

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN



**Dissertation**

# **Induktion von Apoptose durch Toll-like-Rezeptor-Liganden**

**Frederik Höfling**

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene  
der Technischen Universität München

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dirk H. Busch



# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene

Direktor: Univ.-Prof. Dr. D. Busch

## **Induktion von Apoptose durch Toll-like-Rezeptor-Liganden**

**Karl Frederik Höfling**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker  
2. Univ.-Prof. Dr. J. Ruland

Die Dissertation wurde am 13.04.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 29.06.2011 angenommen.

# Induktion von Apoptose durch Toll-like-Rezeptor-Liganden

**Frederik Höfling**

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene  
der Technischen Universität München

für meine Eltern.

Eure Unterstützung ist grenzenlos.

Danke.

## Zusammenfassung

Apoptose lässt unerwünschte Zellen verschwinden. Diese Funktion ist in vielen Tumorentitäten gestört und dient als Ansatzpunkt für spezifische Tumor-Therapien.

Toll-like-Rezeptoren (TLR) erkennen pathogene Erreger. TLR-Liganden induzieren eine zelluläre Immunantwort mit dem Ziel, das Pathogen zu beseitigen.

In dieser Arbeit werden Schnittstellen beider Systeme neu aufgezeigt und/oder weiter untersucht.

Die Induktion von Apoptose durch Toll-like-Rezeptor-Liganden kann in Fibroblasten, Keratinozyten, Monozyten und Melanom-Zellen gezeigt werden.

Im Detail läuft TLR2-vermittelte Apoptose-Induktion in Fibroblasten via Caspase-8.

CpG-Stimulation von TLR9 induziert Apoptose unabhängig von Caspase-8 und sensibilisiert Fibroblasten für weitere Apoptose-Reize. Dabei sind die strukturellen Voraussetzungen für den mitochondrialen Signalweg (BH3-only-Proteine) gegeben, werden jedoch nicht genutzt.

Der TLR3-Ligand Poly(I:C) und die TLR7-Liganden Imiquimod und Loxoribin induzieren Apoptose in Keratinozyten. Dabei wird nur Noxa als Vertreter der getesteten BH3-only-Proteine induziert, gefolgt von Bax- und Cytochrom c-Aktivierung.

TLR4-Ligand LPS und TLR3-Ligand Poly(I:C) induzieren Apoptose in Monozyten und Fibroblasten, der mitochondriale Signalweg über BH3-only-Proteine läuft dabei ab. Dieser ist bei TLR3-Stimulation abhängig von der MAP-Kinase p38, bei TLR4-Stimulation p38-unabhängig. Dabei ist die Induktion des BH3-only-Proteins Noxa durch Poly(I:C) abhängig von NF- $\kappa$ B, die Noxa-Induktion durch LPS nicht.

In Melanomzellen induzieren der TLR3-Ligand Poly(I:C) und die TLR7-Liganden Imiquimod und Loxoribin Apoptose. Funktionell sind sowohl Apoptose- als auch Toll-like-Rezeptor-Signalwege vorhanden.

Ein Vergleich von Keratinozyten mit Melanomzellen ergibt bei den malignen Zellen eine deutlich vermehrte Apoptoseträgheit adäquaten Reizen gegenüber. Die BH3-Ebene ist dabei nicht induzierbar, obwohl die die strukturellen Voraussetzungen für Apoptose über Aktivierung von BH3-Proteinen gegeben sind.

Bei verschiedenen Zelltypen, selbst bei verschiedenen Zelltypen gleicher Gewebe, zeigen sich damit sehr unterschiedliche Mechanismen der Apoptose-Induktion. Die meisten haben intakte strukturelle Voraussetzungen für (TLR-induzierte) Apoptose, welche jedoch auf verschiedenen Ebenen blockiert sein können. Dies zeigt die Notwendigkeit von individuellen Therapiekonzepten, passend zum jeweils betroffenen Gewebe und dessen Besonderheiten in der Signaltransduktion.

## Abstract

Apoptosis makes unwanted cells disappear. This mechanism is distracted in many different kinds of tumors and therefore can be used for specific anti-tumor therapy.

Toll-like-receptors (TLR) detect and recognize pathogens. TLR-ligands induce a cellular immune-response with the goal of eliminating the pathogen.

Here, connecting interfaces between both signaling-systems are established and/or described in the detail.

Apoptosis-induction via Toll-like-receptor-ligands could be shown in Fibroblasts, Keratinocytes, Monozytes and Melanoma-cells.

In detail, TLR2-mediated Apoptosis in Fibroblasts runs via Caspase-8.

CpG stimulation of TLR9 induces Apoptosis independently of Caspase-8 and sensitizes fibroblasts for further Apoptosis-stimuli. Here, the structural conditions for the mitochondrial pathway (BH3-only-proteins) are given, however, not used.

The TLR3-ligand Poly(I:C) and the TLR7-ligands Imiquimod and Loxoribine induce Apoptosis in Keratinocytes. Only Noxa as representative for the tested BH3-only-proteins is up-regulated, followed by activation of Bax and Cytochrome c.

TLR4-ligand LPS and TLR3-ligand Poly(I:C) induce Apoptosis in Monocytes and Fibroblasts via the mitochondrial pathway, involving BH3-only-proteins. This is MAP-kinase p38-dependent with TLR3-stimulation and independent of p38 with TLR4-stimulation.

In this system, induction of the BH3-only-protein Noxa with Poly(I:C) is NF $\kappa$ B-dependent, Noxa-induction with LPS not.

In Melanoma-cells, the TLR3-ligand Poly(I:C) and the TLR7-ligands Imiquimod and Loxoribine induce Apoptosis. The functional requirements for Apoptosis and Toll-like-receptor-signaling are given.

Comparison between Keratinocytes and Melanoma-cells show within the malignant cellpool a significant higher indolence to apoptotic stimuli. The BH3-level here cannot be induced, though the structural conditions for Apoptosis via BH3-only-proteins are at hand.

Different types of cells, even within one type of tissue, show very differentiated mechanisms of Apoptosis-induction. Most of the tested cells have intact structural systems for (TLR-induced) Apoptosis, which yet can be blocked at certain levels.

This shows the need of individualized concepts of therapy, matching the affected tissue and its characteristics in signal-transduction.

## Inhalt

Seite

009.	1. Einleitung
009.	1.01. Zelltod
009.	1.02. PCD – Programmed Cell Death
010.	1.03. Apoptose – Terminus
010.	1.04. Apoptose vs. Nekrose
011.	1.05. Apoptose – Bedeutung
012.	1.06. Apoptose und therapeutische Ansätze
013.	1.07. Apoptose – Morphologie
014.	1.08. Apoptose – Signalkaskade
015.	1.09. Apoptose – Auslöser
015.	1.10. Caspasen
018.	1.11. Todesrezeptoren
018.	1.12. Mitochondriale Signaltransduktion
018.	1.13. Bcl-2 Proteine
019.	1.14. Antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie
020.	1.15. Proapoptotische BH3-only Proteine
024.	1.16. Proapoptotische Bax/Bak-Gruppe
025.	1.17. Interaktion von pro- und antiapoptotischen Proteinen
026.	1.18. Cytochrom c und die Bildung des Apoptosoms
026.	1.19. Downstream Caspase-3
027.	1.20. Toll-like-Rezeptoren
028.	1.21. TLR-Signalwege
030.	1.22. Toll-like-Rezeptoren und Apoptose
031.	2. Zielsetzung
032.	3. Material und Methoden
032.	3.01. Chemikalien / Medien / Abkürzungsverzeichnis
034.	3.02. Puffer / Reaktionslösungen
035.	3.03. Antikörper
035.	3.04. Geräte und Materialien
036.	3.05. Software
036.	3.06. Zellen und Kulturmedien
039.	3.07. Zellkultur
040.	3.08. Hoechst-Färbung
041.	3.09. Western-Blotting
043.	3.10. Transfektion

- 045. 3.11. Plasmidisololation
- 046. 3.12. Konfokale Mikroskopie
- 048. 3.13. Nachweis von Effektorcaspasenaktivität (Caspase-3)
- 049. 4. Ergebnisse
- 049. 4.01. Apoptose und Toll-like-Rezeptor 9
- 049. 4.01.1. Caspasen-unabhängige Bax-Aktivierung durch CpG-DNA
- 050. 4.01.2. Apoptose-Induktion durch CpG-DNA ist abhängig von Proteinsynthese
- 051. 4.01.3. CpG-Vorbehandlung sensibilisiert für weitere Apoptose-Reize
- 052. 4.01.4. Keine Induktion von BH3-Proteinen durch CpG-DNA
- 053. 4.02. Die Immunregulatoren Imiquimod und Loxoribin
- 053. 4.02.1. HaCaT – morphologischer Nachweis von Apoptose
- 054. 4.02.2. Mel526 – morphologischer Nachweis von Apoptose
- 054. 4.02.3. HaCaT – Induktion von BH3-only-Proteinen
- 056. 4.02.4. Mel526 – Induktion von BH3-only-Proteinen
- 056. 4.03. Apoptose und Toll-like-Rezeptor-Liganden
- 057. 4.03.1. Humane Keratinozyten
- 057. 4.03.1.1. Apoptose nach Transfektion und Stimulation von TLR2, 3, 4 und 9
- 060. 4.03.1.2. Induktion von BH3-only-Proteinen durch Poly(I:C)
- 061. 4.03.1.3. Noxa-Induktion durch Toll-like-Rezeptor-Ligand Poly(I:C)
- 062. 4.03.1.4. Bax-Aktivierung durch Toll-like-Rezeptor-Ligand Poly(I:C)
- 063. 4.03.1.5. Cytochrom c-Freisetzung durch Toll-like-Rezeptor-Ligand Poly(I:C)
- 064. 4.03.1.6. p53 nach Poly(I:C)-Stimulation
- 065. 4.03.2. Humane Melanomzellen
- 066. 4.03.2.1. Mel526 - Apoptose nach Transfektion und Stimulation von TLR2, 3, 4 und 9
- 069. 4.03.2.2. IF6 - Apoptose nach Transfektion und Stimulation von TLR2, 3, 4 und 9
- 072. 4.03.2.3. Induktion von BH3-only-Proteinen in Melanom-Zellen
- 074. 4.03.3. Beteiligung weiterer Signalwege
- 074. 4.03.3.1. Die double-stranded RNA-activated Proteinkinase PKR
- 076. 4.03.3.2. Die MAP-Kinase ERK



079.	4.03.3.3. Der Toll-like-Rezeptor-Adapter MyD88
079.	4.03.4. Die Monozyten-Zelllinie MonoMac6
079.	4.03.4.1. Apoptose-Induktion durch Poly(I:C) und LPS in MonoMac6-Zellen
082.	4.03.4.2. BH3-only-Proteine und der p38-Inhibitor SB203580
086.	5. Diskussion
086.	5.01. Apoptose und der Toll-like-Rezeptor 9
086.	5.01.1. Toll-like-Rezeptoren
087.	5.01.2. Apoptose-Induktion durch TLR9
087.	5.01.3. Sensibilisierung für Apoptose
089.	5.02. Apoptose und Liganden der Toll-like-Rezeptoren
089.	5.02.1. HaCaT-Zellen und die Induktion von Apoptose durch Imiquimod und Loxoribin
090.	5.02.2. Apoptoseinduktion und die Toll-like-Rezeptoren 2, 3, 4 und 9
090.	5.02.2.1. HaCaT
091.	5.02.2.2. MonoMac6
092.	5.02.2.3. Mel526
093.	5.02.2.4. IF6
094.	5.02.3. Der mitochondriale Signalweg in Melanom-Zellen
094.	5.02.4. Apoptose nach Toll-like-Rezeptor-Stimulation: Ablauf des TLR-Signalweges
094.	5.02.4.1. MyD88, die MAP-Kinasen ERK/p38 und NF $\kappa$ B
096.	5.02.4.2. Die Protein-Kinase R (PKR)
097.	6. Schlusswort
098.	Danksagung
099.	Curriculum vitae
102.	7. Referenzen

## 1. Einleitung

“Life is pleasant. Death is peaceful. It’s the transition that’s troublesome.”

*Isaac Asimov (Biochemiker, Schriftsteller 1920-1992)*

### 1.01. Zelltod

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage nach Funktionsweisen des Sterbens von Zellen. Basierend auf der Erfindung der Lichtmikroskopie entwickeln Theodor Schwann und Matthias Schleiden 1838 die “Zell-Doktrin”, welche die Zellen als Bausteine von pflanzlichen und tierischen Organismen postuliert (Alberts B., 2002).

Kurz darauf, 1842, ist es der Giessener Exil-Schweizer Carl August Christoph Vogt, der Zelltod im Rahmen der metamorphotischen Entwicklung von Amphibien beschreibt: Er sieht Knorpelzellen der Geburtshelferkröte „verschwinden“ und „resorbiert“ werden (Vogt, 1842). Wenig beachtet, folgen dieser noch etwa weitere hundert Beobachtungen von Zelltod im 19. Jahrhundert (Clarke & Clarke, 1996), welche sich meist auf die morphologischen Aspekte von Zelluntergang bei Insekten oder Amphibien beschränken. Allerdings sind diese mit den heutigen deskriptiven Kriterien der Apoptose nahezu identisch: Pyknose (also Schrumpfung des Zellkerns und Zusammensintern des Chromatins), Histiolyse (Auflösen der Zelle) und schließlich Phagozytose (Beseitigung der Zellreste).

### 1.02. PCD – Programmed Cell Death

Viele Autoren verwenden die Begriffe PCD und Apoptose synonym. Hier jedoch soll PCD Apoptose während der Embryonalentwicklung beschreiben, Zelltod in allen weiteren Situationen mit Apoptose bezeichnet werden.

Programmierter Zelltod scheint in der Entwicklung aller Metazoen (Vielzeller) abzulaufen. Dessen reibungsloses Auftreten spielt eine entscheidende Rolle bei Embryonalentwicklung und Gewebshomöostase (Danial & Korsmeyer, 2004; Lockshin & Williams, 1965).

1966 erkennt J. R. Tata in PCD einen aktiven, energetisch aufwändigen Prozess:

Beim Untergang des Schwanzes der Kaulquappe in deren Metamorphosezyklus ist Proteinsynthese notwendig (Tata, 1966).

Zu der Erkenntnis, dass Tetrapoden (Landsäuger) in ihren Zellen ein aktives Programm zur Selbsttötung integriert haben, gelangt man über den Stamm der Nematoden (Fadenwürmer). *Caenorhabditis elegans*, der wohl berühmteste Vertreter dieser Gattung, wird in den 1960er Jahren von Sydney Brenner zum Modellorganismus etabliert, um genetische Analysen mit Zell- und Entwicklungsbiologie zu verbinden.

Die Beschreibung von Zelltod in *C. elegans* 1976 durch John Sulston (Sulston, 1976) ist der Beginn der Identifikation von Genen, die verantwortlich für Zell-Suizid sind. So verliert der *C. elegans*-Embryo während seiner Entwicklung 131 der ursprünglich 1090 angelegten Zellen (Ellis & Horvitz, 1986; Sulston & Horvitz, 1977), nicht jedoch nach Mutationen bestimmter *cell-death-abnormal (ced)*-Gene (Horvitz et al, 1983).

Damit ist spätestens 1983 ein genetisch regulierter, durch die Evolution hindurch konservierter Mechanismus für Zelltod bewiesen, an dessen Aufklärung seitdem immenses Interesse herrscht. 2002 wird von über 200 Publikationen pro Woche (!) mit dem Thema Apoptose berichtet (Vaux, 2002) und im Oktober des selben Jahres gibt die Nobelversammlung des Karolinska Institutet Stockholm bekannt, die Wegbereiter dieses wissenschaftlichen Boom-Themas Sydney Brenner, H. Robert Horvitz und John E. Sulston mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin 2002 zu ehren, gemeinsam für ihre Entdeckungen betreffend “genetic regulation of organ development and programmed cell death” (Pressemitteilung 7. Oktober 2002, Karolinska Institutet Stockholm).

### 1.03. Apoptose – Terminus

Als wissenschaftlicher Terminus wird dieser Begriff 1972 von John Foxton Ross Kerr et al. eingeführt, um einen “[...] general mechanism of controlled cell deletion [...]” mit “[...] important kinetic significance [...]” zu beschreiben (Kerr et al, 1972).

Das Wort “Apoptose” entstammt dem Griechischen und setzt sich aus den Wörtern  $\alpha\pi\acute{o}$  (apo = von, aus, fort, weg) und  $\pi\tau\omega\sigma\iota\varsigma$  (ptosis = Sturz, Fall, Abfall, Absturz) zusammen. Im Griechischen wird der Begriff  $\alpha\pi\acute{o}\pi\tau\omega\sigma\iota\varsigma$  (Apoptose) als “Abfallen, Herabfallen, Niedergang” verwendet und beschreibt speziell das (herbstliche) Herabfallen der Blätter und Blütenblätter von Bäumen und Blumen.

### 1.04. Apoptose vs. Nekrose

Bei der Apoptose beginnt die Zelle auf einen Stimulus hin zu schrumpfen, verliert Kontakt zu Nachbarzellen, ihr Chromatin kondensiert, der Kern schrumpft, bildet Kernfragmente und schließlich zerfällt die Zelle in mehrere apoptotische Körperchen, deren Hüllen noch intakte Zellmembran bilden. Durch die Wahrung der Membranintegrität bleibt ein Freisetzen von intrazellulären Entzündungsmediatoren aus, vielmehr wird ein Provozieren von Entzündung durch Makrophagen unterdrückt (Voll et al, 1997). Die Überreste werden dann überwiegend von Fresszellen beseitigt.

Dieser Mechanismus funktioniert rasch, organisiert und ohne großen Einfluss auf die umliegenden Zellen. Er kostet die Zelle jedoch Energie in Form von ATP, diesen wohlregulierten Mechanismus auszuführen.

Bei der Nekrose hingegen schwillt die Zelle samt Kern und Mitochondrien an, die zell-interne Homöostase geht verloren und durch Lyse der Zellmembran kommt das extrazelluläre Milieu mit dem Zellinhalt in Kontakt, was meist eine lokale Entzündungsreaktion hervorruft. Ödem und Schädigung des umliegenden Gewebes sind die Folge (Nicotera & Lipton, 1999). Auch hinter dem meist als “passiv” bezeichneten Prozess der Nekrose scheint jedoch ein reguliertes Signalsystem zu stehen, was mehr und mehr Gegenstand aktueller Forschung wird.

## 1.05. Apoptose – Bedeutung

### **Übersicht**

Während der Embryonalentwicklung hilft Apoptose die Organe zu formen sowie Finger und Zehen zu gestalten. Nerven- und Immunsystem entstehen beide durch eine Überproduktion von Zellen, gefolgt vom Tod derer, die keine funktionsfähigen Synapsen ausbilden oder keine produktiven Antigen-spezifitäten exprimieren.

Apoptose ist notwendig, um den Körper von Pathogen-befallenen Zellen zu befreien und um aktive oder auto-aggressive Immunzellen zu eliminieren (Heemels, 2000).

### **Organogenese, Morphogenese, Embryogenese**

Während der Embryonalentwicklung sterben die meisten der ursprünglich angelegten Zellen wieder apoptotischen Zelltod (Vaux & Korsmeyer, 1999). Apoptose formt so intrauterin Organe und Körperteile, etwa die Endphalangen der Gliedmaßen (Zuzarte-Luis & Hurle, 2002), das Gehirn (Hutchins & Barger, 1998; Oppenheim, 1991) oder die Differenzierung der Genitale in weiblich oder männlich (Meier et al, 2000). Apoptose während der Embryonalphase ist somit für die reibungslose Entwicklung des Organismus verantwortlich.

### **Homöostase und Zell-Differenzierung**

Durch Mitose werden über 100.000 Zellen im menschlichen Körper pro Sekunde gebildet, ebenso viele müssen also in der selben Zeiteinheit sterben, damit eine relativ konstante Zellzahl im Organismus gewährleistet ist (Vaux & Korsmeyer, 1999). Der vorrangige Mechanismus des Zellabbaus hierfür ist Apoptose. Ebenfalls durch Apoptose werden defekte oder ungewollte Zellen beseitigt (Vaux & Strasser, 1996). Bei fehlerhafter Funktion von Apoptose sind proliferative beziehungsweise degenerative Erkrankungen die Folge.

### **Immunsystem**

Produziert der Körper bestimmte Zellen vermehrt, wie etwa antigenspezifische T-Zellen zur Immunantwort, fällt deren Anzahl jedoch nach einem erreichten Maximum stark ab. Die Immunreaktion ist damit wieder “abgeschaltet”. Diese Reduktion der T-Zellen geschieht durch Apoptose (Hildeman et al, 2002) und ist bedeutend für die Aufrechterhaltung der

Lymphozyten-Homöostase, um unspezifische Schäden am umliegenden Gewebe durch eine verlängerte Immunreaktion zu verhindern und um die Gefahr von Autoimmunität zu minimieren (Strasser, 2005).

Im Falle eines Defekts des apoptotischen Systems besteht die Gefahr autoimmuner Phänomene (Bouillet et al, 1999), wie etwa beim Systemischen Lupus Erythematoses (SLE).

### **Malignome**

Das Follikuläre Lymphom, das mit ca. 22% häufigste niedrig-maligne Non-Hodgkin-Lymphom der B-Zell-Reihe (InternationalLymphomaStudyGroup, 1997) weist in den meisten Fällen die Chromosomentranslokation t(14;18)(q32;q21) auf, wodurch das Gen Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) überexprimiert wird. Bcl-2 als antiapoptotischer Spieler (es kodiert ein an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiertes, antiapoptotisches Protein) wird überexprimiert, und daraus resultiert eine unphysiologisch verlängerte Lebensfähigkeit von B-Zellen. In diesem Zusammenhang kloniert (Cleary et al, 1986), wird bald darauf die Rolle von Bcl-2 im Zelltod-System erkannt, und dass eine Inhibierung von Zelltod schließlich zu Malignomen führen kann (Strasser et al, 1992; Vaux et al, 1988). So entwickeln transgene Mäuse bei Überexpression von Bcl-2 maligne B-Zell-Lymphome (Linette et al, 1995).

