte in dieser Arbeit auch eine weitere Form des regulierten Zelltodes charakterisiert werden, nämlich der durch den Algenwirkstoff Fv1 vermittelte Zelltod. Trotz Anwendung zahlreicher spezifischer Zelltodinhibitoren gelang es nicht eine Antwort auf diese Frage zu finden. Möglicherweise aktiviert Fv1 ein bisher gänzlich unbekanntes Zelltodprogramm. Als Ergebnis dieser Arbeit konnte jedoch die Autophagie als Antagonismus des Fv1 vermittelten Zelltodes definiert werden. Die Kombination mit Autophagieinhibitoren wie Bafilomycin A1, 3-MA und Chloroquin erscheint daher für mögliche therapeutische Zwecke von Fv1 sinnvoll.

9 Literaturverzeichnis

- Ale, Marcel Tutor; Maruyama, Hiroko; Tamauchi, Hidekazu; Mikkelsen, Jorn D.; Meyer, Anne S. (2011): Fucoïdan from *Sargassum* sp. and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells in vitro and activates natural killer cells in mice in vivo. In: *International journal of biological macromolecules* 49 (3), S. 331–336. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2011.05.009.
- Amaravadi, Ravi K.; Lippincott-Schwartz, Jennifer; Yin, Xiao-Ming; Weiss, William A.; Takebe, Naoko; Timmer, William et al. (2011): Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17 (4), S. 654–666. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2634.
- Amaravadi, Ravi K.; Yu, Duonan; Lum, Julian J.; Bui, Thi; Christophorou, Maria A.; Evan, Gerard I. et al. (2007): Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. In: *The Journal of Clinical Investigation* 117 (2), S. 326–336. DOI: 10.1172/JCI28833.
- Aravindan, Sheeja; Delma, Caroline R.; Thirugnanasambandan, Somasundaram S.; Herman, Terence S.; Aravindan, Natarajan (2013): Anti-pancreatic cancer deliverables from sea: first-hand evidence on the efficacy, molecular targets and mode of action for multifarious polyphenols from five different brown-algae. In: *PLoS one* 8 (4), e61977. DOI: 10.1371/journal.pone.0061977.
- Artus, Cedric; Boujrad, Hanan; Bouharrou, Aida; Brunelle, Marie-Noelle; Hoos, Sylviane; Yuste, Victor J. et al. (2010): AIF promotes chromatinolysis and caspase-independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX. In: *The EMBO journal* 29 (9), S. 1585–1599. DOI: 10.1038/emboj.2010.43.
- Ashkenazi, A.; Pai, R. C.; Fong, S.; Leung, S.; Lawrence, D. A.; Marsters, S. A. et al. (1999): Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. In: *The Journal of Clinical Investigation* 104 (2), S. 155–162. DOI: 10.1172/JCI6926.
- Bao, Renyue; Christova, Tania; Song, Siyuan; Angers, Stephane; Yan, Xiaojun; Attisano, Liliana (2012): Inhibition of tankyrases induces Axin stabilization and blocks Wnt signalling in breast cancer cells. In: *PLoS one* 7 (11), e48670. DOI: 10.1371/journal.pone.0048670.
- Basit, F.; Cristofanon, S.; Fulda, S. (2013): Obatoclast (GX15-070) triggers necroptosis by promoting the assembly of the necrosome on autophagosomal membranes. In: *Cell death and differentiation* 20 (9), S. 1161–1173. DOI: 10.1038/cdd.2013.45.
- Bonapace, Laura; Bornhauser, Beat C.; Schmitz, Maike; Cario, Gunnar; Ziegler, Urs; Niggli, Felix K. et al. (2010): Induction of autophagy-dependent necroptosis is required for childhood acute lymphoblastic leukemia cells to overcome glucocorticoid resistance. In: *The Journal of Clinical Investigation* 120 (4), S. 1310–1323. DOI: 10.1172/JCI39987.
- Bray, Kevin; Mathew, Robin; Lau, Alexandria; Kamphorst, Jurre J.; Fan, Jing; Chen, Jim et al. (2012): Autophagy suppresses RIP kinase-dependent necrosis enabling survival to mTOR inhibition. In: *PLoS one* 7 (7), e41831. DOI: 10.1371/journal.pone.0041831.
- Buchsbaum, Donald J.; Zhou, Tong; Lobuglio, Albert F. (2006): TRAIL receptor-targeted therapy. In: *Future oncology (London, England)* 2 (4), S. 493–508. DOI: 10.2217/14796694.2.4.493.
- Callus, B. A.; Vaux, D. L. (2007): Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical. In: *Cell death and differentiation* 14 (1), S. 73–78. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402034.

- Cardone, Rosa A.; Casavola, Valeria; Reshkin, Stephan J. (2005): The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. In: *Nature reviews. Cancer* 5 (10), S. 786–795. DOI: 10.1038/nrc1713.
- Carew, Jennifer S.; Nawrocki, Steffan T.; Kahue, Charissa N.; Zhang, Hui; Yang, Chunying; Chung, Linda et al. (2007): Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl-mediated drug resistance. In: *Blood* 110 (1), S. 313–322. DOI: 10.1182/blood-2006-10-050260.
- Chang, Paul; Coughlin, Margaret; Mitchison, Timothy J. (2009): Interaction between Poly(ADP-ribose) and NuMA contributes to mitotic spindle pole assembly. In: *Molecular biology of the cell* 20 (21), S. 4575–4585. DOI: 10.1091/mbc.E09-06-0477.
- Cho, Dong-Hyung; Jo, Yoon Kyung; Hwang, Jung Jin; Lee, Yoo Mee; Roh, Seon Ae; Kim, Jin Cheon (2009): Caspase-mediated cleavage of ATG6/Beclin-1 links apoptosis to autophagy in HeLa cells. In: *Cancer letters* 274 (1), S. 95–100. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.09.004.
- Cho, Young-Lai; Lee, Kwang-Soon; Lee, Seon-Jin; Namkoong, Seung; Kim, Young-Mi; Lee, Hansoo et al. (2005): Amiloride potentiates TRAIL-induced tumor cell apoptosis by intracellular acidification-dependent Akt inactivation. In: *Biochemical and biophysical research communications* 326 (4), S. 752–758. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.11.109.
- Danhier, Pierre; Bański, Piotr; Payen, Valéry L.; Grasso, Debora; Ippolito, Luigi; Sonveaux, Pierre; Porporato, Paolo E. (2017): Cancer metabolism in space and time: Beyond the Warburg effect. In: *Biochimica et biophysica acta*. DOI: 10.1016/j.bbabi.2017.02.001.
- Degenhardt, Kurt; Mathew, Robin; Beaudoin, Brian; Bray, Kevin; Anderson, Diana; Chen, Guanghua et al. (2006): Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. In: *Cancer cell* 10 (1), S. 51–64. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.06.001.
- Degterev, Alexei; Yuan, Junying (2008): Expansion and evolution of cell death programmes. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (5), S. 378–390. DOI: 10.1038/nrm2393.
- Dynek, Jasmin N.; Smith, Susan (2004): Resolution of sister telomere association is required for progression through mitosis. In: *Science (New York, N.Y.)* 304 (5667), S. 97–100. DOI: 10.1126/science.1094754.
- Espert, Lucile; Denizot, Melanie; Grimaldi, Marina; Robert-Hebmann, Veronique; Gay, Bernard; Varbanov, Mihayl et al. (2006): Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. In: *The Journal of Clinical Investigation* 116 (8), S. 2161–2172. DOI: 10.1172/JCI26185.
- Fatokun, Amos A.; Dawson, Valina L.; Dawson, Ted M. (2014): Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. In: *British journal of pharmacology* 171 (8), S. 2000–2016. DOI: 10.1111/bph.12416.
- Fukumoto, Shoji; Imamiya, Eiko; Kusumoto, Keiji; Fujiwara, Shuji; Watanabe, Toshifumi; Shiraishi, Mitsuru (2002): Novel, non-acylguanidine-type Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger inhibitors: synthesis and pharmacology of 5-tetrahydroquinolinylidene aminoguanidine derivatives. In: *Journal of medicinal chemistry* 45 (14), S. 3009–3021.
- Fulda, Simone; Galluzzi, Lorenzo; Kroemer, Guido (2010): Targeting mitochondria for cancer therapy. In: *Nature reviews. Drug discovery* 9 (6), S. 447–464. DOI: 10.1038/nrd3137.