Ein prominenter Vertreter der Apoptose beeinflussenden Proteine ist das 53 Kilodalton schwere p53, "Wächter des Genoms" (Lane, 1992). Die Inaktivierung seiner Funktion als Tumorsuppressor ist quasi eine Art Universalschritt in der Entstehung von Krebserkrankungen des Menschen (Hollstein et al, 1991): Es ist das am häufigsten mutierte Gen in Malignomen des Menschen (Levine et al, 1991).

P53 ist ein wichtiger Regulator des Zell-Zyklus (Yonish-Rouach, 1996) und bestimmend für die zelluläre Reaktion (Apoptoseinduktion) auf DNA-Schäden (Lowe et al, 1993; Vogelstein & Kinzler, 1992). Wird es in Krebszellen ohne p53 oder in mutierte Malignomzellen transfiziert, induziert es Apoptose und ist somit in der Lage, Tumorwachstum zu regulieren (Yonish-Rouach et al, 1991). Apoptoseinduktion über p53 kann durch Bcl-2-Expression geblockt werden (Chiou et al, 1994).

### 1.06. Apoptose und therapeutische Ansätze

Das steigende Verständnis der Mechanismen und der Bedeutung von Apoptose macht sie zum Ansatzpunkt für Therapien. Der Eingriff in den Apoptose-Mechanismus als therapeutischer Ansatz kann zu zweierlei führen: Entweder wird die Wirksamkeit parallel eingesetzter (Pharmako)-Therapien erhöht, so die Idee bei Anti-Tumor-(Chemo/Radio)-Therapie (Strasser et al, 1997), oder aber die Modulation der Apoptose-Signale an sich stellt die Therapie dar.

Die neueste Generation von Caspase-Inhibitoren wurde als Medikamente entworfen, um übermäßigen Zelltod nach etwa Ischämie oder in neurodegenerativen Erkrankungen zu verhindern. Diese werden derzeit in klinischen Studien getestet (Linton et al, 2005; Rudolphi et al, 2003).

Ebenfalls in klinischer Anwendung befinden sich Gentherapie bzw. Antisense-Verfahren mit dem Ziel, Bcl-2-Protein-Synthese zu inhibieren (Moore et al, 2006; Nicholson, 2000; O'Brien et al, 2007).

Neue Apoptose-modifizierende Medikamente sind BH3-only-protein-Mimetics (Cory & Adams, 2002), TRAIL(Apo2L)-Liganden (Huang & Sheikh, 2006) oder Therapeutika, die Mitochondrien beeinflussen, deren Membran-Permeabilisierung ein entscheidender Schritt der Apoptose-Kaskade ist (Green & Kroemer, 2004; Mattson & Kroemer, 2003).

### 1.07. Apoptose – Morphologie

Lange bevor der tatsächliche Mechanismus der Apoptose bekannt wurde, war das Ereignis morphologisch weitgehend beschrieben, interessanterweise immer und in allen observierten Zelltypen sehr ähnlich. Dies weist auf einen hoch konservierten Mechanismus hin.

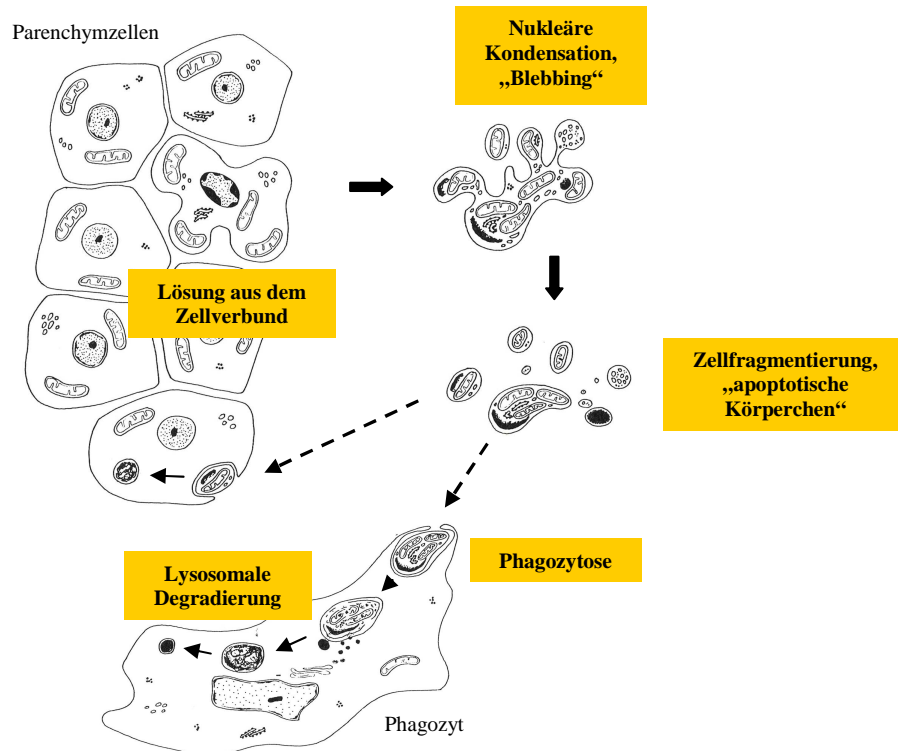
Etwa Mitte des 19. Jahrhunderts beginnen Wissenschaftler durch das kurz davor erfundene Lichtmikroskop Zellen zu sehen, die “verschwinden” (Vogt, 1842) und “Detritus” (Virchow, 1871) bilden. Dem folgen eine Vielzahl von morphologischen Beschreibungen und Abbildungen dieses Vorgangs (seit 1938 sind auch Elektronenmikroskope kommerziell erhältlich), bis 1972 John Kerr et al. nicht nur den Begriff “Apoptose” für ein “active, inherently programmed phenomenon” vorschlagen, sondern auch dessen Morphologie so exakt beschreiben, dass heute, über 30 Jahre später, dem wenig hinzuzufügen ist (siehe Abb. 001).

Die betreffenden Zellen lösen sich aus ihrem Verbund, das nukleäre Chromatin beginnt sich zu verdichten und auseinander zu brechen (anfangs entlang der Kernmembran, später der komplette Kern), dann bildet die Zelloberfläche Ausstülpungen („blebs“, „blebbing“). Zwar sieht man den Zellen ihre bevorstehende Auflösung nicht an, doch wenig später haben sie ihre Form verloren und es resultieren zahlreiche kompakte, Zellmembran-umhüllte Überbleibsel der Zellen in unterschiedlichsten Größen, die apoptotischen Körperchen.

Diese beginnen sich in Gruppen zu formieren und enthalten zumindest anfangs noch intakte Zellorganellen und/oder pyknotische Reste des Kerns sowie zum Teil cytoplasmische Vakuolen.

In fortgeschrittenem Stadium reagieren auch die Zellorganellen: Die Mitochondrien-Matrix wird durchlässig und zeigt lokale, flockige Verdichtungen, die Membranen der Organellen sowie die der apoptotischen Körperchen, reißen ein, die Ribosomen schwellen an und schwimmen, die Mikrovilli der Plasmamembran gehen verloren. Umliegende Zellen

(überwiegend Makrophagen) umschließen nun die apoptotischen Körperchen, phagozytieren diese und bauen sie ab. Übrig bleiben elektronendichte, lysosomal degradierte Restkörperchen, welche schnell verschwinden (Häcker, 2000; Kerr et al, 1972). Eine entzündliche Reaktion folgt bei der Apoptose nicht, diese wird zum Teil sogar aktiv unterdrückt (Fadok et al, 1998).



**Abbildung 001.**  
Morphologische Stadien der Apoptose, modifiziert nach (Kerr et al, 1972).

### 1.08. Apoptose – Signalkaskade

Ein Stimulus, welcher von extrazellulär oder intrazellulär auf die Zelle wirken kann, löst je nach Ort des Auftretens einen der zwei fundamentalen Apoptose-Wege aus: den extrinsischen, Todesrezeptor-vermittelten Signalweg oder den intrinsischen, mitochondrialen Signalweg. Beide enden in einer gemeinsamen Endstrecke, die mit der Aktivierung von Caspase-3 beginnt und mit dem Tod (Degradierung) der Zelle endet. Bindeglied zwischen beiden Systemen stellt das BH3-only-Protein Bid dar, welches durch Caspase-8 (Todesrezeptor-Weg) gespalten wird und als aktives tBid wie seine BH3-Verwandten (Mitochondrialer-Weg) den intrinsischen Weg durch die Initiierung von Cytochrom c-Freisetzung induziert. Eine schematische Darstellung der bekannten Signalwege zeigt Abb. 004.

### 1.09. Apoptose – Auslöser

Auslöser ist im Allgemeinen Zellstress. Als extrazelluläre Stimuli fungieren Reize (Abb. 002) und Liganden der Todesrezeptoren (transmembranöse Rezeptorproteine), welche in Kapitel 1.12. besprochen werden sollen.

Neben diesen existiert eine große Anzahl intrazellulärer Auslöser, zum Teil noch unbekannter Natur, die auf DNA, Zellorganelle oder andere Zellstrukturen direkt oder indirekt einwirken und dadurch Apoptose induzieren. Wie im Weiteren zu sehen sein wird, stellt die Aktivierung der so genannten BH3-only-Proteine den ersten Schritt der Aktivierung des intrinsischen Weges der Apoptose-Induktion dar. In Abb. 002 sind zu den genannten Apoptose-Stimuli die hauptsächlich aktivierten BH-3-Proteine angegeben. Diese stellen eine grobe Auswahl dar und können sich in verschiedenen Zelltypen unterscheiden.

<u>Apoptose-Stimulus</u>	<u>Hauptwirkung auf</u>
Antigenrezeptor-Crosslinking	Bim
B-Zell-Rezeptor-Crosslinking	evtl. Bik
Bortezomib	Bim, Bik
Cytokinentzug	Bim, Puma, evtl. Bad, evtl. Hrk
DNA-Schäden über p53	Noxa, Puma, evtl. Bim
Entzug von Wachstumsfaktoren	Hrk, Bad, Puma, Bim
Glukokortikoide	Bim, Puma
Granzyme B	Bid
Staurosporin	Puma
Taxane	Bim
Todesrezeptor-Liganden	Bid
UV-Bestrahlung	Bim, evtl. Bmf
Verlust von Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakt (Anoikis)	Bmf, Bim

**Abbildung 002.** Auswahl von Apoptose-Stimuli mit den typischerweise aktivierten BH3-only Proteinen. Diese können sich in verschiedenen Zelltypen unterscheiden.

### 1.10. Caspasen

Caspasen sind *cysteine-dependent aspartate specific proteinases*. Sie haben die Aminosäure Cystein im aktiven Zentrum und spalten ihre Substrate C-terminal der Aminosäure Aspartat.

Derzeit sind elf humane Caspasen (Caspase 1-10 sowie Caspase-14, die Nummerierung erfolgt in der Reihenfolge der Entdeckung) bekannt (Lamkanfi et al, 2002), von denen jedoch nicht alle apoptotisch wirksam sind. Die zelltodspezifischen dieser Proteine sind teilweise ausschließlich an apoptotischen, teilweise noch an anderen Signalwegen (z.B. bei Entzündungen) beteiligt (Kumar, 2007), siehe Abb. 003.

Zudem unterteilt man Caspasen nach ihrer Funktionalität: Initiator-Caspasen der Apoptose, Effektor-Caspasen der Apoptose und gemischt-funktionelle Caspasen (Apoptose/Entzündung).



Initiator-Caspasen stellen die Verbindung zwischen der eigentlichen Apoptose-Ausführung (downstream Caspase-3) und der initialen Aktivierung durch Zell-Reize und Regulatoren dar. Von Initiator-Caspasen aktiviert, spalten Effektor-Caspasen dann die meisten ihrer zellulären Substrate (Kumar, 2007).

Initiator	Initiator	Effektor
Apoptose / Entzündung	Apoptose	Apoptose
Caspase-1	Caspase-8	Caspase-3
Caspase-4	Caspase-9	Caspase-6
Caspase-5	Caspase-10*	Caspase-7
	Caspase-12	

\* nur humane Caspase-10

**Abbildung 003.**  
Einteilung der Caspasen nach Funktionalität.

### Caspasensubstrate

Caspasen haben hohe Substratspezifität und unter diesen Substraten finden sich Proteine zahlreicher Funktionen: Regulatoren der Apoptose (Beispiele: Bid, Bcl-2, Caspasen), Interleukine als Entzündungsmediatoren, Proteinkinasen bzw. andere Signaltransduktions-Regulatoren, Strukturproteine (wie Lamin, Aktin, Cytokeratin), Reparatur-Proteine, Regulatoren des Zellzyklus sowie Faktoren, die in Humanpathologien eine Rolle spielen wie etwa Huntingtin (Degterev et al, 2003).

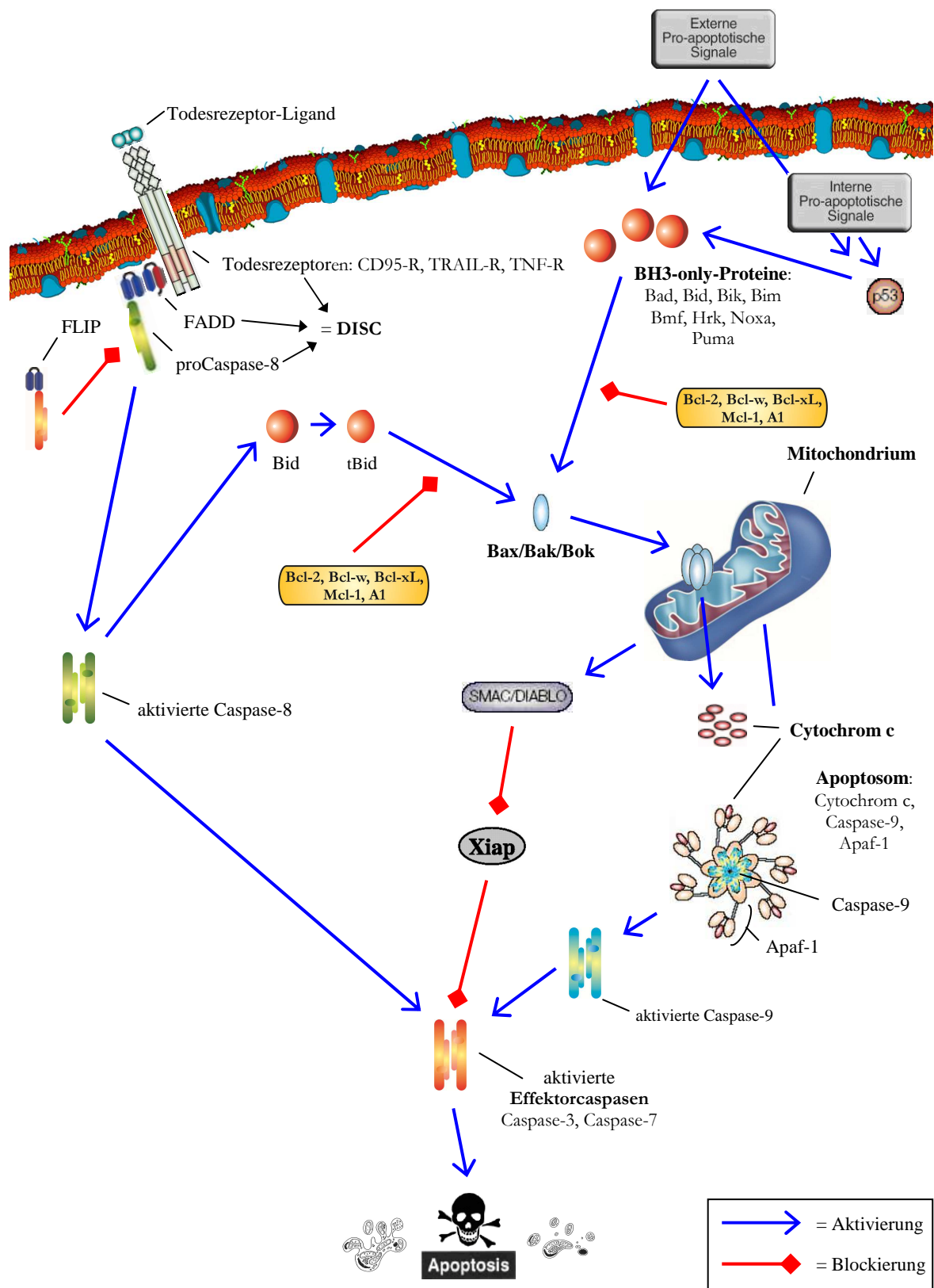
### Caspasenaktivierung

Intrazelluläre Stimuli aktivieren Proteine der Bcl-2-Familie, was zu Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytosol führt. Daraufhin bildet sich dort das Apoptosom (siehe Abb. 004), Caspase-9 wird aktiviert, aktiviert ihrerseits Caspase-3 und weitere Effektorcaspasen der gemeinsamen Endstrecke von intrinsischem und extrinsischem Signalweg.

Anders funktioniert der Mechanismus bei der extrazellulären Stimulation von Todesrezeptoren. Hier werden Caspase-8 und in Folge Caspase-3 aktiviert, darauf folgt dann die gemeinsame Endstrecke. Caspase-8 aktiviert zudem das BH3-Protein Bid, über welches der mitochondriale Signalweg in Gang gesetzt wird.

### Regulation der Caspasenaktivität

X-linked *IAP* (XIAP) als best-untersuchtes IAP-Familienmitglied inhibiert direkt die enzymatische Aktivität der Caspasen -3, -7 und -9, also Caspasen in beiden, dem extrinsischen und intrinsischen Signalweg (Scott et al, 2005).



**Abbildung 004.**

Signalwege der Apoptose-Aktivierung, schematische Darstellung.

Unterschieden wird die Induktion von Zelltod über Todesrezeptoren und über BH3-only-Proteine.

Beide enden in einer gemeinsamen Endstrecke mit der Aktivierung von Effektorcaspasen.

### 1.11. Todesrezeptoren

Todesrezeptoren sind der direkteste Weg zu Zelltod, im schnellsten Fall sind nur Ligand, Rezeptor und zwei Caspasen (Caspase-8 und Caspase-3) involviert.

Bislang sind sechs Todesrezeptoren bekannt (TNF-R1, CD95, DR3, TRAIL-R1, TRAIL-R2 und DR6) sowie zwei weitere, deren Taxonomie noch unklar ist: *ectodysplasin-Apoptose-Rezeptor*, EDA-R und *nerve growth factor receptor*, NGF-R (Fas et al, 2006).

Todesrezeptoren scheinen neben dem Caspase-abhängigen Signalweg jedoch auch Zelltod, dann vermutlich nekrotisch, ohne Caspasen-Involvierung vermitteln zu können, in Abhängigkeit von dem *receptor-interacting protein* RIP (Holler et al, 2000).

Die Aktivierung von Todesrezeptoren geschieht durch Liganden, welche Mitglieder der TNF-Superfamilie sind (Vincenz, 2001). Sie bilden transmembrane, trimere Komplexe (Ausnahme: Lymphotoxin- $\alpha$ , LT- $\alpha$ ), werden jedoch zudem in löslicher Form beschrieben (Cascino et al, 1995; Tanaka et al, 1995). Für jeden Todesrezeptor außer DR6 ist zumindest ein Ligand bekannt, für einige mehrere.

### 1.12. Mitochondriale Signaltransduktion

Beim Auftreten von Apoptose läuft wohl am häufigsten der intrinsische, mitochondriale, Bcl-2-regulierte Signalweg ab. Die Mitglieder der Bcl-2-Familie werden durch entsprechende Stimuli aktiviert (BH-3-only Proteine), welche wiederum Bax/Bak aktivieren, reguliert von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen. Dies resultiert in der Freisetzung des Proteins Cytochrom c aus den Mitochondrien, der Bildung des Apoptosoms und der Aktivierung der Effektorcaspasen .

Die verschiedenen Mitglieder-Gruppen der Bcl-2-Familie und deren Funktion werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

### 1.13. Bcl-2 Proteine

Diese Proteingruppe hat proapoptotische und antiapoptotische Mitglieder.

Die Familienzugehörigkeit zu „Bcl-2-like“ basiert auf der Expression von mindestens einer von maximal vier Bcl-2 homologen (BH)-Domänen (siehe Abb. 005). So besitzt Bcl-2 alle vier BH-Domänen (BH1-4), ebenso wie auch Bcl-xL und Bcl-w. Mit Mcl-1 und A1 sind diese fünf in der Gruppe der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine anzusiedeln (Danial & Korsmeyer, 2004).

Die Gruppe der proapoptotischen Familienmitglieder unterteilt sich weiter in zwei Subgruppen, die Multidomain-*Effektoren* sowie die BH3-only-*Initiatoren*.

Der Terminus „Multidomain“ erklärt sich dadurch, das, namentlich bei den beiden Proteinen Bax und Bak, mehrere BH-Domains (BH1-3) exprimiert sind. „Effektoren“ heißen sie, da

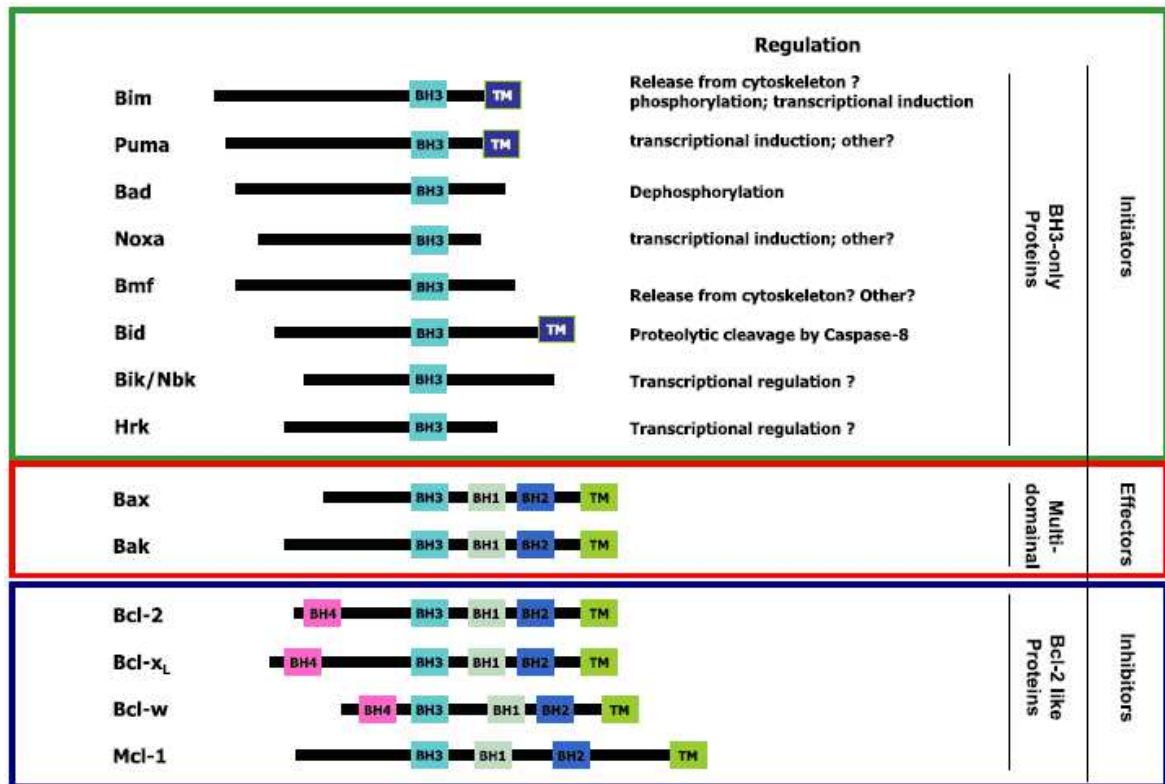


Abbildung 005.

Struktur und Funktion der Bcl-2-Protein-Familie.

Die gezeigten Proteine sind in drei funktionelle Gruppen gegliedert, wobei die Bcl-2-homologen Domänen (BH) markiert sind.

Bei den Transmembrandomänen der BH3-only-Proteine sind die Domänen gezeigt, die nachgewiesen oder potentiell für die Verankerung der Proteine in der äußeren Mitochondrienmembran verantwortlich sind.

(Abbildung Dr. Arnim Weber)

beide, in aktivierter Form, die wohl einzig notwendigen Proteine (Kuwana et al, 2002) zum Auslösen von Cytochrom c-Freisetzung sind.

„BH3-only-Proteine“ bezeichnet eine heterologe Gruppe von Proteinen, die sich in nur einer BH-Domäne (BH3) gleichen. Die Bezeichnung „Initiatoren“ bezieht sich auf deren Funktion: durch einen Apoptose-Stimulus aktiviert, aktivieren sie ihrerseits Bax und/oder Bak (Häcker & Weber, 2007).

#### 1.14. Antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie

Diese Gruppe umfasst Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 sowie A1/Bfl1.

Über eine hydrophobe Grube auf der Proteinoberfläche können antiapoptotische Bcl-2-Proteine BH3-Domänen von BH3-Proteinen aufnehmen (Muchmore et al, 1996). Verschiedene BH3-Proteine haben unterschiedliche Affinitäten zu den einzelnen Bcl-2-Proteinen, in den meisten Fällen ist eine Interaktion mehrerer Partner gleichzeitig notwendig, um effektiv Apoptose auszulösen (siehe unten).

### 1.15. Proapoptotische BH3-only Proteine

Diese heterologen, nur durch die kurze gemeinsame BH3-Domäne strukturell verwandten Proteine (Huang & Strasser, 2000) initiieren den intrinsischen (mitochondrialen) Signalweg. Bei Säugern sind zumindest acht dieser Moleküle bekannt.

Verschiedene Reize sind Auslöser für die Aktivierung unterschiedlicher BH3-Proteine (siehe Abb. 002), wobei ein Reiz durchaus überlappend mehrere Typen zugleich aktivieren kann (Strasser, 2005).

#### **Funktion**

Über die BH3-Domäne binden BH3-only-Proteine an einen hydrophoben Bereich der Oberfläche weiterer (antiapoptotischer) Mitglieder der Bcl-2-Familie und agieren so als Apoptose-Initiatoren. Eine Funktion, die sie durch Mutationen in der BH3-Sequenz jedoch verlieren können (Chittenden et al, 1995; Sattler et al, 1997).

Von hier an werden derzeit zwei Modelle postuliert (Häcker & Weber, 2007):

Im *Direct Binding Model* wird davon ausgegangen, dass einerseits die BH3-Moleküle Bim und tBid (nur diese sind dazu fähig) direkt an Bax binden und es aktivieren (Letai et al, 2002). Andererseits sorgen weitere BH3-Mitglieder durch Blockierung von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen (Moreau et al, 2003) dafür, dass diese Bim/tBid nicht neutralisieren. Man spricht daher über Bim, tBid (und Puma, siehe unten) als Aktivatoren, über Bad und Noxa als Sensitizer (Fletcher & Huang, 2006). Da dieses Modell bisher nur in Versuchen an zellfreien Systemen bestätigt wurde (Kuwana et al, 2005) und Untersuchungen an Bim/Puma doppeldefizienten-T-Zellen (You et al, 2006) Puma neben Bim und tBid ebenso für eine direkte Bax-Aktivierung vorschlagen, bleibt zu klären, ob dieses Modell nicht zumindest modifiziert werden sollte (Häcker & Weber, 2007).

Das *Displacement Model* geht von der Beobachtung aus, dass nicht alle BH3-Proteine die gleiche Affinität zu allen antiapoptotischen Bcl-2-like-Proteinen haben. So scheinen Bim und Puma die einzigen zu sein, die gleich affin an allen fünf Bcl-2-ähnlichen Proteinen binden. Bad und Bmf binden stark an Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w, schwach an A1 und nicht an Mcl-1. Bik, Hrk und Bid binden an Bcl-xL, Bcl-w und A1 an Bcl-2 oder M1. Noxa bindet nur Mcl-1 und A1 (Chen et al, 2005).

Daraus ergeben sich folgende Schlussfolgerungen: Zunächst gibt es je nach Affinität für antiapoptotische Bcl-2-Proteine unterschiedlich „starke“ BH3-only-Proteine, mit Puma und Bim die potentesten. Je selektiver diese sind, desto schwächer ist die Fähigkeit zur alleinigen Apoptose-Induktion. Dementsprechend bedeutet etwa nur gleichzeitige Induktion von Noxa und Bad (und damit gleichzeitiges „Besetzen“ aller fünf Bcl-2-ähnlichen Proteine) einen ausreichend starken Apoptose-Reiz (Chen et al, 2005). Damit wird im Displacement Modell von einer komplementären Wirkung der BH3-Proteine ausgegangen und davon, dass

Apoptose nur dann potent ablaufen kann, wenn alle Typen antiapoptotischer Bcl-2-Proteine der Zelle besetzt sind (Willis & Adams, 2005). Dies scheint ebenso für Bak weiter downstream zu gelten: Nur das Besetzen der beiden Bak-Gegenspieler Mcl-1 und Bcl-xL durch entsprechend bindungsfähige BH3-only-Proteine führt zu Apoptose-Induktion (Willis et al, 2005). Am Displacement Modell ist kritisch anzumerken, dass es durch die Arbeit mit BH3-Peptiden erstellt wurde und nicht an intakten Proteinen (Häcker & Weber, 2007).

Zusammenfassend schlagen beide Modelle jedoch funktionell unterschiedliche BH3-Gruppen vor: Die, die Apoptose direkt auslösen können, und deren Helfer.

### **Bad**

Bad (*Bcl-2-antagonist of cell death*) bildet selektiv Dimere mit Bcl-xL und Bcl-2, wobei die stärkere Assoziation mit Bcl-xL Bax freisetzt und Apoptose induziert (Yang et al, 1995). Cytokinentzug ist ein Signal für die Dephosphorylierung und somit ein Apoptose-Stimulus (Zha et al, 1996).

Bad-dn-Mäuse werden zwar meist gesund geboren, mit zunehmendem Lebensalter entwickeln diese jedoch im Vergleich zu gesunden Tieren fünf Mal häufiger lymphogene Tumoren (Ranger et al, 2003). Zudem scheinen humane Kolon-Karzinome teilweise auf mutiertes Bad zurückzuführen zu sein (Lee et al, 2004).

### **Bid**

Bid (*Bcl-2-homology domain 3-interacting-domain death agonist*) kann über seine BH3-Domäne an Bax sowie Bcl-2 binden und dadurch Apoptose auslösen (Wang et al, 1996).

Bid hat eine Sonderstellung unter den BH3-Proteinen, indem es den extrinsischen mit dem intrinsischen Signalweg verbindet: Bid kann als Verstärker des Todesrezeptor-induzierten Zelltodes verstanden werden, da durch seine Spaltung neben dem direkten Todesrezeptor-Weg auch der mitochondriale Signalweg aktiviert wird durch Caspase-8-abhängige Bid-Spaltung (Strasser, 2005).

Cytosolisches Bid ist ein potentes Substrat von Caspase-8 im DISC-Komplex des CD95-Todesrezeptor-Signalweges und nach Abspaltung wirkt das BH3-tragende C-terminale Bid-Fragment (jetzt tBid, *truncated Bid*) tödlich (Luo et al, 1998). Es transloziert an die äußere mitochondriale Membran, wo es verstärkt an antiapoptotische Bcl-2-Proteine bindet (Li et al, 1998).

Bid-dn-Mäuse entwickeln spontan myeloproliferative Erkrankungen, welche später einen leukämischen Verlauf nehmen (Zinkel et al, 2003).

### **Bik (auch Blk bzw. Nbk-natural born killer)**

Bik (*Bcl-2-interacting killer*) bindet Bcl-2 und Bcl-xL (jedoch nicht Bax) und induziert nach Überexpression Apoptose (Boyd et al, 1995). Es ist dabei in seiner proapoptotischen Funktion

von Bax abhängig. In Bax-dn-Zellen reicht eine Bik-Aktivierung alleine nicht aus, um Apoptose zu induzieren (Gillissen et al, 2003). Bik-Expression zeigt sich in einer Vielzahl von Zellen des hämatopoetischen Systems sowie arteriellen Endothelien, jedoch weisen Zellen von Bik-dn-Mäusen weder erhöhte Apoptose-Resistenz gegenüber cytotoxischen Stimuli, noch andere Anzeichen von Pathologien auf (Coultas et al, 2004). Demnach muss von einer sich gegenseitig verstärkenden Funktion bei BH3-Proteinen ausgegangen werden, wie bei der sich ergänzenden Funktion von Bik und Bim bei der Spermatogenese: Nur bei Verlust von beiden Proteinen, nicht aber einem alleine, resultiert Infertilität (Coultas et al, 2005).

### **Bim/Bod**

Bim (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*) bzw. Bod (*Bcl-2-related ovarian death gene*), tritt in den drei Isoformen BimEL(extra long), BimL(long) und BimS(short) auf (bedingt durch drei Varianten der cDNA-Coding-Region), wobei BimS cytosolisch am potentesten Apoptose induziert (O'Connor et al, 1998).

Reize wie Cytokin-Entzug (Dijkers et al, 2000), Taxol (Mikrotubuli-Störung)- oder Ionomycin-Behandlung,  $Ca^{++}$ -Flux oder UV-Strahlung (Puthalakath et al, 1999), jedoch nicht Behandlung mit PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate), Etoposide oder Fas-Ligand (Bouillet et al, 1999) induzieren Bim-Aktivierung.

Versuche mit Bim-dn-Mäusen zeigen eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung auf: Zwar kommen Bim-dn-Mäuse gesund und fruchtbar zur Welt, es werden aber weniger als halb so viele Nachkommen im Vergleich zu Bim<sup>+/+</sup>-Tieren geboren. Dazu entwickeln die Tiere mit zunehmenden Alter Splenomegalien, Lymphadenopathien und Autoimmunerkrankungen (der Niere oder des kardiovaskulären Systems), welche dann meist auch Todesursache sind (Bouillet et al, 1999).

Weitere wichtige Funktionen sind: Reduktion der aktivierten T-Zellen nach erfolgter Immunantwort (Pellegrini et al, 2003), hier scheint der NF $\kappa$ B-Regulator Bcl-3 Bim-abhängig antiapoptotisch zu wirken (Bauer et al, 2006), sowie Initiierung von Phagozytose-induzierter Apoptose: in Bim-dn-Makrophagen ist diese stark reduziert (Kirschnek et al, 2005).

Bim ist über seine BH3-Domäne (wie auch Bid) fähig, sowohl inhibitorisch an proapoptotische Bcl-2-Proteine zu binden, sowie an den mitochondrialen Proteinen Bax/Bak (bevorzugt Bax) Homooligomerisation und folgend Cytochrom c-Freisetzung zu initiieren (Letai et al, 2002).

Die Regulierung von sowohl Bim als auch Puma durch FOXO3a, zusammen mit den Beobachtungen, dass aktivierte T-Zellen von Bim/Puma-Doppel-dn-Mäusen weitaus besseres Überleben zeigen als T-Zellen einfacher Bim- oder Puma-dn-Zellen (You et al, 2006), schlagen ein gemeinsames extrinsisches Signal bzw. einen gemeinsamen Aktivierungsmechanismus vor (Häcker et al, 2006).

### **Bmf**

Bmf (*Bcl-2 modifying factor*) ist wie Bim am Cytoskelett gebunden (bevorzugt an DLC2 (*dynein light chain 2*) des Myosin-V-Motor-Komplexes), löst sich nach Aktivierung durch Stimuli wie Anoikis (Verlust der Zelladhäsion) von dort und bindet proapoptotische Bcl-2-Proteine, wodurch es Apoptose induziert (Puthalakath et al, 2001).

### **Hrk/DP5**

Hrk (*Hara-kiri*, umgangssprachlich für Seppuku, eine ritualisierte Art der Selbsttötung in Japan) ist ein 92 Aminosäuren großes Polypeptid, welches nach Nerve-Growth-Factor (NGF)-Entzug oder -Überexpression in Neuronen Apoptose auslöst (Imaizumi et al, 1997). Es bindet, abhängig von seiner intakten BH3-Domäne, an Bcl-2 und Bcl-xL, jedoch nicht an Bax oder Bak (Inohara et al, 1997), wird transkriptionell reguliert (Willis & Adams, 2005) und ist zum Teil vom JNK-Signalweg (siehe später) abhängig (Harris & Johnson, 2001). Hrk-dn-Mäuse werden gesund geboren und zeigen keine Auffälligkeiten (Imaizumi et al, 2004).

### **Noxa**

Noxa (lat. für „Schaden“) ist ein im Menschen ein 54 Aminosäuren großes Protein. Die Promotor-Region von Noxa beinhaltet eine funktionelle p53-Bindestelle, welche nach p53-Induktion aktiv wird, womit Noxa (wie auch Puma) durch p53 transkriptionell reguliert ist (Oda et al, 2000). Bestimmte Zelltypen mit bereits hoch exprimiertem Noxa ohne auslösenden Reiz werden als Teil dieser Arbeit später beschrieben.

Noxa-dn-Mäuse entwickeln sich normal und weisen keine stärkere Tendenz auf Tumore zu entwickeln (Villunger et al, 2003). Ebenso zeigen sich die meisten Zelltypen aus Noxa-dn-Mäusen normal sensitiv auf DNA-Schäden durch Chemotherapeutika oder  $\gamma$ -Strahlung, trotz erhöhter Noxa-mRNA-Level (Oda et al, 2000).

Zusammenfassend spielt Noxa (anders als Puma) bei durch DNA-Schäden induzierter Apoptose eine eher eingeschränkte Rolle (Erlacher et al, 2005; Shibue et al, 2003; Villunger et al, 2003).

Die subzelluläre Lage von Noxa ändert sich nach Aktivierung, es transloziert an die Mitochondrien, um dort mit antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen zu interagieren (Oda et al, 2000).

### **Puma (=bbc3)**

P53 kann durch viele Arten von Zellstress aktiviert werden: DNA-Schäden, Aktivierung von Onkogenen, Hypoxie, Verlust von Zell-Zell-Kontakt uvm. (Lohrum & Vousden, 1999). Eines der Ziel-Gene für p53 ist Puma (*p53 upregulated modulator of apoptosis*), welches für Puma- $\alpha$  und Puma- $\beta$  kodiert. Dies sind BH3-Domänen enthaltende Proteine, die über den



intrinsischen Signalweg Apoptose induzieren. Puma ist demnach transkriptionell reguliert (Nakano & Vousden, 2001).

Puma-Defizienz führt zu Apoptose-Resistenz durch DNA-Schäden ( $\gamma$ -Strahlung) oder p53-unabhängige Apoptose-Stimuli wie Glukokortikoide, Cytokin-Entzug, Staurosporin (potenter Pankinase-Inhibitor) oder den Phorbol-Esther PMA. Puma-dn-Mäuse jedoch scheinen weder anfälliger für Tumorentwicklung zu sein, noch weisen sie offensichtliche Entwicklungsstörungen auf (Jeffers et al, 2003).

### 1.16. Proapoptotische Bax/Bak-Gruppe

Diese Gruppe, deren Mitglieder mehrere BH-Domänen („multi-domain“; BH1, BH2, BH3) besitzen, umfasst neben Bax (*Bcl-2 associated X-protein*) und Bak (*Bcl-2 antagonist/killer*) auch Bok, welches jedoch unregelmäßig exprimiert wird und wenig untersucht ist (Häcker & Weber, 2007). Bak alleine scheint für Fortpflanzung und Entwicklung nicht notwendig zu sein, bei Bak-dn-Mäusen ist es, wenn auch nur in Kombination mit weiteren Proteinen, ein Apoptose-Regulator (Lindsten et al, 2000). Bax-defiziente Mäuse hingegen zeigen je nach Gewebetyp hyper- oder hypoplastische Phänomene, sowie starke Beeinträchtigungen der Keimzellentwicklung (Knudson et al, 1995). Fehlen beide Gene, erreicht nur ein kleiner Teil der Tiere das Erwachsenenalter und weist dabei multiple Defekte der Homöostase von Zellen des zentralen Nervensystems und des hämatopoetischen Systems sowie Defekte der Extremitäten und Reproduktionsorgane auf (Lindsten et al, 2000). Dies deutet auf ein Überlappen der Funktionen von Bax und Bak bei der Apoptose-Regulation von Säugern hin, insbesondere bei Embryonalentwicklung und Gewebshomöostase. Untersuchungen von dominant-negativen Zellen zeigen, dass das Fehlen von beiden Proteinen komplett resistent gegenüber tBid-induzierter Cytochrom c-Freisetzung und folgender Apoptose macht (Wei et al, 2001). Ebenso führt eine Unterdrückung von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen in Abwesenheit von Bax/Bak nicht zu Zelltod (Zong et al, 2001).

Für die korrekte Interaktion mit weiteren Mitgliedern der Bcl-2-Familie spielt die BH3-Sequenz von Bak und Bax eine entscheidende Rolle (Chittenden et al, 1995; Wang et al, 1998). Zumindest einige BH3-Proteine (Bid, Bim) scheinen so Bax direkt aktivieren zu können (Letai et al, 2002). Nach Aktivierung erfährt das inaktiv monomere, meist cytosolische Bax eine Konformationsänderung (Exposition der N-terminalen Domäne) und transloziert in die äußere Mitochondrienmembran, gefolgt von Cytochrom c-Freisetzung (Desagher et al, 1999; Eskes et al, 2000).

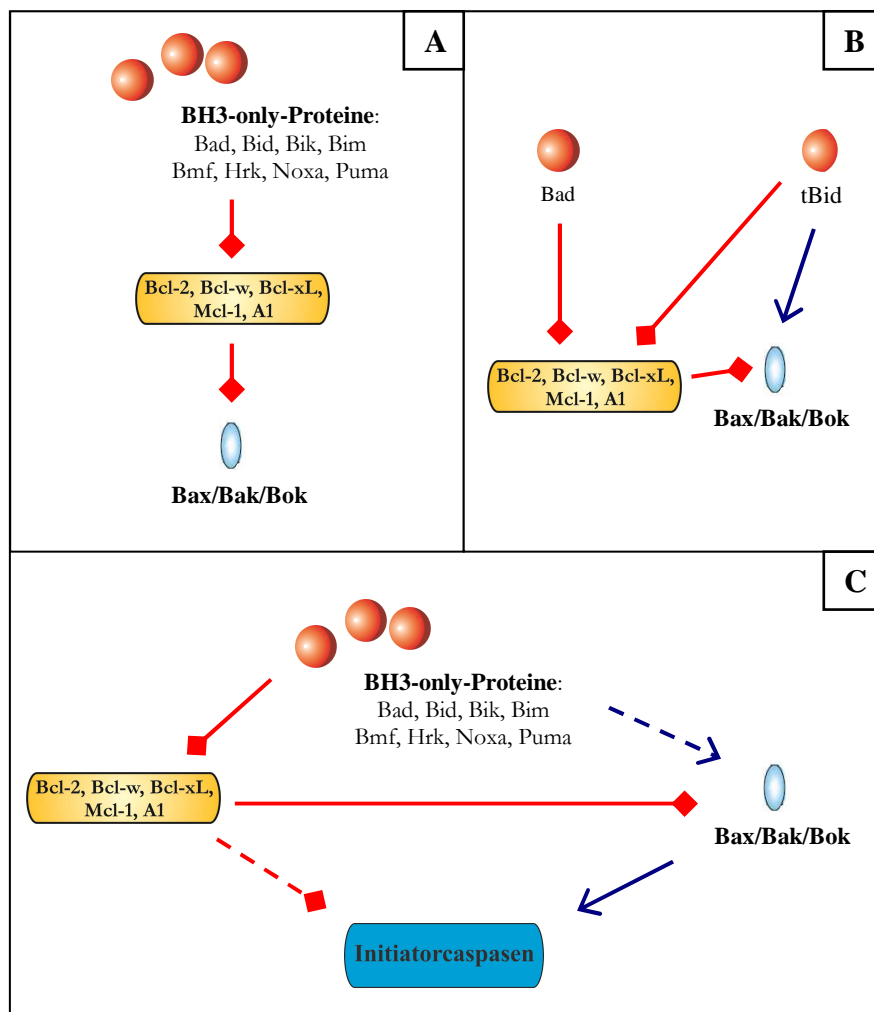
Bak hingegen scheint inaktiv an der Mitochondrienmembran zu sitzen und nach Stimulation ebenfalls eine Konformationsänderung (u.a. Homooligomerisation und Exposition der N-terminalen Domäne) zu erfahren (Griffiths et al, 1999; Wei et al, 2000). Daraufhin wird Cytochrom c in das Cytosol freigesetzt.