- Galluzzi, Lorenzo; Kepp, Oliver; Chan, Francis Ka-Ming; Kroemer, Guido (2017): Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease. In: *Annual review of pathology* 12, S. 103–130. DOI: 10.1146/annurev-pathol-052016-100247.
- Galluzzi, Lorenzo; Kepp, Oliver; Krautwald, Stefan; Kroemer, Guido; Linkermann, Andreas (2014): Molecular mechanisms of regulated necrosis. In: *Seminars in cell & developmental biology* 35, S. 24–32. DOI: 10.1016/j.semcdb.2014.02.006.
- Geisen, Ulf; Zenthoefer, Marion; Peipp, Matthias; Kerber, Jannik; Plenge, Johannes; Manago, Antonella et al. (2015): Molecular Mechanisms by Which a *Fucus vesiculosus* Extract Mediates Cell Cycle Inhibition and Cell Death in Pancreatic Cancer Cells. In: *Marine drugs* 13 (7), S. 4470–4491. DOI: 10.3390/md13074470.
- Gieffers, Christian; Kluge, Michael; Merz, Christian; Sykora, Jaromir; Thiemann, Meinolf; Schaal, Rene et al. (2013): APG350 induces superior clustering of TRAIL receptors and shows therapeutic antitumor efficacy independent of cross-linking via Fcγ receptors. In: *Molecular cancer therapeutics* 12 (12), S. 2735–2747. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0323.
- Goncharenko-Khaider, Nadzeya; Lane, Denis; Matte, Isabelle; Rancourt, Claudine; Piche, Alain (2013): Biological Significance of Apoptosis in Ovarian Cancer: TRAIL Therapeutic Targeting. In: Ivan Diaz-Padilla (Hg.): *Ovarian Cancer - A Clinical and Translational Update*: InTech.
- Grootjans, Sasker; Vanden Berghe, Tom; Vandenabeele, Peter (2017): Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. In: *Cell death and differentiation*. DOI: 10.1038/cdd.2017.65.
- Haikarainen, Teemu; Krauss, Stefan; Lehtio, Lari (2014): Tankyrases: structure, function and therapeutic implications in cancer. In: *Current pharmaceutical design* 20 (41), S. 6472–6488.
- Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. In: *Cell* 144 (5), S. 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Haneji, Kaori; Matsuda, Takehiro; Tomita, Mariko; Kawakami, Hirochika; Ohshiro, Kazuiku; Uchihara, Jun-Nosuke et al. (2005): Fucoïdan extracted from *Cladosiphon okamuranus* Tokida induces apoptosis of human T-cell leukemia virus type 1-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. In: *Nutrition and cancer* 52 (2), S. 189–201. DOI: 10.1207/s15327914nc5202_9.
- Hare, Stephen H.; Harvey, Amanda J. (2017): mTOR function and therapeutic targeting in breast cancer. In: *American Journal of Cancer Research* 7 (3), S. 383–404.
- Harguindeguy, Salvador; Arranz, Jose Luis; Polo Orozco, Julian David; Rauch, Cyril; Fais, Stefano; Cardone, Rosa Angela; Reshkin, Stephan J. (2013): Cariporide and other new and powerful NHE1 inhibitors as potentially selective anticancer drugs--an integral molecular/biochemical/metabolic/clinical approach after one hundred years of cancer research. In: *Journal of translational medicine* 11, S. 282. DOI: 10.1186/1479-5876-11-282.
- Hegde, Manu; Roscoe, Jane; Cala, Peter; Gorin, Fredric (2004): Amiloride kills malignant glioma cells independent of its inhibition of the sodium-hydrogen exchanger. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 310 (1), S. 67–74. DOI: 10.1124/jpet.103.065029.
- Hellwig, Christian T.; Rehm, Markus (2012): TRAIL signaling and synergy mechanisms used in TRAIL-based combination therapies. In: *Molecular cancer therapeutics* 11 (1), S. 3–13. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0434.
- Herzog, Christian; Yang, Cheng; Holmes, Alexandra; Kaushal, Gur P. (2012): zVAD-fmk prevents cisplatin-induced cleavage of autophagy proteins but impairs autophagic flux and worsens renal

function. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 303 (8), F1239-50. DOI: 10.1152/ajprenal.00659.2011.

Hou, Wen; Han, Jie; Lu, Caisheng; Goldstein, Leslie A.; Rabinowich, Hannah (2010): Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. In: *Autophagy* 6 (7), S. 891–900. DOI: 10.4161/auto.6.7.13038.

Huang, Shih-Min A.; Mishina, Yuji M.; Liu, Shanming; Cheung, Atwood; Stegmeier, Frank; Michaud, Gregory A. et al. (2009): Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. In: *Nature* 461 (7264), S. 614–620. DOI: 10.1038/nature08356.

Jouan-Lanhouet, S.; Arshad, M. I.; Piquet-Pellorce, C.; Martin-Chouly, C.; Le Moigne-Muller, G.; van Herreweghe, F. et al. (2012): TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. In: *Cell death and differentiation* 19 (12), S. 2003–2014. DOI: 10.1038/cdd.2012.90;

Jung, Chang Hwa; Jun, Chang Bong; Ro, Seung-Hyun; Kim, Young-Mi; Otto, Neil Michael; Cao, Jing et al. (2009): ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. In: *Molecular biology of the cell* 20 (7), S. 1992–2003. DOI: 10.1091/mbc.E08-12-1249.

Kaczmarek, Agnieszka; Vandenabeele, Peter; Krysko, Dmitri V. (2013): Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. In: *Immunity* 38 (2), S. 209–223. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.02.003.

Kaminskas, E. (1978): The pH-dependence of sugar-transport and glycolysis in cultured Ehrlich ascites-tumour cells. In: *The Biochemical journal* 174 (2), S. 453–459.