## 1.17. Interaktion von pro- und antiapoptotischen Proteinen

Wie genau die Mitglieder der Bcl-2-Familie miteinander interagieren ist unklar.

Als relativ sicher gilt: BH3-Proteine und antiapoptotische Bcl-2-Proteine können einander blockieren, Bim, Bid und Puma können Bax/Bak und damit Cytochrom c-Freisetzung direkt initiieren, Bad und Bik indirekt durch Blockierung von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen (Letai et al, 2002; Willis & Adams, 2005). Eine Interaktion von Bak mit Bcl-2 (Cheng et al, 2001) und Bcl-xL (Griffiths et al, 1999) scheint ebenfalls gesichert.

Zusammenfassend sind Modelle wie in Abb. 006 vorgeschlagen denkbar.



**Abbildung 006.**

Verschiedene Modelle der Interaktion zwischen den Mitgliedern Bcl-2-Protein-Familie.

A. BH3-only-Proteine wirken hemmend auf die Pro-Survival-Bcl-2-Gruppe, welche die Aktivierung von Bax/Bak/Bok hemmt.

B. Einige BH3-only-Proteine (z.B. Bad) interagieren nur mit der Pro-Survival-Bcl-2-Gruppe, andere (z.B. tBid) können beide der beiden anderen Gruppen der Bcl-2-Familie beeinflussen.

C. Zusammenfassung der bekannten Interaktionsmöglichkeiten aller drei Hauptgruppen der Bcl-2-Protein-Familie.

Abbildung modifiziert nach (Adams, 2003).

### 1.18. Cytochrom c und die Bildung des Apoptosoms

Cytochrom c ist zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran lokalisiert und erfüllt die Funktion eines Elektronenshuttles der Atmungskette (Gonzales & Neupert, 1990). Durch den als MOMP (*mitochondrial outer membrane permeabilisation*) bezeichneten Prozess werden nach Stimulierung verschiedene Proteine ins Cytosol freigesetzt (Ekert & Vaux, 2005), von denen Cytochrom c die entscheidende Rolle spielt. Es bindet an das cytosolische Adapterprotein Apaf-1, woraufhin energieabhängig (dATP) die Caspasen -9 und -3 aktiviert werden (Zou et al, 1997). Apaf-1 ändert in Anwesenheit von dATP/ATP seine Konformation und bildet mit weiteren Cytochrom c/Apaf-1-Dimeren einen Komplex namens Apoptosom (Acehan et al, 2002). Heptamerer Apaf-1 bindet und aktiviert über seine *caspase-recruitment-domain* (CARD) Procaspase-9, welche als aktive Caspase-9 (weiterhin an die CARD-site des Apoptosoms gebunden) ihrerseits Caspase-3 aktiviert (Li et al, 1997).

Der genaue Mechanismus der Cytochrom c-Freisetzung ist ungeklärt. Ob über ladungsabhängige Anionenkanäle (Shimizu et al, 1999), von Bax-Molekülen gebildete Poren (Saito et al, 2000), membran-destabilisierende Wirkung von Bax (Basanez et al, 1999) oder auf andere Weise wird die Zukunft zeigen.

### 1.19. Downstream Caspase-3

Mit Caspase-3 beginnt die gemeinsame Endstrecke von intrinsischem und extrinsischem Signalweg. Effektorcaspasen spalten ihre zahlreichen zellulären Substrate (Timmer & Salvesen, 2007), von denen etliche in DNA-Reparatur, RNA-Spaltung oder Gerüstintegrität der Zelle verwickelt sind (Salvesen & Dixit, 1997). Sie aktivieren dazu weitere Caspasen oder Enzyme, die ihrerseits katalytisch (indirekt) oder direkt an der Zelldegradierung beteiligt sind, und sorgen so für die typischen morphologischen und biochemischen Veränderungen (Wolf & Green, 1999).

Caspase-3 hat neben diesen Funktionen auch die Kapazität, Bid (weniger stark als Caspase-8) und Bcl-xL zu spalten, sowie unterstützend bei der Cytochrom c-Freisetzung zu wirken, vermutlich im Sinne positiver Rückkopplung (Bossy-Wetzel & Green, 1999).

Von den beiden anderen Effektorcaspasen Caspase-6 und Caspase-7 hat trotz starker struktureller Ähnlichkeiten beider, hauptsächlich Caspase-7 ähnliche Substrat-Spezifität wie Caspase-3 (Fuentes-Prior & Salvesen, 2004). Caspase-6 hingegen scheint nicht wesentlich in die Apoptose-Ausführung involviert zu sein. Im Gegensatz zu Caspase-3 bzw. -7-ko-Mäusen entwickeln sich Caspase-6-ko-Tiere normal (Zheng et al, 1999). Caspase-6-ko-Zellen von Lymphomen bei Hühnern bleiben nach Stimulierung durch unterschiedlichste Chemotherapeutika sensitiv für Zelltod (Loefering et al, 2006).

Dennoch konnte für Caspase-6 eine Rolle als Effektor aufgezeigt werden: Lamin A (ein Filamentprotein und Hauptkomponente der nukleären Lamina) muss von Caspase-6 gespalten

werden, um den Prozess der Chromatin-Kondensation und Kernschrumpfung bei der Apoptose-Exekution zu gewährleisten (Ruchaud et al, 2002).

### 1.20. Toll-like-Rezeptoren

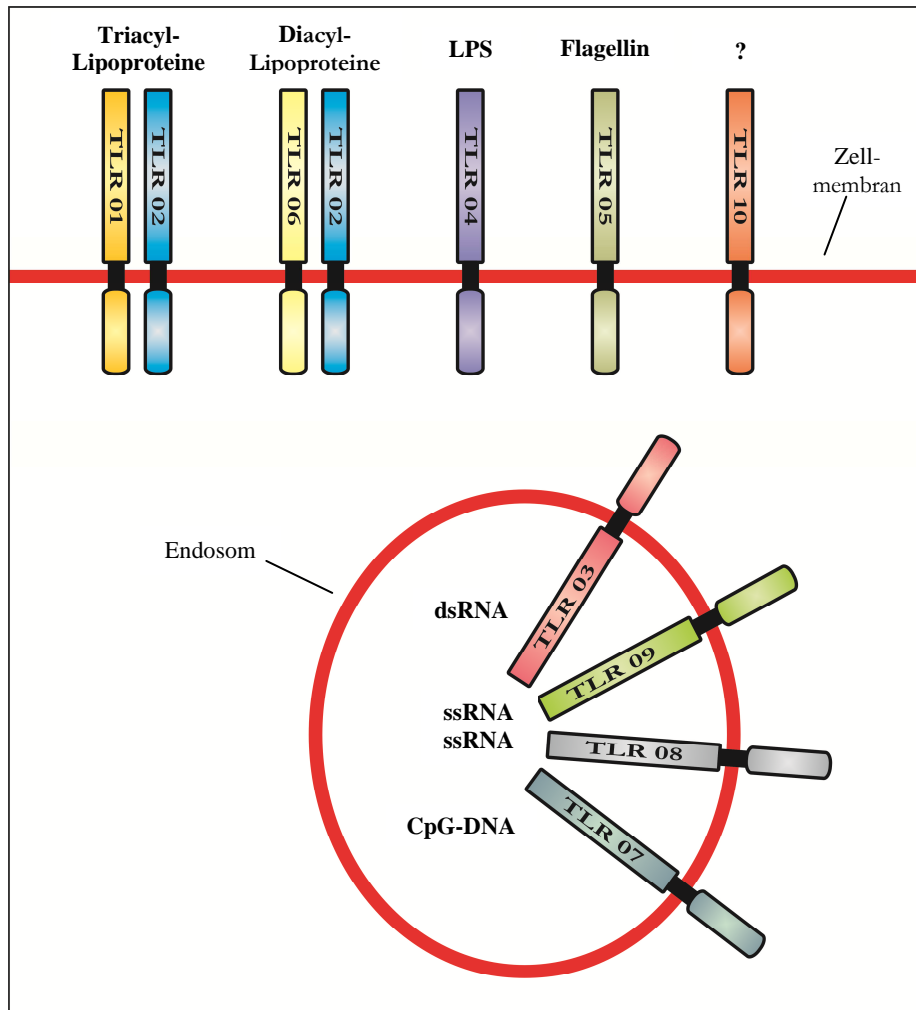
Der unspezifische, angeborene Teil des Immunsystems stellt die erste Barriere für mikrobielle Pathogene dar. Um diese zu erkennen, exprimieren Wirtszellen Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs), welche bestimmte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) der Pathogene binden und dadurch aktiviert werden. Es folgt die Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Cytokine, Chemokine, Interferone) und damit eine Immunantwort. PAMPs können eine Vielzahl von Strukturen sein, Lipoproteine oder Proteine ebenso wie DNA bzw. RNA oder Teile davon (Akira et al, 2006). In Säugern stellt die Familie der *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs) eine zentrale Gruppe der PRRs dar, fähig, eine unspezifische Immunantwort auszulösen und darauf folgend den spezifischen Teil des Immunsystems zu aktivieren (Schnare et al, 2001).

Das Toll-Gen kontrolliert bei Taufliegen (*Drosophila*) die korrekte Entwicklung lateraler und ventraler Strukturen (Anderson et al, 1985), wurde aber später auch mit Reaktionen des Immunsystems assoziiert (Lemaitre et al, 1996; Rosetto et al, 1995). *Drosophila*-Toll zeigt in Taufliegen die Fähigkeit, über NF $\kappa$ B-Induktion Cytokine und kostimulatorische Substanzen freizusetzen (Medzhitov et al, 1997). Die Ähnlichkeit zwischen dem *Drosophila*-Toll-dorsal-Signalweg und dem humanen IL-1R-NF $\kappa$ B-Signalweg (Belvin & Anderson, 1996; Wasserman, 1993) führte schließlich zu der Entdeckung von humanen Rezeptoren, welche strukturelle Analogien zu den *Drosophila*-Toll-Rezeptoren aufweisen und somit als Toll-like-Rezeptoren (TLRs) bezeichnet werden (Rock et al, 1998).

TLRs sind als Glykoproteine in die Zellmembran integriert. Sie besitzen extrazelluläre *leucine-rich-repeat* (LRR)-Domänen unterschiedlicher Anzahl und cytosolisch einen dem Interleukin-1-Rezeptor ähnlichen Abschnitt, der die Bezeichnung *Toll/IL-1R* homology domain (TIR) trägt (Akira et al, 2006; Bowie & O'Neill, 2000).

Derzeit sind 11 humane (TLR1-11) und 13 murine TLRs bekannt (Kawai & Akira, 2007), die in einer Vielzahl von Zellen und Geweben exprimiert werden (Zarembek & Godowski, 2002), hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems (Makrophagen, Dendritische Zellen (DCs), B-Zellen). Einige TLRs werden hauptsächlich extrazellulär, auf der Zelloberfläche (TLR1, 2, 4, 5, 6), andere vorwiegend auf intrazellulären Kompartimenten (TLR3, 7, 8, 9) exprimiert (Akira et al, 2006).

Eine Übersicht der Toll-like-Rezeptoren, deren Liganden und Lage stellt Abb. 007 dar. Eine ausführliche Erläuterung zur Funktion siehe in (Akira et al., 2006).

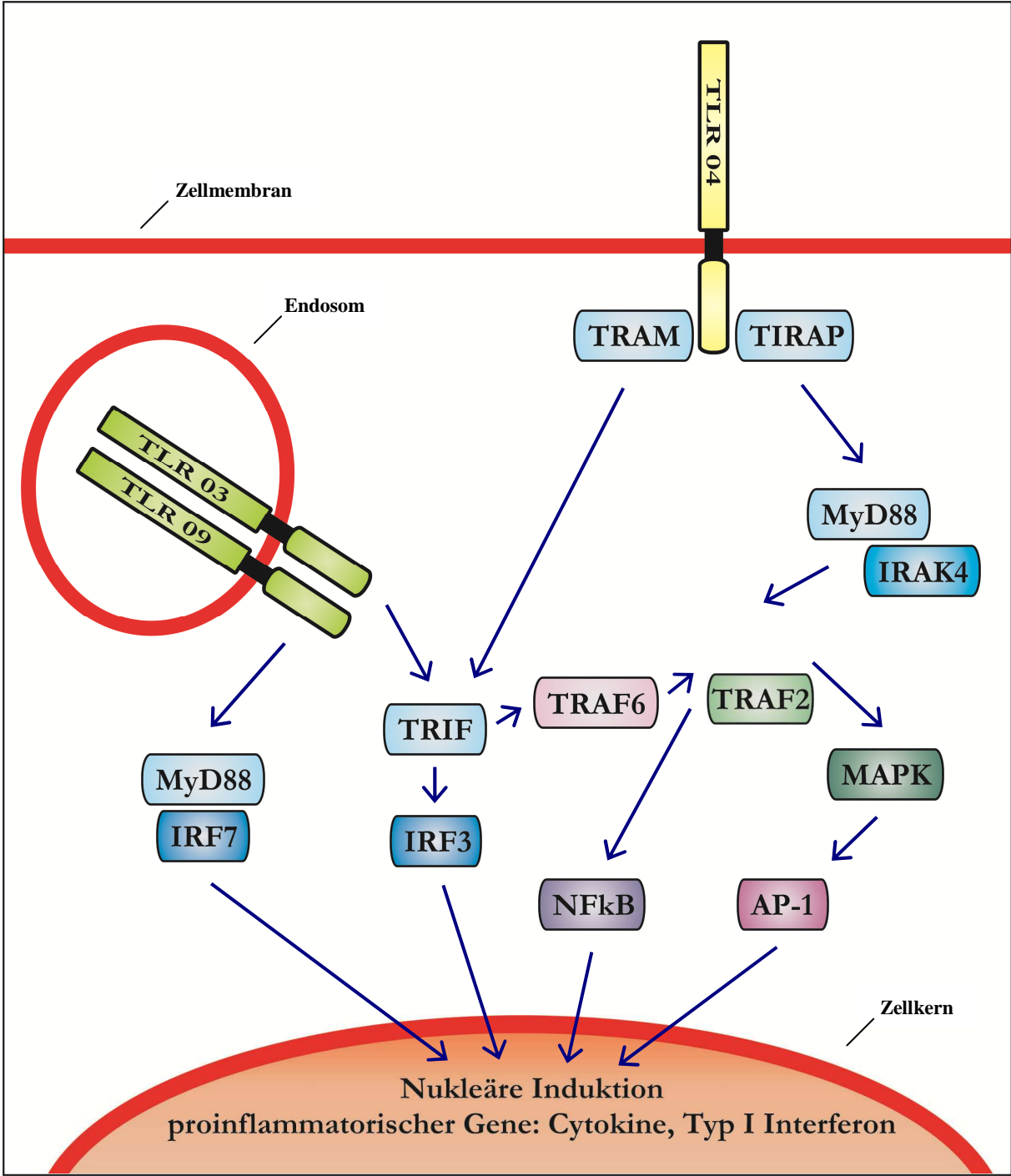


**Abbildung 007.**  
Toll-like-Rezeptoren, deren Lage und zugehörige Liganden.

### 1.21. TLR-Signalwege

Werden PAMPs von TLRs erkannt, stimuliert dieses Signal die Rekrutierung von verschiedenen TIR-Domänen-tragenden Adapterproteinen. Die wichtigsten sind MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*), TIRAP (*TIR-domain-containing adaptor protein*; auch *MyD88-adaptor-like protein*, MAL), TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$* ; auch *TIR-domain-containing molecule 1*, TICAM1) und TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*, auch *TIR-domain-containing molecule 2*, TICAM2) (Akira & Takeda, 2004).

Alle TLRs außer TLR3 aktivieren MyD88, TLR1, 2, 4 und 6 über TIRAP, TLR4 auch alternativ den MyD88-unabhängigen Signalweg über TRAM und TRIF. TLR3 und TLR4 aktivieren den MyD88-unabhängigen Signalweg über TRIF (Kawai & Akira, 2007). Für eine Zusammenfassung von bekannten Toll-like-Rezeptor-Signalwegen siehe Abb. 008.



**Abbildung 008.**  
 Modelle bekannter Toll-like-Rezeptor-Signalwege. Beispielhaft gezeigt an TLR3, TLR4 und TLR7.  
 Inkomplette Darstellung. Eine ausführliche Erläuterung der Abläufe siehe (Kawai & Akira, 2007).

## 1.22. Toll-like-Rezeptoren und Apoptose

Infektionen können Induktoren für Apoptose sein und TLRs erkennen Erreger oder deren Komponenten. Einen Zusammenhang zwischen Apoptose und TLRs herauszuarbeiten ist Teil dieser Arbeit.

Schon länger bekannt ist LPS (*Lipopolysaccharid*, TLR4-Ligand) als Apoptose-Induktor in Makrophagen (Kim et al, 2001). Zudem zeigt der Signalweg über TLR4 Apoptose-Induktion in *Yersinia*-infizierten Makrophagen (Zhang & Bliska, 2003), möglicherweise unter Beteiligung des *Fas-associated death domain* FADD (Haase et al, 2003). Analog dazu scheint ebenfalls über TLR3- und FADD-Aktivierung TRIF, nicht jedoch MyD88 caspasenabhängigen Zelltod auszulösen (Ruckdeschel et al, 2004).

Ein weiteres, MyD88-unabhängiges Modell der Apoptose-Induktion durch Toll-like-Rezeptoren deutet sich in Versuchen an Makrophagen mit mutiertem TRIF (Adapterprotein für TLR3 und alternatives TLR4-Signal, MyD88-unabhängig) an: Diese zeigen einen massiven Rückgang von LPS-induzierter Apoptose (Hoebe et al, 2003), womit TLR4-MyD88-Signale nicht maßgeblich für Apoptose relevant wären. Anders ist es bei TLR2 sowie TLR9, was die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen werden: TLR2 und TLR9 scheinen vollständig von MyD88 abhängig zu sein.

Durch das MyD88-Signal wird weiterhin das proapoptotische BH3-Protein Bim vermehrt exprimiert, jedoch nicht ausreichend für Apoptose-Induktion. Ein zusätzlicher Mechanismus scheint benötigt zu werden (Kirschnek et al, 2005).

Es werden jedoch auch antiapoptotische Funktionen von Toll-like-Rezeptoren beschrieben, wie etwa vermittelt durch den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B downstream des MyD88-Signalweges (Karin & Lin, 2002).

## 2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Interaktion von Toll-like-Rezeptoren mit den Signalwegen der Apoptose besser zu verstehen.

Dass eine Verbindung zwischen der Stimulation von Toll-like-Rezeptoren und der Auslösung von Apoptose-Mechanismen besteht, ist bekannt. Spezifische TLR-Liganden können in Versuchen in Zellkultur Apoptose induzieren. Die molekularen Mechanismen dieser Zelltodinduktion sind jedoch nur unzulänglich bekannt.

Diese Arbeit fokussiert einzelne Abschnitte der Apoptose-Signaltransduktion und prüft deren Beteiligung an durch TLR-Stimuli induzierte Apoptose.

Weiterhin soll durch den Vergleich dieser Mechanismen in "gesunden" Zellen (Keratinocyten) mit Tumorzellen (Melanomzellen) ein möglicher Angriffspunkt für gezielte Induktion oder zumindest Sensitivierung für Apoptose durch TLR-Liganden als Therapiemöglichkeit erschlossen werden.



### 3. Material und Methoden

Es werden alle Reagenzien und Geräte aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Übliche Labormaterialien wie etwa Eppendorfcups (Größe 1,5ml wenn nicht anders beschrieben), Zentrifugenröhrchen, Petrischalen, Pipettierspitzen und Pipetten, Reagenzgläser, Lagerungsgefäße usw. sind nicht extra aufgeführt.

Wenn Zentrifugierschritte beschrieben sind, wurden diese stets bei Raumtemperatur durchgeführt, soweit nicht anders vermerkt. Wenn nicht extra gekennzeichnet, gibt die erste Zahl in der Klammer die Geschwindigkeit in Umdrehungen pro Minute an, die zweite Zahl die Dauer in Minuten.

Alle Arbeiten mit vitalen Zellen und Reagenzien, die mit Zellen Kontakt hatten, wurden mit sterilen Instrumenten, Materialien und Lösungen und unter sterilen Bedingungen verrichtet.

Western-Blot-Filme wurden gescannt und aus Gründen der besseren Didaktik teilweise geschnitten. Diese Schnitte sind in den entsprechenden Abbildungen mit dem Symbol / gekennzeichnet. Die gezeigten (teils geschnittenen) Western-Blot-Scans, konfokalmikroskopischen Bilder oder sonstigen Abbildungen dieser Arbeit wurden nicht nachbearbeitet und sind in ihrer Qualität im Original übernommen.