Karantza-Wadsworth, Vassiliki; Patel, Shyam; Kravchuk, Olga; Chen, Guanghua; Mathew, Robin; Jin, Shengkan; White, Eileen (2007): Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. In: *Genes & development* 21 (13), S. 1621–1635. DOI: 10.1101/gad.1565707.

Kato, Yasumasa; Lambert, Charles A.; Colige, Alain C.; Mineur, Pierre; Noel, Agnes; Frankenne, Francis et al. (2005): Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. In: *The Journal of Biological Chemistry* 280 (12), S. 10938–10944. DOI: 10.1074/jbc.M411313200.

Kumar, Dhruv; Shankar, Sharmila; Srivastava, Rakesh K. (2013): Rottlerin-induced autophagy leads to the apoptosis in breast cancer stem cells: molecular mechanisms. In: *Molecular cancer* 12 (1), S. 171. DOI: 10.1186/1476-4598-12-171.

Lau, Ted; Chan, Emily; Callow, Marinella; Waaler, Jo; Boggs, Jason; Blake, Robert A. et al. (2013): A novel tankyrase small-molecule inhibitor suppresses APC mutation-driven colorectal tumor growth. In: *Cancer research* 73 (10), S. 3132–3144. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4562.

Lee, J-M; Ledermann, J. A.; Kohn, E. C. (2014): PARP Inhibitors for BRCA1/2 mutation-associated and BRCA-like malignancies. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 25 (1), S. 32–40. DOI: 10.1093/annonc/mdt384.

Loeffler, D. A.; Juneau, P. L.; Heppner, G. H. (1991): Natural killer-cell activity under conditions reflective of tumor micro-environment. In: *International journal of cancer* 48 (6), S. 895–899.

Maclean, Kirsteen H.; Dorsey, Frank C.; Cleveland, John L.; Kastan, Michael B. (2008): Targeting lysosomal degradation induces p53-dependent cell death and prevents cancer in mouse models of lymphomagenesis. In: *The Journal of Clinical Investigation* 118 (1), S. 79–88. DOI: 10.1172/JCI33700.

Maiuri, Maria Chiara; Criollo, Alfredo; Tasdemir, Ezgi; Vicencio, José Miguel; Tajeddine, Nicolas; Hickman, John A. et al. (2014): BH3-Only Proteins and BH3 Mimetics Induce Autophagy by

Competitively Disrupting the Interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X L. In: *Autophagy* 3 (4), S. 374–376. DOI: 10.4161/auto.4237.

Marino, M. L.; Fais, S.; Djavaheri-Mergny, M.; Villa, A.; Meschini, S.; Lozupone, F. et al. (2010): Proton pump inhibition induces autophagy as a survival mechanism following oxidative stress in human melanoma cells. In: *Cell death & disease* 1, e87. DOI: 10.1038/cddis.2010.67.

McCarty, Mark F.; Whitaker, Julian (2010): Manipulating tumor acidification as a cancer treatment strategy. In: *Alternative Medicine Review : a Journal of Clinical Therapeutic* 15 (3), S. 264–272.

Meng, X. Wei; Koh, Brian D.; Zhang, Jin-San; Flatten, Karen S.; Schneider, Paula A.; Billadeau, Daniel D. et al. (2014): Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors sensitize cancer cells to death receptor-mediated apoptosis by enhancing death receptor expression. In: *The Journal of Biological Chemistry* 289 (30), S. 20543–20558. DOI: 10.1074/jbc.M114.549220.

Meurette, Olivier; Rebillard, Amelie; Huc, Laurence; Le Moigne, Gwenaelle; Merino, Delphine; Micheau, Olivier et al. (2007): TRAIL induces receptor-interacting protein 1-dependent and caspase-dependent necrosis-like cell death under acidic extracellular conditions. In: *Cancer research* 67 (1), S. 218–226. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1610.

Micheau, Olivier; Tschopp, Jurg (2003): Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. In: *Cell* 114 (2), S. 181–190.

Milito, Angelo de; Canese, Rossella; Marino, Maria Lucia; Borghi, Martina; Iero, Manuela; Villa, Antonello et al. (2010): pH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by inhibition of tumor acidity. In: *International journal of cancer* 127 (1), S. 207–219. DOI: 10.1002/ijc.25009.

Moussavou, Ghislain; Kwak, Dong Hoon; Obiang-Obonou, Brice Wilfried; Maranguy, Cyr Abel Ogandaga; Dinzouna-Boutamba, Sylvatrie-Danne; Lee, Dae Hoon et al. (2014): Anticancer effects of different seaweeds on human colon and breast cancers. In: *Marine drugs* 12 (9), S. 4898–4911. DOI: 10.3390/md12094898.

Nagata, Shigekazu; Tanaka, Masato (2017): Programmed cell death and the immune system. In: *Nature reviews. Immunology* 17 (5), S. 333–340. DOI: 10.1038/nri.2016.153.

Nicotera, P.; Leist, M.; Ferrando-May, E. (1998): Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. In: *Toxicology letters* 102-103, S. 139–142.

Nixon, Ralph A. (2013): The role of autophagy in neurodegenerative disease. In: *Nature medicine* 19 (8), S. 983–997. DOI: 10.1038/nm.3232.

Noda, T.; Ohsumi, Y. (1998): Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. In: *The Journal of Biological Chemistry* 273 (7), S. 3963–3966.

Oberst, A. (2013): Autophagic cell death RIPs into tumors. In: *Cell death and differentiation* 20 (9), S. 1131–1132. DOI: 10.1038/cdd.2013.89.

Oberstein, Adam; Jeffrey, Philip D.; Shi, Yigong (2007): Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. In: *The Journal of Biological Chemistry* 282 (17), S. 13123–13132. DOI: 10.1074/jbc.M700492200.

Oppenheim, R. W.; Flavell, R. A.; Vinsant, S.; Pevette, D.; Kuan, C. Y.; Rakic, P. (2001): Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21 (13), S. 4752–4760.

- Orrenius, Sten; Nicotera, Pierluigi; Zhivotovsky, Boris (2011): Cell death mechanisms and their implications in toxicology. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 119 (1), S. 3–19. DOI: 10.1093/toxsci/kfq268.
- Ostrom, Rennolds S. (2014): A two-pronged weapon in the fight against fibrosis. Focus on "Inhibition of Wnt/beta-catenin signaling promotes epithelial differentiation of mesenchymal stem cells and repairs bleomycin-induced lung injury". In: *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 307 (3), C232-3. DOI: 10.1152/ajpcell.00163.2014.
- Park, Jae Myung; Tougeron, David; Huang, Shengbing; Okamoto, Koichi; Sinicrope, Frank A. (2014): Beclin 1 and UVRAG confer protection from radiation-induced DNA damage and maintain centrosome stability in colorectal cancer cells. In: *PloS one* 9 (6), e100819. DOI: 10.1371/journal.pone.0100819.
- Pattingre, Sophie; Tassa, Amina; Qu, Xueping; Garuti, Rita; Liang, Xiao Huan; Mizushima, Noboru et al. (2005): Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. In: *Cell* 122 (6), S. 927–939. DOI: 10.1016/j.cell.2005.07.002.
- Philipp, Stephan; Sosna, Justyna; Adam, Dieter (2016): Cancer and necroptosis: friend or foe? In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73 (11-12), S. 2183–2193. DOI: 10.1007/s00018-016-2193-2.
- Philipp, Stephan; Sosna, Justyna; Plenge, Johannes; Kalthoff, Holger; Adam, Dieter (2015): Homoharringtonine, a clinically approved anti-leukemia drug, sensitizes tumor cells for TRAIL-induced necroptosis. In: *Cell communication and signaling : CCS* 13, S. 25. DOI: 10.1186/s12964-015-0103-0.
- Pilon-Thomas, Shari; Kodumudi, Krithika N.; El-Kenawi, Asmaa E.; Russell, Shonagh; Weber, Amy M.; Luddy, Kimberly et al. (2016): Neutralization of Tumor Acidity Improves Antitumor Responses to Immunotherapy. In: *Cancer research* 76 (6), S. 1381–1390. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1743.
- Pitti, R. M.; Marsters, S. A.; Ruppert, S.; Donahue, C. J.; Moore, A.; Ashkenazi, A. (1996): Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. In: *The Journal of Biological Chemistry* 271 (22), S. 12687–12690.
- Reshkin, Stephan Joel; Greco, Maria Raffaella; Cardone, Rosa Angela (2014): Role of pHi, and proton transporters in oncogene-driven neoplastic transformation. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 369 (1638), S. 20130100. DOI: 10.1098/rstb.2013.0100.
- Riffell, Jenna L.; Lord, Christopher J.; Ashworth, Alan (2012): Tankyrase-targeted therapeutics: expanding opportunities in the PARP family. In: *Nature reviews. Drug discovery* 11 (12), S. 923–936. DOI: 10.1038/nrd3868.
- Rikiishi, Hidemi (2012): Novel Insights into the Interplay between Apoptosis and Autophagy. In: *International journal of cell biology* 2012, S. 317645. DOI: 10.1155/2012/317645.
- Rosenfeldt, Mathias T.; Ryan, Kevin M. (2009): The role of autophagy in tumour development and cancer therapy. In: *Expert reviews in molecular medicine* 11, e36. DOI: 10.1017/S1462399409001306.
- Ryu, Min Ju; Kim, Areum Daseul; Kang, Kyoung Ah; Chung, Ha Sook; Kim, Hye Sun; Suh, In Soo et al. (2013): The green algae *Ulva fasciata* Delile extract induces apoptotic cell death in human colon cancer cells. In: *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 49 (1), S. 74–81. DOI: 10.1007/s11626-012-9547-3.