#### 3.01. Chemikalien / Medien / Abkürzungsverzeichnis

Alphabetische Auflistung.

Bei den Herstellerangaben gilt die Reihenfolge Firmennamen, Firmensitz, Land; ist bei den Bezugsquellen kein Land angegeben, ist der Standort Deutschland; die Angaben beziehen sich meistens auf den Firmensitz bzw. die Dachorganisation.

Abkürzungen im Text sind hier ausgeschrieben nachzusehen oder werden mindestens einmal im Text selbst ausgeschrieben; übliche Abkürzungen (z.B. DNA/DNS...) werden nicht gesondert erklärt.

Die Abkürzung „dn“ bezieht sich auf doppelt ausgeknockte „dominant negative“ Gene/Proteine.

Die Abkürzung „<sup>+/+</sup>“ bezieht sich auf dominant positive Gene/Proteine.

**+/+ (dominant positive)**

**2-Aminopurine (2-AP)**; mischen von PBS und Essigsäure im Verhältnis 200:1 bei 60°C mit 2-AP ergibt eine 150mM-Lösung 2-AP) von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Herstellerangaben: „This product is a known inhibitor of protein kinases.“, zur genaueren Funktion siehe: (Jarrous et al, 1996)

**3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propan sulfonat (CHAPS)** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

**Abb. (Abbildung)**

**Aceton** von Roth, Karlsruhe

**Acrylamid 30%** von BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA

**Ammoniumpersulfatlösung 10% (APS)** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

**Bovines Albumin (BSA)** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

**Bromphenolblau** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

**CpG oligonucleotide 1668** von TibMolBiol, Berlin  
**Cycloheximid** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**DEVD-7-Amino-4-Methyl-Coumarin (DEVD-AMC)** von Bachem, Bubendorf, Schweiz  
**Dimethylsulfoxid (DMSO)** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**Dithiothreitol (DTT)** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**dn (dominant negative)**  
**Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)** von Biochrom, Berlin  
**Entellan** (Schnelleindeckmittel für Mikroskopie) von Merck, Darmstadt  
**Eosin** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**Ethanol (96%)** von Roth, Karlsruhe  
**Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**FADD (Fas-associated-death-domain)**  
**Fetal Bovine Serum (FCS)** fetales Kälberserum (vor Gebrauch zur Inaktivierung der Komplementfaktoren für eine Stunde bei 56°C erhitzt) von Biochrom, Berlin  
**Formaldehyd-Lösung 37% (Formalin)** von Merck, Darmstadt  
**Gene Pulser Elektroporations-Zubehör** von BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA  
**Glutamine** von Biochrom, Berlin  
**Glutaraldehyd** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**Glycerol** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**β-Glycerophosphat** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**Glycin** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**HEPES** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**Hoechst No. 33342** (bisBenzimid Trihydrochlorid) von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**Imiquimod** (1mg in 1ml DMSO/1ml Aqua dest. (mittels Ultraschall) lösen) von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**Igepal CA-630 (NP40-Stammllösung)**, von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**K3** (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> Kaliumeisencyanid), von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**K4** (K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> Kaliumeisencyanid), von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**Kaliumhydroxid (KOH)** von Merck, Darmstadt  
**Kaliumchlorid (KCl)** von Merck, Darmstadt  
**ko (Gen-knock out)**  
**Loxoribin** von InvivoGen, San Diego, CA, USA  
**LPS (Lipopolysaccharid)** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**MG132** (gelöst in DMSO) von Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA  
 Herstellerangaben: "A potent, cell permeable and selective proteasome inhibitor. Inhibits NFκB activation by preventing IκB degradation."  
 Die Substanz induziert in höheren Konzentrationen Apoptose. Die in dieser Arbeit eingesetzte Konzentration von 0,1μM MG132 ergab sich aus Vorversuchen und zeigte mit MonoMac6-Zellen für 24h inkubiert <10% morphologisch apoptotische Zellkerne (Ergebnisse nicht gezeigt).  
**Magermilchpulver** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**Magnesiumchlorid** (MgCl<sub>2</sub> Hexahydrat) von Merck, Darmstadt  
**Methanol** von Roth, Karlsruhe  
**MitoTracker®** (gelöst in DMSO, eingesetzte Konzentration 1nM) von Invitrogen, Carlsbad, CA, USA  
 Herstellerangaben: "MitoTracker Green FM is green-fluorescent mitochondrial stain which appears to localize to mitochondria, regardless of mitochondrial membrane potential."  
**Natriumchlorid (NaCl)** von Merck, Darmstadt  
**Natriumhydroxid (NaOH)** von Merck, Darmstadt  
**OPI media supplement** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**Pam<sub>3</sub>Cys** (Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub> x 3 HCl) (wasserlöslich) von EMC microcollections GmbH, Tuebingen  
**PBS (Phosphate Buffered Saline)** von Biochrom, Berlin  
**Penicillin / Streptomycin (Pen/Strep)** 10000U / 10000μg/ml von Biochrom, Berlin  
**PIPES** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**Polyethylimin (PEI)** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**Poly(I:C)** (wasserlöslich) von InvivoGen, San Diego, CA, USA  
 Herstellerangaben: "Synthetic analog of dsRNA – TLR3 ligand"  
**Proteaseinhibitoren** Complete EDTA-free (PI) von Roche, Basel, Schweiz  
**Roswell Park Memorial Institute-Medium (RPMI-Medium)** von Biochrom, Berlin  
**Saccharose** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**Salzsäure (HCl)** von Roth, Karlsruhe  
**Saponin** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**SB203580** (= 4-(Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole) (in DMSO lösen) von Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz  
 Herstellerangaben: "Cell permeable, specific inhibitor of p38 (SAPK2a)."  
**SDS** (Natriumdodecylsulfat) von Roth, Karlsruhe  
**SeaBlue®** Pre-Stained Standard von Invitrogen, Carlsbad, CA, USA  
**Staurosporin (Stauro)** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
 Staurosporin ist ein Inhibitor von Proteinkinasen und wird als Kontrollsubstanz für Apoptose-Induktion verwendet (Weil et al, 1996).  
**Tetramethylethylendiamin (TEMED)** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
**Triton X-100** von BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA  
**Trypsin** (Trypsin/EDTA Solution 0,05%/0,02% in PBS) von Biochrom, Berlin

**Tris** (= Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) von Roth, Karlsruhe

**Tween 20** von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

**x-Gal** (x-Galactosidase = 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) von Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Wird durch  $\beta$ -Galaktosidase gespalten und ergibt einen blauen Farbstoff. Haben Zellen ein funktionelles LacZ-Gen, werden diese damit nach Färbung lichtmikroskopisch sicht- und auszählbar.

**z-VAD-fmk** von Bachem, Bubendorf, Schweiz

### 3.02. Puffer / Reaktionslösungen

Alphabetische Auflistung.

Die Zuchtmedien der einzelnen Zelllinien sind bei diesen selbst weiter unten aufgeführt.

**Blockierlösung:**

Magermilchpulver 5% in TBS-T

**DEVD-Puffer:**

100% MDP-Reaktionspuffer

1% BSA-Lösung (100 $\mu$ g/ml)

1% CHAPS-Lösung (0,1%)

0,11% DEVD-AMC (10mM)

**Elektroporationsmedium:**

500ml DMEM

+ 5ml L-Glutamine 200mM

+ 0,5 % FCS

**Laemmli-Puffer (4fach):**

60 mM Tris-HCl (pH 6,8)

60 mM SDS

5 % Glycerol

100 mM DTT

30  $\mu$ M Bromphenolblau

**5x Laufpuffer:**

125mM Tris-HCl (pH 8,3)

1,25M Glycin

0,5% SDS

**LGB (pH 8,8):**

182g Tris

4g SDS

32% HCl

auffüllen mit Aqua dest. auf 1l

**MDP-Reaktionspuffer:**

50mM NaCl

40mM  $\beta$ -Glycerophosphat

10mM HEPES-HCl (pH 7,0)

5mM EGTA

2mM MgCl<sub>2</sub>

**Mitochondrien-Puffer:**

20mM HEPES/KOH (pH 7,4)

10mM KCl

1,5mM MgCl<sub>2</sub>

1mM EDTA (pH 8,0)

1mM EGTA (pH 8,0)

250mM Saccharose

**NP40-Puffer:**

150mM NaCl

50mM Tris (pH 8,0)

1% Igepal CA-630

**4x Proben-Puffer:**

200mM Tris-HCl (pH 6,8)

400mM DTT

8% SDS

40% Glycerol

0,1% Bromphenolblau

**TBS:**

25mM Tris-HCl (pH 7,4)

139mM NaCl

2,7mM KCl

**TBS/T:**

TBS plus 0,5% Tween 20

**2x Transferpuffer:**

78mM Glycin

96mM Tris/HCl (pH 8,3)

20% Methanol

**Tritonpuffer zur Zellyse:**

1 % Triton X-100

50mM PIPES

50mM HEPES

2mM MgCl<sub>2</sub>

1mM EDTA

plus pro Versuch „frisch“ dazu:

25x PI (protease inhibitor)

10mM DTT (1/20 des PI)

= 4 $\mu$ l PI + 0,2 $\mu$ l DTT und auf

100 $\mu$ l mit Puffer auffüllen

**UGB (pH 6,8):**

30g Tris

2g SDS

auffüllen mit Aqua dest. auf 500ml

### 3.03. Antikörper

Alphabetische Auflistung.

<b>Primärantikörper</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Hersteller</b>
β-Aktin	Maus, monoklonales Antiserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bax	Maus, monoklonales Antiserum	Alexis, Lausen, Schweiz
Bik	Maus, monoklonales Antiserum	BD PharMingen, San Diego, CA, USA
Bim	Kaninchen, polyklonales Antiserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Caspase-8	Maus, monoklonales Antiserum	Cell Signaling, Beverly, MA, USA
Cytochrom c	Maus, monoklonales Antiserum	BD PharMingen, San Diego, CA, USA
Hrk	Kaninchen, polyklonales Antiserum	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Noxa	Maus, polyklonales Antiserum	Alexis, Lausen, Schweiz
p53	Kaninchen, polyklonales Antiserum	Cell Signaling, Beverly, MA, USA
phospho-p42/44	Kaninchen, monoklonales Antiserum	Cell Signaling, Beverly, MA, USA
Puma	Kaninchen, polyklonales Antiserum	Alexis, Lausen, Schweiz
Tubulin	Maus, monoklonales Antiserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Hersteller</b>
Cy3 anti Maus	Schaf	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cy3 anti Rabbit	Schaf	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Goat anti Maus	Ziege, polyklonales Antiserum	Dianova, Hamburg
Goat anti Rabbit	Ziege, polyklonales Antiserum	Dianova, Hamburg

#### *Western-Blotting*

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
β-Aktin	1:3000	mit Goat anti Mouse	1:6000
Bik	1:1000	mit Goat anti Mouse	1:1000
Bim	1:1000	mit Goat anti Rabbit	1:3000
Caspase-8	1:500	mit Goat anti Mouse	1:2500
Cytochrom c	1:1000	mit Goat anti Mouse	1:2000
Hrk	1:1000	mit Goat anti Rabbit	1:5000
Noxa	1:1000	mit Goat anti Mouse	1:1000
p53	1:1000	mit Goat anti Mouse	1:1000
phospho-p42/44	1:1000	mit Goat anti Rabbit	1:3000
Puma	1:2000	mit Goat anti Rabbit	1:1000
Tubulin	1:5000	mit Goat anti Mouse	1:8000

#### *Konfokale Mikroskopie*

Bax	1:100	mit Cy3 anti Rabbit	1:100
Cytochrom c	1:400	mit Cy3 anti Mouse	1:500
Noxa	1:100	mit Cy3 anti Rabbit	1:100

### 3.04. Geräte und Materialien

<b>Gerät: Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Brutschrank (Zellen): Hera Cell 240	Heraeus, Hanau
Elektroporationsgerät: Gene Pulser™	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Gelelektrophoresekammer: Mighty Small Gel Chamber	Hoefler, San Francisco, CA, USA
Lichtmikroskop: ID 03	Zeiss, Jena
Konfokales Mikroskop: Axiovert 100M Laser ScanningMicroscope	Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop: Leica DM RBE	Leica, Bensheim
pH-Meter: MultiCal pH526	WTW Weilheim
Photometer: 4054 Ultrospec Plus	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Nano Drop ND-1000	Nano Drop, Delaware, USA

Sterilwerkbank: HERAsafe HSP 18  
Ultraschallgerät: Sonopuls HD60  
UV-Bestrahlungsgerät: Stratalinker

Blottkammern: Mini-Trans – Blot Cell  
Criterion Blotter  
Elektrophoresekammer: Mighty Small SE260 Minivertical Unit  
Entwicklungsmaschine: Curix 60  
Spannungsquelle: EPS 1001  
Film: Hyperfilm™ ECL™ Chemiluminescence Film  
Transfermembran: Protran® BA 85 Nitrocellulose  
Whatman Papier

Zentrifugen:  
Biofuge 15 R (4°C)  
Biofuge fresco (4°C)  
Centrifuge 5415C (RT)  
L8-70M Ultrazentrifuge  
Megafuge 1.0 R (4°C)  
Omnifuge 2.ORS (RT)  
Sorvall RC 26 Plus (4°C)  
Ultrazentrifuge

Zellkultur & Zellverarbeitung:  
Falcon® Zellkulturplatten Multiwell™  
(6-, 12-, 24-, und 96-Well)  
Falcon® Rundbodenröhrchen (5ml, 15ml)  
Kryo-Röhrchen 1,5ml

Heraeus, Hanau  
Bandelin Electronic, Berlin  
Stratagene, La Jolla, CA, USA

Bio-Rad, Hercules, CA, USA  
Bio-Rad, Hercules, CA, USA  
Hoefer, San Francisco, CA, USA  
Agfa Gevaert, Mortsel, Belgien  
Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden  
Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden  
Schleicher & Schüll, Dassel  
Schleicher & Schüll, Dassel

Heraeus, Hanau  
Kendro, Asheville, NC, USA  
Eppendorf, Hamburg  
Beckman, Fullerton, CA, USA  
Kendro, Asheville, NC, USA  
Kendro, Asheville, NC, USA  
Kendro, Asheville, NC, USA  
Du Pont, Newton, CT, USA

Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA  
Cryosystems, Wohlen, Schweiz

### 3.05. Software

Adobe® Photoshop cs  
Adobe® Reader 8/9  
Graphics Suite CorelDraw 11  
Microsoft® Office Excel 2003 Professional Edition / 2007 Home & Student  
Microsoft® Office PowerPoint 2003 Professional Edition / 2007 Home & Student  
Microsoft® Office Word 2003 Professional Edition / 2007 Home & Student  
Systat SigmaPlot 10 für Windows  
Thomson EndNote X

Bei den entsprechenden Geräten mit Software-Steuerung wurden die vom Hersteller mitgelieferten Software-Pakete genutzt.

### 3.06. Zellen und Kulturmedien

Alle verwendeten Zelllinien wurden in Brutschränken bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Bei adhärennten Zellen fand die Zellpassage statt, sobald die Zellschicht annähernd 80% Konfluenz erreichte oder eine Verfärbung des pH-Indikators (einziger Parameter bei den Suspensionszellen MonoMac6) im Medium nach orange sichtbar wurde.

### **293-Zellen** (Human Embryonic Kidney Fibroblasts 293 T cells = HEK 293)

Diese Zellen exprimieren die meisten Toll-like-Rezeptoren nicht und reagieren daher nicht auf Toll-like-Rezeptor-Agonisten. Klon 3.1 (siehe unten) dieser Zellen wird in dieser Arbeit hauptsächlich eingesetzt.

**Zuchtmedium:**  
500ml DMEM  
+ 5ml Pen/Strep  
+ 5ml L-Glutamine 200mM  
+ 10 % FCS

### **Klon 3.1** der 293-Zelllinie

Dieser Klon exprimiert stabil murinen TLR9 und zeigt zuverlässig Apoptose nach CpG-Stimulierung (Fischer et al, 2005). Eine genauere Beschreibung dieser Zelllinie findet sich in (Bauer et al, 2001).

**Zuchtmedium:**  
siehe 293-Zellen

### **HaCaT**

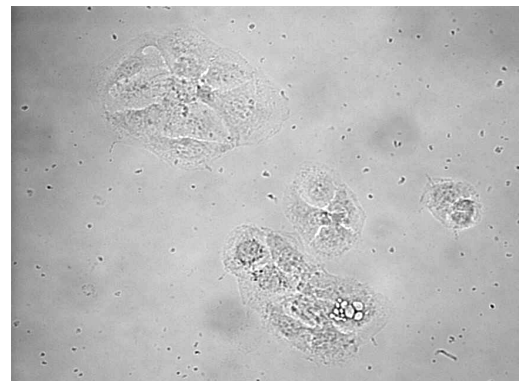
HaCaT-Zellen sind eine spontan immortalisierte humane Keratinozyten-Zelllinie. Sie wurden durch Langzeit-Kultur mit reduzierter Kalzium-Konzentration und erhöhter Temperatur von normalen humanen Hautkeratinozyten gewonnen (Ha = human adult, Ca = calcium, T = temperature). Sie haben die Eigenschaften normaler humaner Keratinozyten behalten. Eine genauere Beschreibung der Zelllinie findet sich in (Boukamp et al, 1988).

Beim Umsetzen der Zellen wurden diese entgegen dem unten beschriebenen Vorgehen primär zweimal mit eisgekühltem PBS gewaschen, je 15min. im

Brutschrank inkubiert und dann mit Trypsin so lange im Brutschrank inkubiert, bis sich alle Zellen selbst abgelöst haben (ca. 20min.).

**Zuchtmedium:**  
500ml DMEM  
+ 5ml L-Glutamine 200mM  
+ 10 % FCS

Initial ohne Antibiotikum, bei Verdacht auf Verunreinigungen Zugabe von 10µg/ml Ciprofloxacin (Ciprobay von Bayer, Leverkusen).



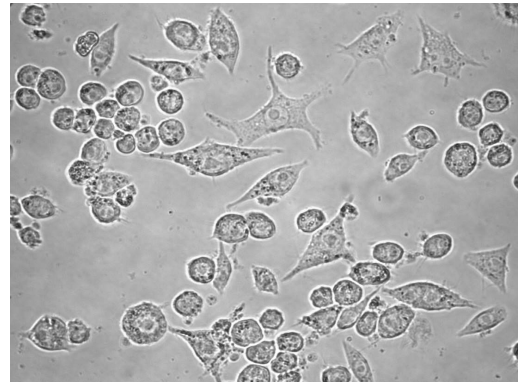
**Abbildung 009.**  
HaCaT-Zellen, 100fache Vergrößerung.

### IF6

Es handelt sich um eine adhärenz wachsende humane Melanom-Zelllinie.

„IF6 was developed in our laboratory from a melanoma metastasis in an axillary lymph node of a 35-year-old male patient“, „non-metastatic“ (Van Muijen et al, 1991), „low aggressive cell line“ (Kunz et al, 1999).

**Zuchtmedium:**  
500ml RPMI-Medium  
+ 10 % FCS  
+ 5ml Pen/Strep



**Abbildung 010.**  
IF6-Zellen, 40fache Vergrößerung.

### Mel526

Eine HLA-A2-positive humane Melanom-Zelllinie, die aus resezierten metastatischen Läsionen maligner Melanome am National Cancer Institute, Bethesda, USA gezüchtet wurde (Topalian et al, 1989).

**Zuchtmedium:**  
500ml DMEM  
+ 5ml Pen/Strep  
+ 5ml L-Glutamine 200mM  
+ 10 % FCS



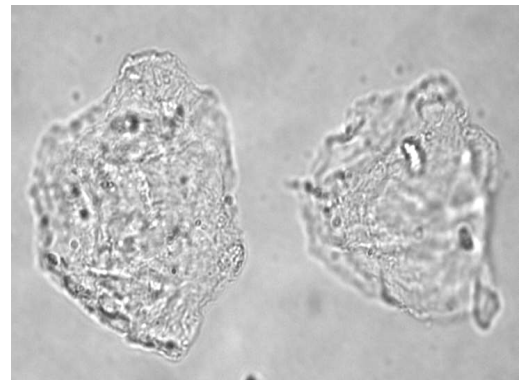
**Abbildung 011.**  
Mel526-Zellen, 40fache Vergrößerung.

### MonoMac6

Eine nicht-adhärenz wachsende Monozyten-Zelllinie.

MonoMac6-Zellen zeigen phänotypisch sowie funktionell die Eigenschaften reifer Monozyten, für detailliertere Informationen siehe (Ziegler-Heitbrock et al, 1988).

**Zuchtmedium:**  
500ml RPMI-Medium  
+ 5ml Pen/Strep  
+ 10 % FCS  
+ 5ml GIBCO™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution  
10mM von Invitrogen, Carlsbad, CA, USA  
+ 1/2 Vial / 500ml Medium OPI media supplement von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA



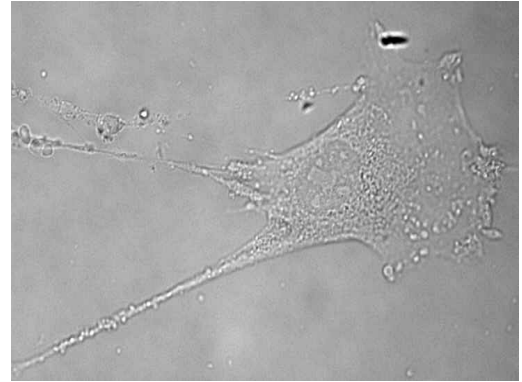
**Abbildung 012.**  
MonoMac6-Zellen, 100fache Vergrößerung.

### PKR<sup>+/+</sup> Mouse/Murine Embryonic Fibroblasts

Immortalisierte Embryonic Fibroblasts von PKR<sup>+/+</sup>-Mäusen wurden für Experimente dieser Arbeit verwendet.