- Schulze-Osthoff, K.; Ferrari, D.; Los, M.; Wesselborg, S.; Peter, M. E. (1998): Apoptosis signaling by death receptors. In: *European journal of biochemistry* 254 (3), S. 439–459.
- Senthilkumar, Kalimuthu; Manivasagan, Panchanathan; Venkatesan, Jayachandran; Kim, Se-Kwon (2013): Brown seaweed fucoidan: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. In: *International journal of biological macromolecules* 60, S. 366–374. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.06.030.
- Shimizu, Shigeomi; Kanaseki, Toku; Mizushima, Noboru; Mizuta, Takeshi; Arakawa-Kobayashi, Satoko; Thompson, Craig B.; Tsujimoto, Yoshihide (2004): Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. In: *Nature cell biology* 6 (12), S. 1221–1228. DOI: 10.1038/ncb1192.
- Smith, S.; Gariat, I.; Schmitt, A.; Lange, T. de (1998): Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. In: *Science (New York, N.Y.)* 282 (5393), S. 1484–1487.
- Sosna, Justyna; Philipp, Stephan; Fuchslocher Chico, Johaiber; Saggau, Carina; Fritsch, Jurgen; Foll, Alexandra et al. (2016): Differences and Similarities in TRAIL- and Tumor Necrosis Factor-Mediated Necroptotic Signaling in Cancer Cells. In: *Molecular and cellular biology* 36 (20), S. 2626–2644. DOI: 10.1128/MCB.00941-15.
- Stransky, Laura; Cotter, Kristina; Forgac, Michael (2016): The Function of V-ATPases in Cancer. In: *Physiological reviews* 96 (3), S. 1071–1091. DOI: 10.1152/physrev.00035.2015.
- Suzuki, Kuninori; Ohsumi, Yoshinori (2007): Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. In: *FEBS letters* 581 (11), S. 2156–2161. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.01.096.
- Thon, Lutz; Mohlig, Heike; Mathieu, Sabine; Lange, Arne; Bulanova, Elena; Winoto-Morbach, Supandi et al. (2005): Ceramide mediates caspase-independent programmed cell death. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (14), S. 1945–1956. DOI: 10.1096/fj.05-3726com.
- Tian, Xiao-Hong; Hou, Wei-Jian; Fang, Yan; Fan, Jun; Tong, Hao; Bai, Shu-Ling et al. (2013): XAV939, a tankyrase 1 inhibitor, promotes cell apoptosis in neuroblastoma cell lines by inhibiting Wnt/beta-catenin signaling pathway. In: *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 32, S. 100. DOI: 10.1186/1756-9966-32-100.
- Turcotte, Sandra; Sutphin, Patrick D.; Giaccia, Amato J. (2008): Targeted therapy for the loss of von Hippel-Lindau in renal cell carcinoma: a novel molecule that induces autophagic cell death. In: *Autophagy* 4 (7), S. 944–946.
- Ullman, E.; Fan, Y.; Stawowczyk, M.; Chen, H-M; Yue, Z.; Zong, W-X (2008): Autophagy promotes necrosis in apoptosis-deficient cells in response to ER stress. In: *Cell death and differentiation* 15 (2), S. 422–425. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402234.
- Vanden Berghe, Tom; Linkermann, Andreas; Jouan-Lanhouet, Sandrine; Walczak, Henning; Vandenabeele, Peter (2014): Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 15 (2), S. 135–147. DOI: 10.1038/nrm3737.
- Vandenabeele, Peter; Galluzzi, Lorenzo; Vanden Berghe, Tom; Kroemer, Guido (2010): Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 11 (10), S. 700–714. DOI: 10.1038/nrm2970.