**Zuchtmedium:**

500ml DMEM  
+ 5ml Pen/Strep  
+ 5ml L-Glutamine 200mM  
+ 10 % FCS



**Abbildung 013.**  
PKR<sup>+/+</sup> Mouse/Murine Embryonic Fibroblast,  
40fache Vergrößerung.

### 3.07. Zellkultur

#### Zellen auftauen/einfrieren

Zum Auftauen wird das Kryo-Röhrchen im Brutschrank inkubiert, die Zellsuspension steril mit mindestens 20ml Medium suspendiert und dann wie gewünscht ausgesät.

Um Zellen zur Kryokonservierung vorzubereiten, werden sie wie unten beschrieben von der Zellkulturplatte abtrypsiniert, vorsichtig mit 1ml Einfriermedium resuspendiert, die Suspension wird in 1 Kryo-Röhrchen gefüllt und dann bei -20°C für 1 Stunde gekühlt. Die Zellen sind bei -80°C für etwa 3 Monate oder in flüssigem Stickstoff nahezu unbegrenzt lange haltbar.

**Einfriermedium:**

10% steriles DMSO  
60% FCS  
30% Zuchtmedium der Zellen

#### Zellen umsetzen

Alle an den Kulturschalen adhärenen Zellen (alle in dieser Arbeit verwendeten mit der Ausnahme MonoMac6) werden wie folgt unter sterilen Bedingungen umgesetzt:

Das Kulturmedium wird abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, Trypsin wird zugegeben und die Kulturplatte für etwa 10min. bei 37°C inkubiert. Haben sich die Zellen gelöst, werden sie mit Medium von der Platte gespült und die Zellsuspension zentrifugiert (1500/5). Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet mit Medium resuspendiert, im gewünschten Teilungsverhältnis auf neue Kulturplatten ausgesät und inkubiert.

Zum Umsetzen der nicht-adhärenen MonoMac6-Zellen wird die Zell-Medium-Suspension gesammelt, zentrifugiert (1500/5) und der Überstand („altes“ Medium) verworfen. Dann wird das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert, im gewünschten Teilungsverhältnis auf neue Kulturplatten ausgesät und inkubiert.



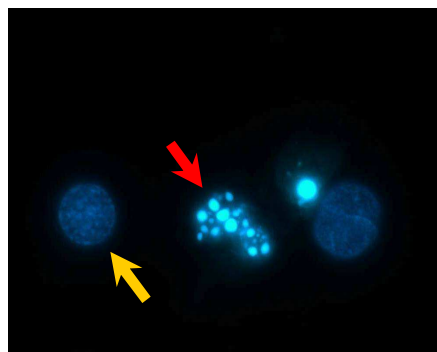
Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurde gegebenenfalls eine Neubauer Zählkammer (Merck, Darmstadt) verwendet.

### 3.08. Hoechst-Färbung

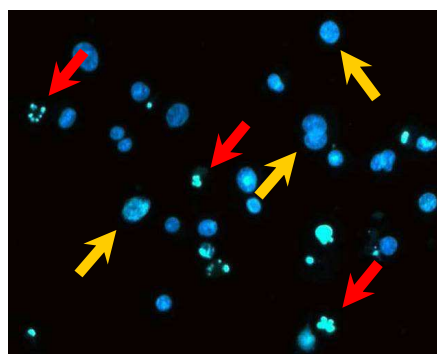
(Nachweis von Apoptose – morphologisch)

Apoptotische Zellen unterliegen morphologischen Veränderungen, es zeigen sich neben der Bildung von Ausstülpungen und Bläschen der Cytoplasmamembran („membrane blebbing“) eine Verringerung des Zellvolumens sowie kernmorphologische Veränderungen: Der Zellkern schrumpft und das Chromatin verdichtet sich zu einem typischen Muster, gefolgt von Zellerfall. Durch den Farbstoff Hoechst 33342, einem DNA-Farbstoff, der vorzugsweise an A-T-Basenpaare bindet, können diese Veränderungen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Dazu wird Hoechst-Farbstoff in 1:4-Verdünnung (1µl/ml) mit Zuchtmedium auf die Zellen verteilt, diese werden bei 37°C für 30min. inkubiert, das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und zentrifugiert (1500/5). Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet mit 700µl PBS resuspendiert, die Suspension in Eppendorfcups umgefüllt und zentrifugiert (7000/5). Dieser Überstand wird verworfen und das Zellpellet mit 50µl PBS



**Abbildung 014.**  
Hoechst-Färbung von MonoMac6-Zellen,  
100fache Vergrößerung.



**Abbildung 015.**  
Hoechst-Färbung von MonoMac6-Zellen,  
20fache Vergrößerung.

Beispiele ←  
morphologischer  
Apoptosezeichen von  
Zellkernen in Hoechst-  
Färbung:

**Chromatinverdichtung  
und Fragmentierung**

Beispiele ←  
**morphologisch  
intakter** Zellkerne  
in Hoechst-Färbung

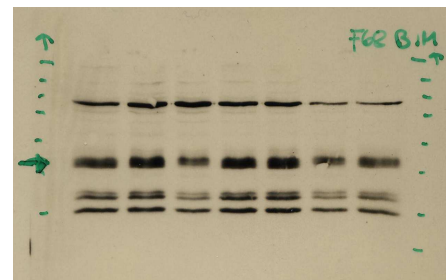
resuspendiert. Aus dieser Suspension wird ein Tropfen auf einem Objektträger verteilt und im Fluoreszenzmikroskop werden die Zellen auf morphologische Apoptosekriterien beurteilt und ausgezählt.

### 3.09. Western-Blotting

Vor dem eigentlichen Western Blotting wird das Proteingemisch mittels Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese in der Trägermatrix SDS-PAGE entsprechend der Proteingröße in Proteinbanden aufgetrennt.

Beim Western Blotting wird ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, woraufhin die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran wandern (Blotting). Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten, die Proteine können jetzt mit spezifischen Antikörpern beschickt werden. Ein enzymgekoppelter zweiter Antikörper detektiert den ersten, dadurch kann das gesuchte Protein sichtbar gemacht werden. Unspezifisch gebundene Antikörper werden durch Waschschrte mit Puffern wieder entfernt. Durch diese Methode lassen sich Proteine in Zellextrakten nachweisen und abbilden.

	<b>Trenngel 12,5%</b>	<b>Sammelgel</b>
LGB	7,5ml	
UGB		3,75ml
Acrylamid 30%	12,6ml	2,4ml
Aqua dest.	9,9ml	13,8ml
APS 10%	180µl	70µl
Temed	30µl	30µl



**Abbildung 016.**  
Beispiel eines belichteten Western-Blot-Films, hier mit anti-Bim-Antikörper.

Unter strikter Einhaltung der Hygiene- und Schutzmaßnahmen (Handschuhe, Abzug, gründliche Reinigung der Komponenten) wird zuerst das Trenngel hergestellt und in die Kammern gefüllt. Ein etwa 3cm Saum wird nicht befüllt und mit 500µl Butanol bedeckt bis das Gel ausgehärtet ist. Es folgt die Spülung der Kammern mit Aqua dest. und das Trocknen. Dann wird das Sammelgel gemischt, auf das gehärtete Trenngel gegossen und die Kammern werden mit Platzhalterkämme bestückt. Nach der Aushärtung sind die Gele bereit zur Verwendung, Lagerzeiten (in feuchten Tüchern bei 4°C) von einigen Tagen sind möglich und wurden teilweise genutzt.

#### **Triton-Lyse der Zellen**

Bei adhärenen Zellen wird das Medium aus den Zellkulturplatten abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, dann wird Trypsin für etwa 10min. bei 37°C zugegeben. Danach erfolgt (wie

auch bei nicht-adhärenenten Zellen, MonoMac6) das Sammeln der Zellen, das Herunterzentrifugieren (1500/5) sowie das Absaugen des Überstands. Das Zellpellet wird nun in PBS (190µl) resuspendiert und in einen Eppendorfcup umgefüllt. Zuletzt erfolgt das Zentrifugieren in Centrifuge 5415C (7000/5) und das Absaugen der Flüssigkeit. Das Pellet wird erhalten.

#### **Herstellung Laemmli-Lysate**

Das Pellet wird mit etwa 50µl Triton-Puffer resuspendiert, auf Eis für 30min. inkubiert und dann bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand (= Proteinlösung) wird gesammelt, das Pellet (= „Zellschrott“) verworfen. Dann erfolgt die Zugabe von Laemmli-Puffer 4fach. Die Endkonzentration des Laemmlipuffers plus Probe soll 1fach sein, d.h. die Menge der Probe sind  $\frac{3}{4}$  des Endvolumens, die Menge von 4fach-Laemmli-Puffer  $\frac{1}{4}$  des Endvolumens.

Dann erfolgt das Kochen der Lösung bei 95°C für 5min., danach das Kühlen für 10min. auf Eis zur Weiterverarbeitung oder Konservierung bei -20°C.

#### **Elektrophorese / Blotting / Entwicklung**

Die Gelkammer wird in die Laufkammer eingespannt und diese mit 1fach Laufpuffer gefüllt. Nun folgt die Bestückung der Ladungstaschen des Gels mit 5-20µl der Laemmli-Lysate sowie dem vorgefärbten Molekulargewichtsmarker SeaBlue® (5-10µl). Die Elektrophorese wird mit 130V und einer maximalen Stromstärke von 400mA gestartet. Erreichen die Banden das Trenngel, wird die Spannung auf 180V erhöht bis die Farbstofffront den unteren Gel-Rand erreicht hat. Die Elektrophorese wird beendet, das Gel herausgenommen und zusammen mit der bereits in 1fach Transferpuffer eingeweichten Nitrozellulosemembran in die Blotting-Kammer transferiert. Dort erfolgt im Transferpuffer und unter Kühlung (Eiselemente und Kühlraum) das Blotten bei 100V Spannung und 400mA Stromstärke für 1,5-2 Stunden.

Nun folgt die Inkubation der Membran für 1h in Magermilch (MM; Blockierlösung), dann die mind. 1-stündige Inkubation mit dem in MM gelösten 1. Antikörper. Dann wird die Membran für 3x10min. mit dem jeweils nach 10min. erneuerten Waschpuffer TBS/T gewaschen und für eine Stunde mit dem ebenfalls in MM gelösten 2. Antikörper inkubiert. Es folgt das erneute Waschen in TBS/T für 3x10min. (jeweils nach 10min. erneuert). Jetzt wird die Membran für eine Minute mit dem Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (von Perkin Elmer, Boston, MA, USA) inkubiert. Dieses Reagenz enthält Luminol als Substrat für das an den Zweitantikörper gekoppelte Enzym Meerrettich-Peroxidase. Bei Anwesenheit beider Komponenten, also an den Banden des gesuchten Proteins, kommt es zur Lichtemission, die durch Auflegen eines Films auf die Membran sichtbar gemacht werden kann. Nach Belichtung und Entwicklung des Films in der Dunkelkammer können anhand des Molekulargewichtsmarkers die gesuchten und detektierten Proteinbanden identifiziert werden.

## **Strippen**

Beim "Strippen" werden geblotteten Membranen mit weiteren Antikörpern markiert und diese auf Film abgebildet. Dazu werden sie für 5min. in Aqua dest. gewaschen, dann für 10-20min. in 200mM NaOH geschwenkt, um dann wieder für 5min. in Aqua dest. gewaschen zu werden. Dann folgen die Schritte Blockieren, Antikörperzugabe und Entwickeln (siehe oben).

## 3.10. Transfektion

### **Transfektion durch PEI**

Bei der Transfektion durch PEI (Polyethylimin) werden über elektrostatische Kräfte Komplexe aus der negativ geladenen DNA und dem Polykation PEI gebildet, die durch unspezifische elektrostatische Rezeptorkontakte endocytotisch von den Zellen aufgenommen werden. Durch einen nicht genau geklärten Mechanismus werden die im Cytosol vorliegenden PEI-DNA-Komplexe anschließend in den Kern transportiert. Dies geschieht vermutlich während einer mitotischen Teilung mit der damit verbundenen Auflösung der Kernmembran (Godbey et al, 1999; Kircheis et al, 2001; Neu et al, 2005).

Die Zellen werden so transfiziert, fixiert und zur Überprüfung der erfolgreichen Transfektion gefärbt. Neben den gewünschten Vektoren wird demnach auch ein "Färbevektor" eingebracht, welcher das LacZ-Gen trägt, ein bakterielles Gen, welches für das Protein  $\beta$ -Galactosidase kodiert.  $\beta$ -Galactosidase wird nach erfolgter Transfektion und Expression gefärbt und zeigt so die erfolgreiche, weil gekoppelt erfolgte Transfektion mit dem gewünschten Vektor an.

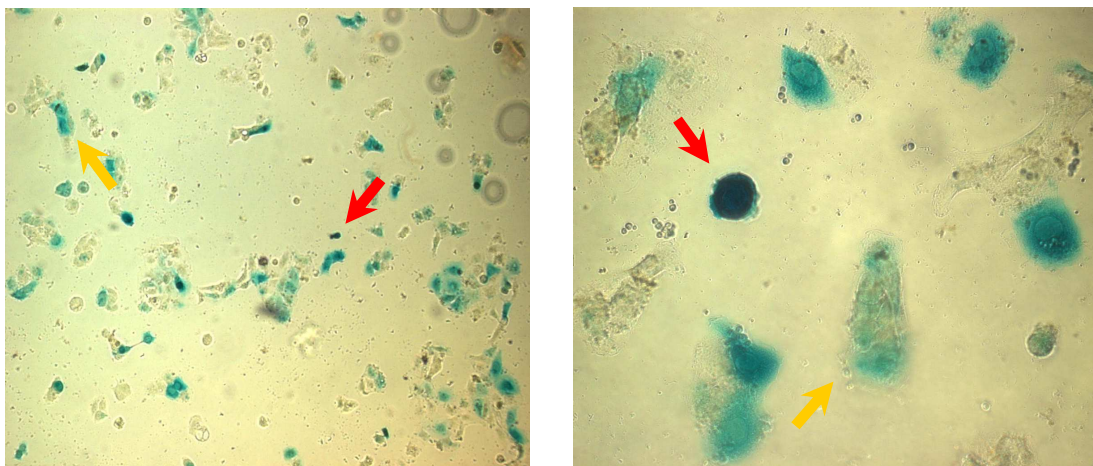
Die Zellen werden in 12-Well-Kulturplatten gezüchtet, 1x mit PBS gewaschen, mit 500 $\mu$ l serumfreiem Medium bedeckt und bis zum Hinzufügen des Transfektionsansatzes im Brutschrank inkubiert.

In Eppendorfcups werden 150 $\mu$ l steriles PBS mit 3 $\mu$ g des Leervektors (Kontrolle) pEF bzw. des zu transfizierenden Vektors mit 0,5 $\mu$ g LacZ (Färbevektor) für 10s. gemischt (Vortex-Mixer) und bei Raumtemperatur für 10min. inkubiert. Diese Zeiten sind exakt einzuhalten.

Das Transfektionsagens PEI wird frisch zubereitet, 0,9mg PEI werden mit 1ml Aqua dest. gelöst. 7,5 $\mu$ l PEI-Agens werden vorsichtig auf Oberfläche der DNA-Suspensionen pipettiert, 10s. gemixt (Vortex-Mixer) und für 10min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden 550 $\mu$ l serumfreies Medium zugegeben, die Lösung wird gemischt und vorsichtig auf die zu transfizierenden Zellen pipettiert. Diese werden für drei Stunden im Brutschrank inkubiert, mit PBS gewaschen, mit 1ml Zuchtmedium bedeckt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Zum Auswerten der Transfektion werden die Zellen fixiert und gefärbt (siehe unten).

### Transfektion durch Elektroporation

Eine weitere Möglichkeit, fremdes Genmaterial in Zellen einzubringen, ist die Elektroporation. Hier werden starke elektrische Impulse angelegt, die die Zellmembranen vorübergehend durchlässig für zum Beispiel DNA machen. Durch diese Methode kann die Transfektionseffizienz im Vergleich zur PEI-Transfektion erhöht werden. Die Zellen werden am Vortag ausplattiert, um am Versuchstag 70-80% Konfluenz zu erreichen. Pro Versuchsansatz werden etwa 5-6 Millionen Zellen benötigt. Die Zellen werden mit reichlich PBS gewaschen, abtrypsiniert und zentrifugiert (1500/5). Während der Zentrifugation wird frisch kaltes (4°C, auf Eis arbeiten) Elektroporationsmedium vorbereitet. Weiter werden 13µg der gewünschten Plasmid-DNA mit 7µg LacZ-DNA (zusammen 20µl, ggf. mit sterilem Aqua dest. auf 20µl auffüllen) in Eppendorfcups gefüllt (4°C, auf Eis arbeiten). Das Medium der zentrifugierten Zellen wird sauber abgesaugt, das Zellpellet mit 400µl kaltem Elektroporationsmedium resuspendiert und sofort mit der DNA im Eppendorfcup gemischt. Das Zell-DNA-Gemisch wird nun luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette (BioRad 4mm Gene Pulser Cuvette) gefüllt und dann am BioRad Gene Pulser mit 280-330V und 960µF elektroporiert. Nach 15min. Inkubation bei Raumtemperatur wird die Zellsuspension



**Abbildung 017.**

Transfizierte HaCaT-Zellen.

Die erfolgreiche Transfektion wurde mittels  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung sichtbar gemacht, transfizierte Zellen sind blau eingefärbt. Zur Auswertung der Apoptose-Rate werden die blau gefärbten Zellen ausgezählt und morphologisch auf Apoptose-Kriterien beurteilt. Die gelben Pfeile deuten auf transfizierte Zellen ohne Anzeichen von Apoptose. Die roten Pfeile deuten auf transfizierte Zellen mit Anzeichen von Apoptose.

Linkes Bild: mittels Elektroporation transfizierte HaCaT-Zellen, 10-fache Vergrößerung.

Rechtes Bild: mittels Elektroporation transfizierte HaCaT-Zellen, 40-fache Vergrößerung.

in 5ml Elektroporationsmedium überführt und zentrifugiert (1500/5), dann das Medium abgesaugt, das Zellpellet mit Zucht-Kulturmedium resuspendiert, die Zellen ausgesät und über Nacht inkubiert. Zum Auswerten der Transfektion werden die Zellen fixiert und gefärbt (siehe unten).

### **Fixierung**

Die hier angegebenen Mengen der Fixierlösung beziehen sich auf eine 12-Well-Zuchtplatte, pro Well werden etwa 500µl Fixierlösung verwendet.

**Fixierlösung:**

60µl EGTA  
30µl 1M MgCl  
48µl Glutaraldehyd (25%)  
auffüllen auf gesamt 6ml mit PBS

Die Zellen werden mit PBS gewaschen, mit etwa 500µl Fixierlösung für 5min. bei Raumtemperatur bedeckt und dann erneut mit PBS gewaschen.

### **β-Galaktosidase-Färbung**

Die hier angegebenen Mengen der Färbelösung beziehen sich auf eine 12-Well-Zuchtplatte, pro Well werden etwa 500µl Färbelösung verwendet.

**Färbelösung:**

75µl x-Gal  
0,018g K3  
0,012g K4  
auffüllen auf gesamt 6ml mit PBS

Die Zellen werden mit Färbelösung bedeckt und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Nach der Fixierung und Färbung werden die Zellen lichtmikroskopisch ausgewertet. Erfolgreich transfizierte Zellen erscheinen blau und innerhalb dieses Kollektivs (die Transfektionsraten betragen bei PEI-Transfektion 30-70 Prozent, bei Elektroporation 50-70 Prozent) werden die Zellkerne auf morphologische Apoptose-Kriterien untersucht.

Die Auszählungen von mindestens 300 Zellen wurden in dieser Arbeit mindestens je 3-mal wiederholt, und die Ergebnisse wurden gemittelt.

### **3.11. Plasmidisolation**

Zur Isolation kleiner Mengen Plasmid-DNA wird diese aus einer Übernachtskultur von Escherichia coli DH5α-blue isoliert, die mit dem entsprechenden Plasmid transformiert wurde. Zu diesem Zweck wurde hier das QIAprep Spin Miniprep Kit (von QIAGEN, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Dabei werden Bakterienzellen mit alkalischer Lyse aufgeschlossen, die DNA bei hohen Salzkonzentrationen an eine Silica-Membran gebunden, gewaschen und mit Elutionspuffer eluiert.

Um größere Mengen Plasmid-DNA zu gewinnen, wird eine Startkultur von entsprechend Escherichia coli DH5 $\alpha$ -blue nach acht Stunden 1:500 in 100ml LB-Medium (institutseigene Herstellung) verdünnt und daraus nach 12–16h unter Verwendung des QIAfilter Plasmid Maxi Kit (von QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers die Plasmid-DNA isoliert. Dazu werden die Zellen wiederum durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Plasmid-DNA mit Hilfe einer Anionen-Austauscher-Säule sowie sich anschließender Fällung gereinigt. Die ausgefällte DNA wird über Nacht in 300  $\mu$ L Aqua dest. gelöst und die Konzentration mittels der im Ultraspec 3000pro Photometer (von Amersham Biosciences, Freiburg) gemessenen Absorption bei 260 nm bestimmt.

### 3.12. Konfokale Mikroskopie

Bei der hier verwendeten Technik der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) handelt es sich um ein lichtmikroskopisches System, das mittels Laserlicht in einem konfokalen Strahlengang definierte optische Schnitte von der Materialprobe aufnimmt und zu einem dreidimensionalen Bildstapel zusammenfügen kann. .

Die zu beurteilenden Zellen, Zellorganellen und Proteine werden mit fluoreszierenden Markern bzw. Antikörpern verschiedenfarbig markiert. Durch das Auswählen einzelner optischer Kanäle können die unterschiedlichen Strukturen isoliert und/oder übereinander gelagert dargestellt werden.