- Voigt, Susann; Philipp, Stephan; Davarnia, Parvin; Winoto-Morbach, Supandi; Roder, Christian; Arenz, Christoph et al. (2014): TRAIL-induced programmed necrosis as a novel approach to eliminate tumor cells. In: *BMC cancer* 14, S. 74. DOI: 10.1186/1471-2407-14-74.
- Walczak, H.; Miller, R. E.; Ariail, K.; Gliniak, B.; Griffith, T. S.; Kubin, M. et al. (1999): Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. In: *Nature medicine* 5 (2), S. 157–163. DOI: 10.1038/5517.
- Wang, Yingfei; An, Ran; Umanah, George K.; Park, Hyejin; Nambiar, Kalyani; Eacker, Stephen M. et al. (2016): A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1. In: *Science (New York, N.Y.)* 354 (6308). DOI: 10.1126/science.aad6872.
- Wu, You-Tong; Tan, Hui-Ling; Huang, Qing; Kim, You-Sun; Pan, Ning; Ong, Wei-Yi et al. (2014): Autophagy plays a protective role during zVAD-induced necrotic cell death. In: *Autophagy* 4 (4), S. 457–466. DOI: 10.4161/auto.5662.
- Xie, Rui; Wang, Haibo; Jin, Hai; Wen, Guorong; Tuo, Biguang; Xu, Jingyu (2017): NHE1 is upregulated in gastric cancer and regulates gastric cancer cell proliferation, migration and invasion. In: *Oncology reports* 37 (3), S. 1451–1460. DOI: 10.3892/or.2017.5386.
- Xu, Lei; Fukumura, Dai; Jain, Rakesh K. (2002): Acidic extracellular pH induces vascular endothelial growth factor (VEGF) in human glioblastoma cells via ERK1/2 MAPK signaling pathway: mechanism of low pH-induced VEGF. In: *The Journal of Biological Chemistry* 277 (13), S. 11368–11374. DOI: 10.1074/jbc.M108347200.
- Yamashima, Tetsumori (2004): Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. In: *Cell calcium* 36 (3-4), S. 285–293. DOI: 10.1016/j.ceca.2004.03.001.
- Yang, Jun; Zhang, Wen; Evans, Paul M.; Chen, Xi; He, Xi; Liu, Chunming (2006): Adenomatous polyposis coli (APC) differentially regulates beta-catenin phosphorylation and ubiquitination in colon cancer cells. In: *The Journal of Biological Chemistry* 281 (26), S. 17751–17757. DOI: 10.1074/jbc.M600831200.
- Yang, Lu; Sun, Luxi; Teng, Yaqun; Chen, Hao; Gao, Ying; Levine, Arthur S. et al. (2017): Tankyrase1-mediated poly(ADP-ribosyl)ation of TRF1 maintains cell survival after telomeric DNA damage. In: *Nucleic acids research* 45 (7), S. 3906–3921. DOI: 10.1093/nar/gkx083.
- Ye, Jun; Li, Yuping; Teruya, Kiichiro; Katakura, Yoshinori; Ichikawa, Akira; Eto, Hiroshi et al. (2005): Enzyme-digested Fucoidan Extracts Derived from Seaweed Mozuku of *Cladosiphon novae-caledoniae* kylin Inhibit Invasion and Angiogenesis of Tumor Cells. In: *Cytotechnology* 47 (1-3), S. 117–126. DOI: 10.1007/s10616-005-3761-8.
- Ye, Yuan-Chao; Wang, Hong-Ju; Chen, Ling; Liu, Wei-Wei; Tashiro, Shin-Ichi; Onodera, Satoshi et al. (2013): Negatively-regulated necroptosis by autophagy required caspase-6 activation in TNF α -treated murine fibrosarcoma L929 cells. In: *International immunopharmacology* 17 (3), S. 548–555. DOI: 10.1016/j.intimp.2013.05.009.
- Young, Megan M.; Takahashi, Yoshinori; Khan, Osman; Park, Sungman; Hori, Tsukasa; Yun, Jong et al. (2012): Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. In: *The Journal of Biological Chemistry* 287 (15), S. 12455–12468. DOI: 10.1074/jbc.M111.309104.
- Yuan, Kaiyu; Sun, Yong; Zhou, Tong; McDonald, Jay; Chen, Yabing (2013): PARP-1 regulates resistance of pancreatic cancer to TRAIL therapy. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19 (17), S. 4750–4759. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0516.

Zeng, Wenbin; Wang, Xiaobo; Xu, Pengfei; Liu, Gang; Eden, Henry S.; Chen, Xiaoyuan (2015): Molecular imaging of apoptosis: from micro to macro. In: *Theranostics* 5 (6), S. 559–582. DOI: 10.7150/thno.11548.

Zhang, Zhongyuan; Teruya, Kiichiro; Eto, Hiroshi; Shirahata, Sanetaka (2011): Fucoïdan extract induces apoptosis in MCF-7 cells via a mechanism involving the ROS-dependent JNK activation and mitochondria-mediated pathways. In: *PloS one* 6 (11), e27441. DOI: 10.1371/journal.pone.0027441.

Zhang, Zhongyuan; Teruya, Kiichiro; Eto, Hiroshi; Shirahata, Sanetaka (2013): Induction of apoptosis by low-molecular-weight fucoïdan through calcium- and caspase-dependent mitochondrial pathways in MDA-MB-231 breast cancer cells. In: *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 77 (2), S. 235–242. DOI: 10.1271/bbb.120631.

Zong, Wei-Xing; Ditsworth, Dara; Bauer, Daniel E.; Wang, Zhao-Qi; Thompson, Craig B. (2004): Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. In: *Genes & development* 18 (11), S. 1272–1282. DOI: 10.1101/gad.1199904.