Das hier beschriebene Protokoll geht von Falcon® Multiwell™ 12-Well Zellkulturplatten aus, jeder unten beschriebene Schritt gilt für je ein Kulturschälchen.

Die betreffenden Zellen werden in diesen zu etwa 70% konfluent auf zuvor eingelegten, autoklavierten Glasplättchen kultiviert und im Verlauf mit Saponin (Porenbildner) „gelöchert“, um sie für Farbe-Antikörper durchlässig zu machen. MitoTracker® überwindet Zellwände ohne die Hilfe von Saponin und lokalisiert an Mitochondrien.

Vor Protokollbeginn werden die zu verwendenden Medien stets frisch angesetzt:

Formalin 4% (zur Fixierung der Zellen; 5ml = 550 $\mu$ l 37% Formalin + 4450 $\mu$ l PBS)

PBS + 2% FCS (60ml = 1,2ml FCS + 58,8ml PBS)

PBS + 2% FCS + 1% Saponin (80ml = 1,6ml FCS + 78,8ml PBS + 0,8g Saponin)

Waschen der Zellen:

Zu Beginn wird das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 1ml PBS gewaschen: PBS zugeben, Platte schwenken, absaugen.

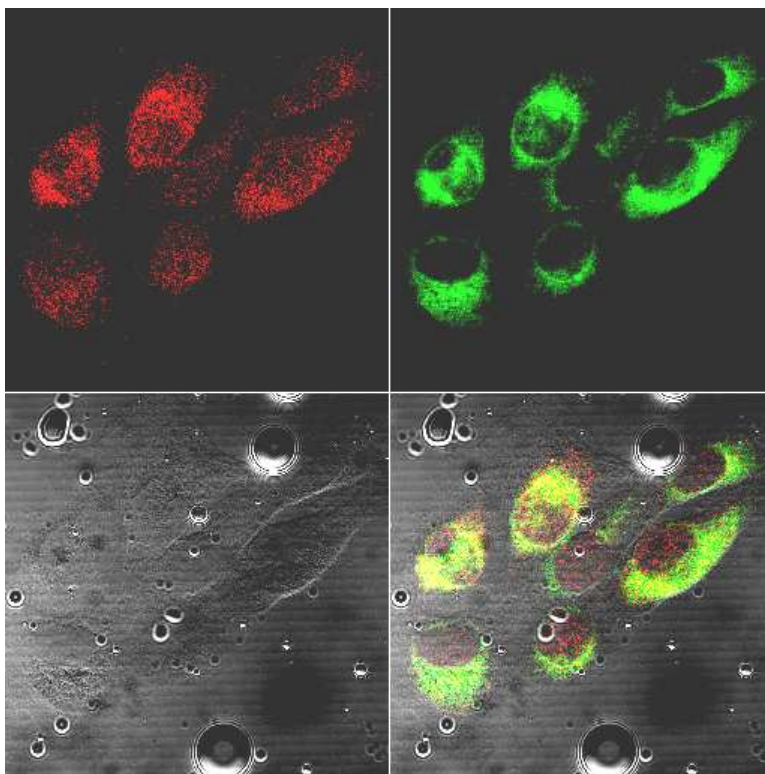
Fixieren der Zellen:

Es werden 250 $\mu$ l PBS vorgelegt, 250 $\mu$ l 4% Formalin zugegeben, die Platte geschwenkt und 30min. bei 4°C im Dunkeln inkubiert (Kühlschrank). Nun wird erneut 2x mit PBS gewaschen,

2x mit PBS/FCS 1ml gewaschen und dann 1x mit PBS/FCS/Saponin 1ml gewaschen. Die Flüssigkeit wird nun abgesaugt.

Färben der Zellen:

Der 1. Antikörpers wird direkt auf das Glasplättchen gegeben, die Platte für 30min. bei 4°C im Dunkeln inkubiert, dann werden 500µl PBS/FCS/Saponin zugegeben und 2x mit PBS/FCS/Saponin gewaschen. Danach folgt die Zugabe des 2. Antikörpers direkt auf das Glasplättchen, 30min. Inkubation bei 4°C im Dunkeln und das Absaugen der Flüssigkeit. Nun werden die Zellen 2x mit PBS/FCS/Saponin 1ml gewaschen, dann 2x mit PBS/FCS 1ml gewaschen und dann 1x mit PBS 1ml gewaschen. Es folgt die Zugabe von MitoTracker®, viermaliges Waschen mit PBS zum Entfernen von überschüssigem MitoTracker® und Absaugen der Flüssigkeit. Nun wird das Glasplättchen mit den darauf gewachsenen, jetzt gefärbten Zellen vorsichtig auf den Objektträger geklebt (Entellan-Klebstoff) und mikroskopiert.



**Abbildung 018.**  
Immunhistochemisch gefärbte HaCaT-Zellen unter dem Konfokalmikroskop photographiert. Beispielfhaft hier mit Noxa-Antikörper (rote Färbung) und MitoTracker® (grüne Färbung) gefärbt. Erläuterung der Aufteilung der vier Felder:  
links oben Kanal „rot“, rechts oben Kanal „grün“, links unten Kanal „Durchlicht“ (= lichtmikroskopisches Bild), rechts unten Kanal „alle Kanäle übereinander gelegt“; gelbe Farbe entsteht durch Überlagerung von rot (Noxa) und grün (Mitochondrien), zeigt also Co-Lokalisation.



### 3.13. Nachweis von Effektorcaspasenaktivität (Caspase-3)

Caspase-3 als wichtigste Effektorcaspase steht am Ende des apoptotischen Signalweges. Zur Bestimmung ihrer Aktivität in cytosolischen Extrakten wurde ein fluorometrisches Verfahren angewandt. DEVD-7-*amino-4-methyl-coumarin* (AMC) ist ein synthetisches Substrat für Caspase-3, wobei AMC fluorogen und damit messbar ist. Die Intensität der Fluoreszenz korreliert mit der Menge an freigesetztem AMC und damit der Caspase-3-Aktivität.

Die Zellen werden von den Kulturplatten abtrypsiniert bzw. gesammelt, einmal mit PBS gewaschen und für 10min. in NP40-Puffer auf Eis zur Lyse inkubiert.

Nun werden die Zellysate bei 4°C zentrifugiert (15.000g/5min.), der Überstand auf Eis zur Weiterverarbeitung bereit gehalten und je dreimal 90µl DEVD-Puffer in je einen Slot einer Falcon-96-Well-Kulturplatte vorgelegt. Dann werden je 10µl Zellysat pro Slot zugegeben und die Kulturplatte für 60min. bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt das Auslesen in einem Millipore CytoFluor™ 2350 Fluorescence Measurement System (von Billerica, MA, USA) bei einer Wellenlänge von 460nm.

## 4. Ergebnisse

### 4.01. Apoptose und Toll-like-Rezeptor 9

Toll-like Rezeptoren (TLRs) werden von Keimen bzw. Keimkomponenten aktiviert und aktivieren im Zellinneren Signalwege für Zellaktivierung, Zelldifferenzierung und Immunreaktionen.

Es wird berichtet, dass alle TLRs (außer TLR3) den Signalweg über MyD88 stimulieren (Kawai & Akira, 2006). Weiter wird berichtet, dass bakterielle Lipoproteine über TLR2 Apoptose in 293(human embryonic kidney fibroblast)-Zellen induzieren (Aliprantis et al, 1999). Dies lässt die Hypothese zu, dass alle weiteren MyD88-abhängigen Toll-like-Rezeptoren ebenfalls Apoptose induzieren können. Um dies zu testen, wurden in Vorarbeiten 293-Zellen stabil mit humanem oder murinem TLR9 transfiziert. Ein Klon (Klon 3.1) zeigt nach Stimulation mit TLR9-Ligand CpG-DNA Apoptose, drei weitere Klone sind nach Stimulation sensibler auf zusätzliche Apoptose-Reize (Fischer et al, 2005).

Im Folgenden wird getestet, ob der mitochondriale Apoptose-Signalweg (Stimulus → Aktivierung BH3-Proteine → Aktivierung Bax und Cytochrom c-Freisetzung → Zelltod) dabei eine Rolle spielt.

#### 4.01.1. Caspasen-unabhängige Bax-Aktivierung durch CpG-DNA

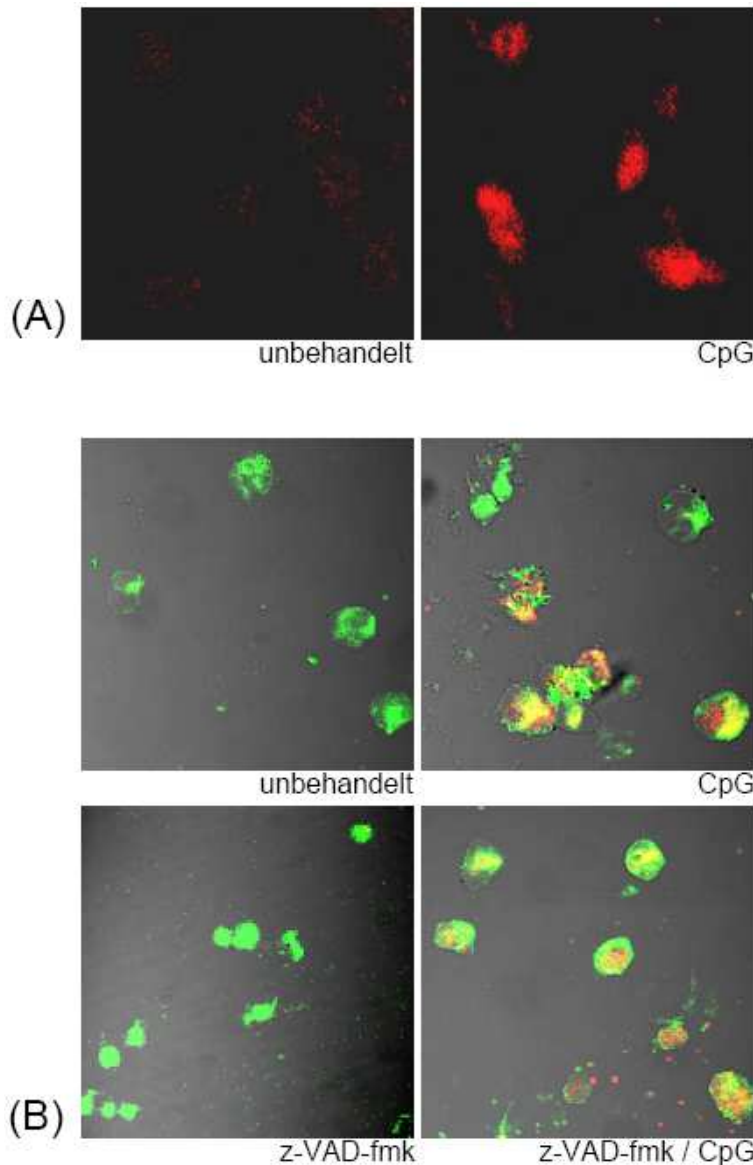
Der kritische Mechanismus beim mitochondrialen Signalweg ist die Cytochrom c-Freisetzung nach Bax/Bak-Aktivierung. Das Auftreten dieses zentralen Schritts des mitochondrialen Signalweges bei der Apoptoseinduktion durch CpG wird zunächst getestet.

Dazu werden Zellen des TLR9-exprimierenden 293-Klons 3.1 mit CpG inkubiert. Diese, sowie unbehandelte Kontrollzellen, werden mit spezifischen Antikörpern für aktives Bax sowie dem sich in Mitochondrien anreichernden Farbstoff MitoTracker® (aktives Bax transloziert in die Mitochondrienmembran) gefärbt. Die Analyse der gefärbten Zellen durch konfokale Lasermikroskopie zeigt nach CpG-Behandlung eine hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisierte Bax-Aktivierung (Abb. 019). Damit ist die durch Bax-Aktivierung vermittelte Cytochrom c-Freisetzung als Signalschritt bei CpG-induzierter Apoptose wahrscheinlich.

Im gleichen Experiment wird die Rolle von Caspase-8 bei CpG-induzierter Apoptose analysiert. Caspase-8 spaltet und induziert Bid, welches Bax aktiviert. Falls dieser Signalweg hier eine Rolle spielen sollte, müsste ein Blocken von Caspase-8 die Bax-Aktivierung verhindern.

Ein Teil der Zellen wird zeitgleich zu der CpG-Gabe mit dem Pan-Caspaseninhibitor z-VAD-fmk behandelt. Die Analyse der gefärbten Zellen durch konfokale Lasermikroskopie zeigt eine

Induktion von aktivem Bax nach CpG-Behandlung, jedoch keine Blockade durch Caspasen-Inhibition (Abb. 019). Z-VAD-fmk ist nicht in der Lage, Bax-Aktivierung zu blockieren, was gegen eine Caspase-8-abhängige Bax-Aktivierung spricht.



**Abbildung 019.**

Caspase-8-unabhängige Bax-Aktivierung durch CpG-DNA.

**(A)** TLR9-transfizierte 293-Zellen (Klon 3.1) wurden wie gezeigt für 24h behandelt (CpG: CpG-ODN 1668, 1 $\mu$ M), gegen aktives Bax immunhistochemisch gefärbt (rot: aktives Bax) und per Konfokalmikroskopie analysiert. Nach CpG-Behandlung zeigt sich deutlich zelluläre Anhäufung von aktivem Bax.

**(B)** Zellen des Klons 3.1 wurden behandelt wie beschriftet (CpG: CpG-ODN 1668, 1 $\mu$ M; z-VAD, 25 $\mu$ M), nach 24h immunhistochemisch gefärbt (grün: Mitochondrien, rot: aktives Bax, gelb: Überlagerung von grünem und rotem Kanal, also Co-Lokalisation von Bax und Mitochondrien) und im Konfokalmikroskop analysiert. Bax-Aktivierung nach CpG-Behandlung ist ersichtlich, Co-Lokalisation von aktivem Bax und Mitochondrien ebenfalls. Gleichzeitige Behandlung mit CpG und den Caspaseninhibitor z-VAD zeigt keine Reduktion der Bax-Aktivierung.

Die Experimente wurden je dreimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

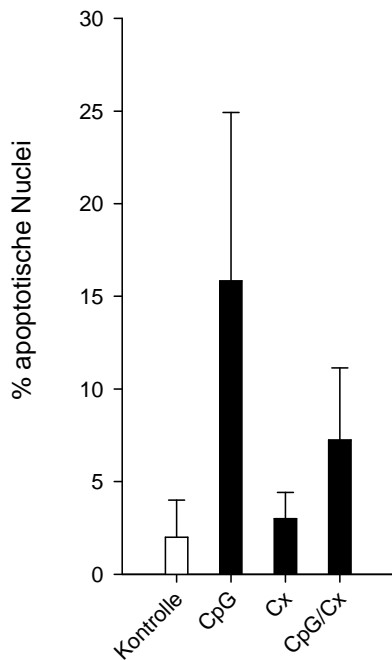
#### 4.01.2. Apoptose-Induktion durch CpG-DNA ist abhängig von Proteinsynthese

Die Induktion von Apoptose kann von Neu-Induktion von Genen abhängig sein. In Vorarbeiten zeigt sich eine relativ langsame Kinetik der Apoptose-Induktion durch CpG (Fischer et al, 2005). Dies kann die Abhängigkeit des Zelltods von Proteinneusynthese bedeuten.

Um diese Abhängigkeit zu testen, wird 293-Klon 3.1 nach Stimulierung mit CpG-DNA zudem mit Cycloheximid, einem Hemmstoff der zellulären Translation, behandelt.

Klar zeigt sich nach Behandlung mit CpG-DNA ein vermehrtes Auftreten von apoptotischen Nuclei, verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen. Durch gleichzeitige Zugabe des Translationshemmstoffes Cycloheximid sinkt der Anteil fragmentierter Kern-DNA (Abb. 020). Auch die Aktivität der Effektor-Caspasen sinkt durch den Einsatz von Cycloheximid (Fischer et al, 2005).

Dies spricht dafür, dass in dieser Zelllinie zur Apoptoseinduktion die Neuinduktion von pro-apoptotisch wirkenden Genen notwendig ist.



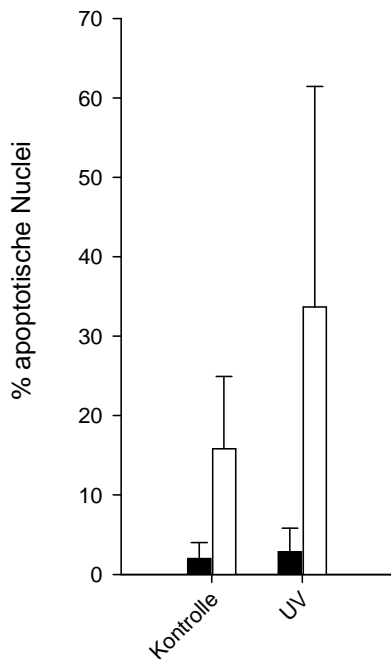
**Abbildung 020.**

Cycloheximid hemmt CpG-DNA-induzierte Apoptose. Zellen des 293-Klons 3.1 wurden wie angegeben behandelt (CpG: CpG-ODN 1668, 1 $\mu$ M; Cx: Cycloheximid, 1 $\mu$ g/ml; Kontrolle: unbehandelt), die Kernmorphologie wurde nach 24h durch Hoechst-Färbung und mikroskopische Analyse beurteilt. Mittelwerte aus drei gleichen Versuchsansätzen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Experimente wurden je dreimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

#### 4.01.3. CpG-Vorbehandlung sensibilisiert für weitere Apoptose-Reize

Die oben beschriebenen Daten deuten auf eine TLR9-vermittelte Induktion der Expression von einem oder mehreren pro-apoptotischen Genen hin. Dabei scheint es sich nicht um Faktoren zu handeln, die von stimulierten Zellen abgegeben werden, da der Überstand von stimulierten 293-Zellen (Klon 3.1) keine Apoptose-induzierende Potenz zeigt (Fischer et al, 2005). Daher wurde die Hypothese erwogen, dass TLR9-Stimulation Gene induziert, welche zellautonom die Empfindlichkeit gegenüber Apoptose-Reizen steigern.

Um dies zu prüfen, werden Zellen mit CpG vorbehandelt, andere nicht. Dann wird in einem Teil der Zellen Apoptoseempfindlichkeit auf UV-Bestrahlung untersucht. Es zeigt sich eine deutliche Mehrung der apoptotischen Nuclei durch den zusätzlichen Apoptose-Reiz UV-Strahlung nach CpG-Vorbehandlung (Abb. 021). Die Zellen reagieren durch CpG-Behandlung sensibler auf weitere Apoptose-Reize wie UV-Strahlung (Abb. 021) und Staurosporin (Ergebnisse nicht gezeigt).



**Abbildung 021.**

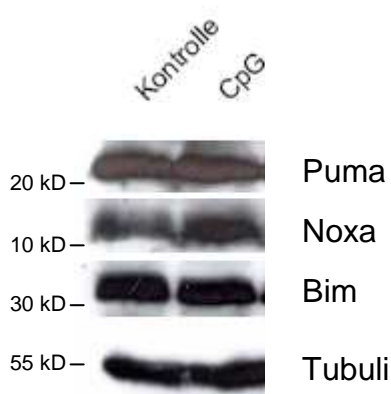
Durch CpG-Vorbehandlung zeigt sich vermehrt Apoptose nach UV-Bestrahlung.

Zellen des 293-Klons 3.1 wurden wie folgt behandelt: CpG (CpG-ODN 1668, 1 $\mu$ M, weiße Balken) für 24h, gefolgt von Bestrahlung mit 200 Joule UV, dann weitere 24h Inkubation, Hoechst-Färbung und mikroskopische Beurteilung.

Schwarze Balken ohne CpG. Mittelwerte aus zwei gleichen Versuchsansätzen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Experimente wurden je dreimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

#### 4.01.4. Keine Induktion von BH3-Proteinen durch CpG-DNA

Bisher ist als frühestes Ereignis in der Apoptose-Signalkaskade bei CpG-induziertem Zelltod die Aktivierung von Bax gezeigt worden. Dieser geht in den meisten Fällen die Aktivierung von BH3-Proteinen voraus (siehe 1.17.). Einige von diesen Proteinen werden nach ihrer Stimulierung transkriptionell reguliert, also nach Reizen vermehrt exprimiert, um dann Apoptose auszulösen. Dies hieße, CpG-DNA könnte die Hochregulierung von bestimmten BH3-Proteinen induzieren. Um eine Beteiligung von BH3-Proteinen an Apoptoseinduktion durch den Stimulus CpG-DNA zu testen, werden Zellen des 293-Klons 3.1 mit CpG



**Abbildung 022.**

Expression, jedoch keine Induktion der BH3-Proteine Bim, Noxa, Puma.

TLR9-transfizierte 293-Zellen (Klon 3.1) wurden wie gezeigt für 24h behandelt (CpG: CpG-ODN 1668, Kontrolle: unbehandelt), dann wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden im Western Blot dargestellt. Tubulin diente als Ladungskontrolle.

Die Experimente wurden je zweimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

behandelt und die Proteinexpression durch Western-Blotting analysiert. Die Experimente zu Abb. 022 zeigen die Expression von drei transkriptionell regulierten BH3-only-Proteinen (Bim, Noxa, Puma), jedoch wird keines durch CpG-DNA induziert, eine vermehrte

Expression nach Behandlung bleibt aus. Die Proteine sind im unbehandelten Zustand schon hoch exprimiert.