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich in den letzten Jahren auf dem Weg zur Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Großer Dank gebührt meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Dieter Adam, der mein Interesse für seine spannende Forschungsarbeit geweckt hat und der mit der freundlichen Bereitstellung des Dissertationsthemas sein Vertrauen in meine Arbeit gesetzt hat. Seine guten Ratschläge und die wertvolle Kritik haben mir sehr geholfen. Danke für die großartige Betreuung der letzten Jahre, in denen ich bei Problemen stets auf ein offenes Ohr treffen durfte!

Sehr bedanken möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Justyna Sosna und Dr. rer. nat. Stephan Philipp, die mich von Anfang an mit viel Herzlichkeit in den Laboralltag integrierten und mich geduldig in die wissenschaftliche Methodik einarbeiteten. Für ihre Unterstützung und Freundschaft bin ich sehr dankbar.

Ein herzlicher Dank gilt Sabine Mathieu! Dank ihrer freundlichen Art habe ich mich im Labor immer wohlfühlt. Bei Fragen durfte ich mich immer an sie wenden und ihre wertvollen Tipps haben sehr zum Gelingen meiner Experimente beigetragen.

Auch möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Ulf Geisen bedanken für die gute Zusammenarbeit rund um die Wirkstoffe des Meeres.

Vielen Dank auch an Meike Kähler! Nicht nur während unserer gemeinsamen Zeit in der Arbeitsgruppe, auch darüber hinaus durfte ich auf ihre Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit zählen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden. Für ihren Rückhalt und die Unterstützung in allen Lebenslagen, für die Motivation und auch die nötige Ablenkung, ob bei der gemeinsamen Mittagspause auf dem Campus oder nach Feierabend.

11 Publikationen:

Sosna, Justyna; Philipp, Stephan; Fuchslocher Chico, Johaiber; Saggau, Carina; Fritsch, Jürgen; Föll, Alexandra; Plenge, Johannes; Arenz, Christoph; Pinkert, Thomas; Kalthoff, Holger; Trauzold, Anna; Schmitz, Ingo; Schütze, Stefan und Adam, Dieter (2016): Differences and Similarities in TRAIL- and Tumor Necrosis Factor-Mediated Necroptotic Signaling in Cancer Cells. In: *Molecular and Cellular Biology* 36 (20), S. 2626–2644. DOI: 10.1128/MCB.00941-15.

Geisen, Ulf; Zenthoefer, Marion; Peipp, Matthias; Kerber, Jannik; Plenge, Johannes; Manago, Antonella; Fuhrmann, Markus; Geyer, Roland; Hennig, Steffen; Adam, Dieter; Piker, Levent; Rimbach, Gerald und Kalthoff, Holger (2015): Molecular Mechanisms by Which a *Fucus vesiculosus* Extract Mediates Cell Cycle Inhibition and Cell Death in Pancreatic Cancer Cells. In: *Marine Drugs* 13 (7), S. 4470–4491. DOI: 10.3390/md13074470.

Philipp, Stephan; Sosna, Justyna; Plenge, Johannes; Kalthoff, Holger; Adam, Dieter (2015): Homoharringtonine, a clinically approved anti-leukemia drug, sensitizes tumor cells for TRAIL-induced necroptosis. In: *Cell Communication and Signaling: CCS* 13, S. 25. DOI: 10.1186/s12964-015-0103-0.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Johannes Plenge
Anschrift: Jungfernstieg 29 a, 24116 Kiel
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Geburtsdatum: 30.06.1991
Geburtsort: Zeven

Ausbildung und Werdegang:

Seit 2017 Anstellung als Assistenzarzt in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel

2010-2016 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
2016: Abschluss des dritten Abschnittes der ärztlichen Prüfung mit der Note „sehr gut“
2015: Abschluss des zweiten Abschnittes der ärztlichen Prüfung mit der Note „sehr gut“
2012: Abschluss des ersten Abschnittes der ärztlichen Prüfung mit der Note „sehr gut“
Seit Juli 2013: Dissertation zu dem Thema: „Untersuchungen zur Induktion von nicht-apoptotischem, reguliertem Zelltod als mögliche Strategie in der Krebstherapie“ am Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel

2008-2010 Oberstufe des Jade-Gymnasiums, Jaderberg
2010: Abitur (1,1)

2003-2008 Sekundarstufe 1 des Jade-Gymnasiums, Jaderberg

2001-2003 Orientierungsstufe Jade, Jaderberg

1997-2001 Grundschule Jaderberg

13 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, Johannes Plenge, dass die vorliegende Arbeit abgesehen von der Beratung durch die Betreuer nach Inhalt und Form selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln verfasst wurde. Diese Arbeit oder Teile daraus haben bisher noch nicht an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Die Arbeit wurde unter Einhaltung der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Auszüge dieser Arbeit wurden bereits publiziert.

Kiel, den

Johannes Plenge