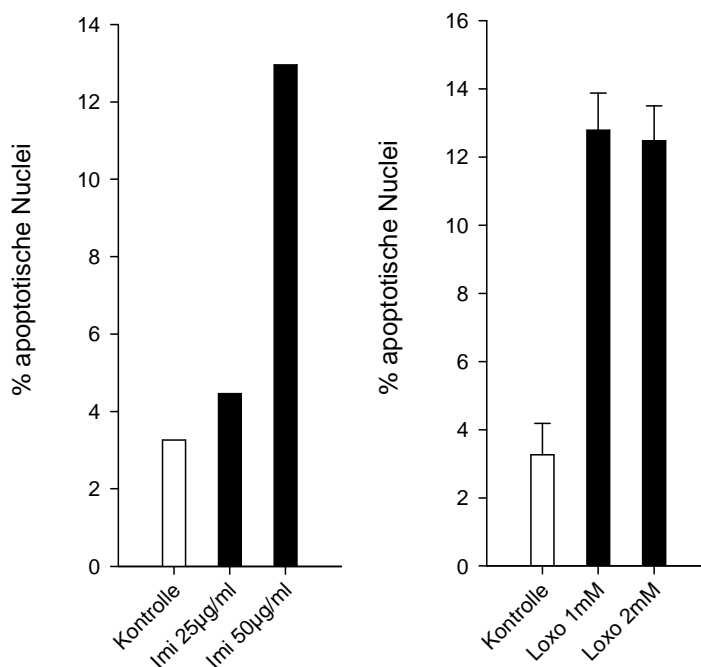
Auch UV-Bestrahlung nach CpG-Behandlung (UV-Strahlung ist ein nachgewiesener Apoptose-Stimulus für Bim, siehe Kapitel 1.16.) zeigt in den getesteten BH3-Proteinen Bik, Bim und Puma zwar Expression, aber keine erkennbare Hochregulierung (Ergebnisse nicht gezeigt).

## 4.02. Die Immunregulatoren Imiquimod und Loxoribin

### 4.02.1. HaCaT – morphologischer Nachweis von Apoptose

HaCaT-Zellen (humane Keratinozyten) zeigen nach Behandlung mit dem Synthetic-low-molecular-weight-Immune-Modifizier Imiquimod Caspasen- und Cytochrom c-abhängige Apoptose-Induktion (Schön et al, 2003). In einem ersten Schritt soll die Empfindlichkeit auf Apoptose durch Imiquimod bestätigt werden.

Neben Imiquimod ist auch der zweite verwendete Immunregulator Loxoribin ein TLR7-Ligand. Beide induzieren in HaCaT-Zellen Apoptose (Abb. 023).



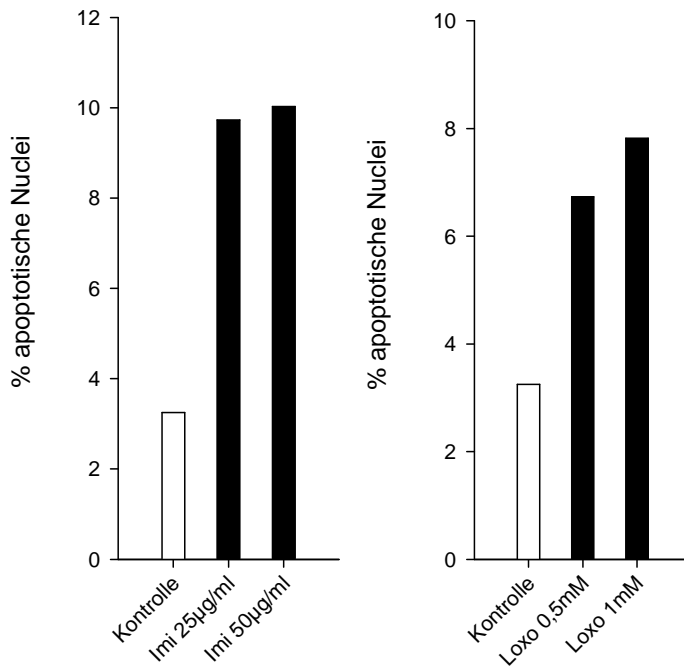
**Abbildung 023.**

Imiquimod und Loxoribin induzieren morphologisch Apoptose in HaCaT-Zellen.

HaCaT-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Imi: Imiquimod, gelöst in Wasser; Loxo: Loxoribin; Kontrolle: unbehandelt), die Kernmorphologie wurde durch Hoechst-Färbung und mikroskopische Analyse beurteilt. Das Ergebnis mit Loxoribin stellt Mittelwerte aus zwei gleichen Versuchsansätzen dar, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Experimente wurden je zweimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

#### 4.02.2. Mel526 – morphologischer Nachweis von Apoptose

Mel526-Zellen (humane Melanomzellen) zeigen wie HaCaT-Zellen nach Behandlung mit den Synthetic-low-molecular-weight-Immune-Modifiern Imiquimod und Loxoribin morphologisch apoptose-typische Kernveränderungen, allerdings in geringem Ausmaß (<10%; Abb. 024).

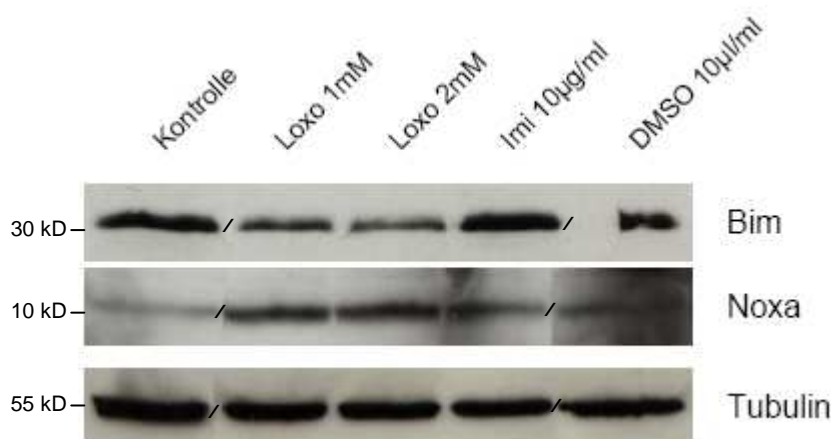


**Abbildung 024.**

Imiquimod und Loxoribin induzieren morphologisch Apoptose in Mel526-Zellen. Mel526-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Imi: Imiquimod, gelöst in Wasser; Loxo: Loxoribin; Kontrolle: unbehandelt), die Kernmorphologie wurde durch Hoechst-Färbung und mikroskopische Analyse beurteilt. Die Experimente wurden je zweimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

#### 4.02.3. HaCaT – Induktion von BH3-only-Proteinen

HaCaT-Zellen zeigen Caspasen- und Cytochrom c-abhängige Apoptose-Induktion nach Imiquimod-Behandlung, jedoch unabhängig von den Todesrezeptoren Fas, TRAIL R1-R4 oder TNF R1/R2 (Schön et al, 2003). Daher ist von einer Beteiligung des mitochondrialen Signalweges auszugehen, dessen Initiator-Proteine, die BH3-only-Familie, jedoch nicht auf



**Abbildung 025.**

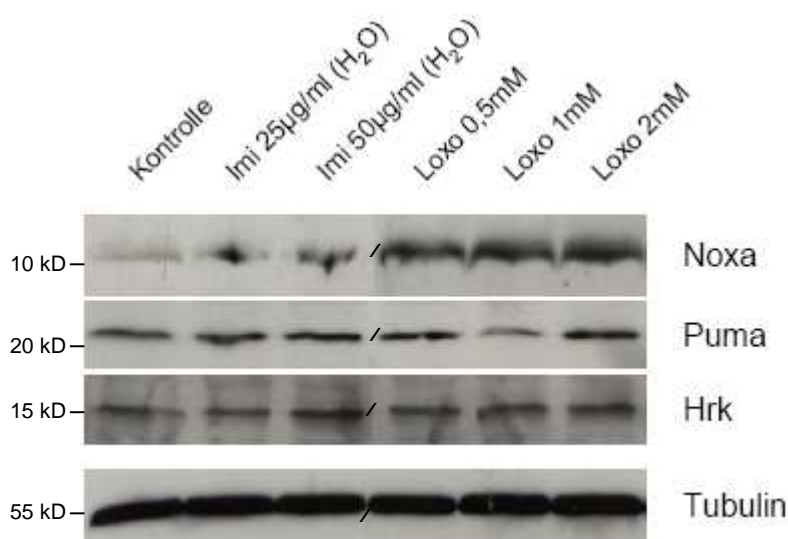
Induktion von Noxa, jedoch nicht von Bim nach Behandlung mit Loxoribin oder Imiquimod. HaCaT-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Loxo: Loxoribin; Imi: Imiquimod, gelöst in DMSO; Kontrolle: unbehandelt), dann wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden im Western Blot dargestellt. Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die Bim/DMSO-Bande ist wegen einer Luftblase auf der Membran unvollständig. Das Symbol / zwischen den Banden kennzeichnet Bereiche, an denen digitale Schnitte erfolgten. Die Experimente wurden je einmal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

vermehrte Expression oder Aktivität getestet wurden. Dies soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Abb. 025 zeigt Experimente mit vermehrter Noxa-Induktion nach Behandlung mit Loxoribin und Imiquimod.

Als Lösungsmittel für Imiquimod wird hier das selbst toxische Lösungsmittel DMSO verwendet, deren Kontrollbande für sich alleine schon Noxa Induktion zeigt. Die Aussagekraft von DMSO-gelöstem Imiquimod ist daher beschränkt. Das BH3-Protein Bim scheint in unbehandelten HaCaT-Zellen bereits deutlich exprimiert zu sein (siehe Bim-Bande in Abb. 025). Erstaunlicherweise bewirkt Loxoribin sogar eine leichte Expressionsreduktion, im Vergleich zur Kontrolle.

Im in Abb. 026 gezeigten Experiment werden bei selbem Versuchsaufbau weitere BH3-Proteine (Puma und Hrk) getestet, sowie DMSO als Lösungsmittel für Imiquimod gegen steriles Wasser ersetzt, um die Wirkung von Imiquimod auf HaCaT-Zellen aussagekräftiger beurteilen zu können. Noxa zeigt hier vermehrte Expression sowohl nach Imiquimod- als auch nach Loxoribin-Behandlung, in beiden Fällen zeigt eine Konzentrationserhöhung der Immunregulatoren keine vermehrte Induktion. Auch die beiden hier getesteten weiteren BH3-Proteine Puma und Hrk zeigen wie auch Bim (Abb. 025) keine vermehrte Expression, weder nach Imiquimod, noch nach Loxoribin, jedoch bleibt eine Expressionsreduktion nach Loxoribin-Behandlung bei Puma und Hrk aus. Diese werden, anders als Noxa, schon in unbehandelten HaCaT-Zellen leicht detektierbar exprimiert.



**Abbildung 026.**

Induktion von Noxa, jedoch nicht von Puma und Hrk nach Behandlung mit Loxoribin oder Imiquimod.

HaCaT-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Loxo: Loxoribin; Imi: Imiquimod, gelöst in sterilem Wasser; Kontrolle: unbehandelt), dann wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden im Western Blot dargestellt. Tubulin diente als Ladungskontrolle. Das Symbol / zwischen den Banden kennzeichnet Bereiche, an denen digitale Schnitte erfolgten.

Die Experimente wurden je einmal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

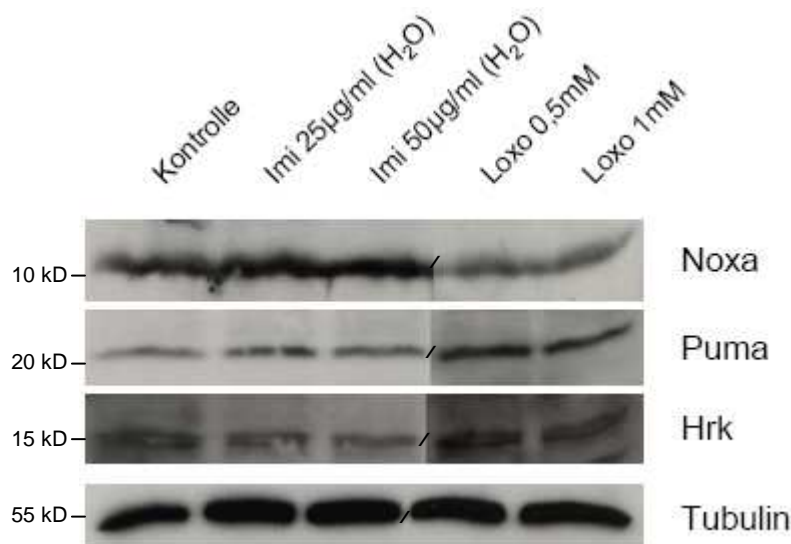


#### 4.02.4. Mel526 – Induktion von BH3-only-Proteinen

Mit Imiquimod und Loxoribin behandelte Mel526-Melanomzellen zeigen keine vermehrte Expression von BH3-Proteinen: Noxa, Puma und Hrk sind schon in unbehandelten Mel526-Zellen exprimiert (Abb. 027).

Imiquimod verändert die Expressionsmenge von Noxa nicht, bei Behandlung mit Loxoribin zeigt sich sogar ein schwacher Rückgang. Imiquimod-Behandlung hat keine Auswirkung auf Puma-Expression, Loxoribin verursacht eine leicht vermehrte Proteinmenge. Auf Hrk haben weder Imiquimod noch Loxoribin eine Auswirkung.

Es zeigt sich also schon bei unbehandelten Kontroll-Zellen eine relativ starke Expression von BH3-Proteinen, insbesondere Noxa.



**Abbildung 027.**

Keine Induktion von Noxa, Puma oder Hrk nach Behandlung mit Loxoribin oder Imiquimod.

Mel526-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Loxo: Loxoribin; Imi: Imiquimod, gelöst in sterilem Wasser; Kontrolle: unbehandelt), dann wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden im Western Blot dargestellt. Tubulin diente als Ladungskontrolle. Das Symbol / zwischen den Banden kennzeichnet Bereiche, an denen digitale Schnitte erfolgten.

Die Experimente wurden je einmal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

#### 4.03. Apoptose und Toll-like-Rezeptor-Liganden

Hier soll die Fähigkeit der Toll-like-Rezeptoren 2, 3, 4 und 9 zur Induktion von Apoptose überprüft werden. Dazu werden insbesondere die Schlüsselschritte des mitochondrialen Signalweges der Apoptose analysiert.

Beides wird vergleichend in „gesunden“ Hautzellen (hier werden spontan immortalisierte Keratinozyten (HaCaT-Zellen) verwendet) und maligne veränderten Zellen der Haut (Melanomzellen) getestet.

#### 4.03.1. Humane Keratinozyten

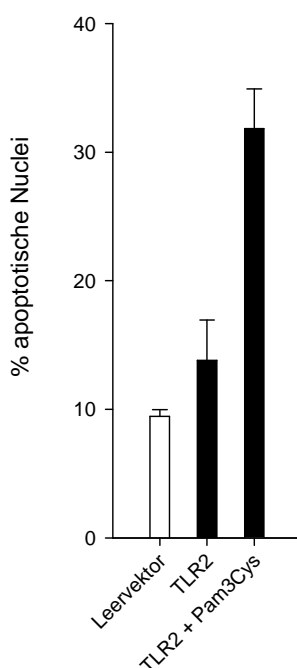
##### 4.03.1.1. Apoptose nach Transfektion und Stimulation von TLR2, 3, 4 und 9

Imiquimid und Loxoribin sind beide als TLR7-Liganden beschrieben. Die Versuche in Kapitel 4.02. zeigen, dass beide sowohl in HaCaT-, als auch in Melanom-Zellen Apoptose induzieren können. Um weitere Toll-like-Rezeptor-Liganden als potentielle Apoptose-Stimuli zu testen, werden TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9 transient in HaCaT-Zellen transfiziert und mit ihren spezifischen Liganden Pam<sub>3</sub>Cys, Poly(I:C), LPS und CpG inkubiert. Anschließend werden die erfolgreich transfizierten Zellen morphologisch auf Apoptose beurteilt.

Transfektion von Zellen bedeutet das Einbringen von zellfremdem Erbgut in die zu transfizierende Zelle. Um die entsprechenden Vektoren durch die Barriere Zellmembran zu schleusen, bedient man sich verschiedener biochemischer oder physikalischer Möglichkeiten. In dieser Arbeit wird das Transportmedium Polyethylenimin (PEI) sowie das Verfahren der Elektroporation verwendet (zur genauen Erläuterung beider Methoden siehe Kapitel 3.10.). Beide Verfahren bedeuten vermehrten Zellstress, welcher für sich alleine genommen schon in manchen Fällen Apoptose induzieren kann. So erklären sich leicht erhöhte Apoptose-Raten schon in Kontrollwerten.

#### **TLR2**

Wie in Abb. 028 zu sehen, zeigen TLR2-transfizierte HaCaT-Zellen ohne Stimulus im Vergleich zur Kontrolle (Leervektor) leicht vermehrt apoptotische Nuclei. Wird nun für 24h der spezifische TLR2-Ligand Pam<sub>3</sub>Cys zugegeben, kann man mehr als doppelt so viele Zellen



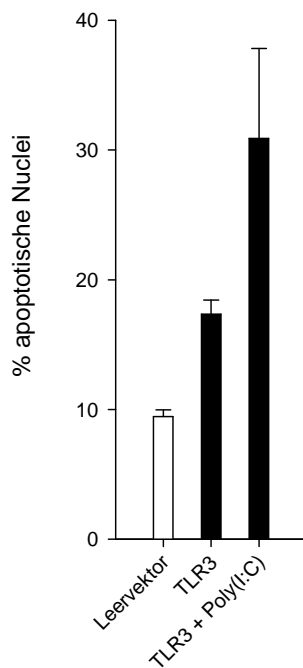
**Abbildung 028.**

Pam<sub>3</sub>Cys induziert in transient TLR2-transfizierten in HaCaT-Zellen Apoptose. HaCaT-Zellen wurden transient mit TLR2, dem Leervektor pEF sowie dem Vektor LacZ transfiziert (mittels PEI) und für 24h mit TLR2-Ligand Pam<sub>3</sub>Cys (1µg/ml) co-inkubiert. Die transfizierten Zellen zeigten sich blau gefärbt und wurden mikroskopisch auf morphologische Kennzeichen von Apoptose analysiert. Mittelwerte aus drei gleichen Versuchsansätzen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Experimente wurden je einmal wiederholt und die die Ergebnisse dabei bestätigt.

nach morphologischen Gesichtspunkten als apoptotisch beschreiben. Pam<sub>3</sub>Cys induziert somit Apoptose in TLR2-transfizierten HaCaT-Zellen.

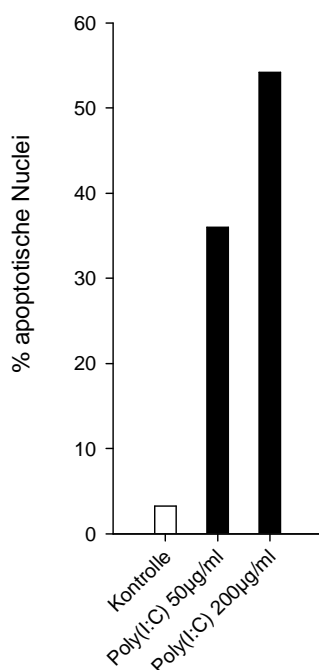
### TLR3

Auch in TLR3-transfizierten HaCaT-Zellen zeigen sich im Vergleich zur Kontrolle (Leervektor) vermehrt apoptotische Nuclei (Abb. 029), jedoch ist im Vergleich mit TLR2 eine deutlich stärkere Apoptoserate zu beobachten. Diese kann durch 24-stündige Zugabe des spezifischen TLR3-Liganden Poly(I:C) noch einmal um knapp das zweifache gesteigert



**Abbildung 029.**

Transiente TLR3-Transfektion in HaCaT-Zellen induziert nach Zugabe von TLR3-Ligand Poly(I:C) vermehrt morphologisch Apoptose. HaCaT-Zellen wurden transient mit TLR3, dem Leervektor pEF sowie dem Vektor LacZ transfiziert (mittels PEI) und für 24h mit 100µg/ml TLR3-Ligand Poly(I:C) co-inkubiert. Die transfizierten Zellen zeigten sich blau gefärbt und wurden mikroskopisch auf morphologische Kennzeichen von Apoptose analysiert. Mittelwerte aus drei gleichen Versuchsansätzen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Experimente wurden je einmal wiederholt und die die Ergebnisse dabei bestätigt.



**Abbildung 030.**

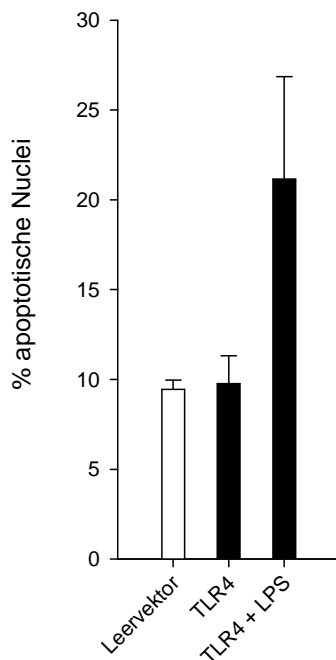
Poly(I:C) induziert konzentrationsabhängig morphologisch Apoptose in HaCaT-Zellen. HaCaT-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Kontrolle: unbehandelt), die Kernmorphologie wurde durch Hoechst-Färbung und mikroskopische Analyse beurteilt. Die Experimente wurden je einmal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

werden, ein Hinweis auf Poly(I:C) als Apoptose-Stimulus nach TLR3-Transfektion.

Auch ohne den transfizierten TLR3 induziert Poly(I:C) Apoptose. Diese Induktion ist konzentrationsabhängig (Abb. 030). Daraus lässt sich auf eine endogene TLR3-Expression in HaCaT-Zellen schließen.

#### TLR4

TLR4-transfizierte HaCaT-Zellen zeigen im Vergleich zur Kontrolle (Leervektor) kaum vermehrt apoptotische Nuclei (Abb. 031). Eine zusätzliche Behandlung mit dem TLR4-spezifischen Liganden LPS für 24h jedoch ergibt über doppelt so viele apoptotische Zellen nach morphologischen Kriterien. LPS induziert demnach Apoptose in TLR4-transfizierten HaCaT-Zellen.

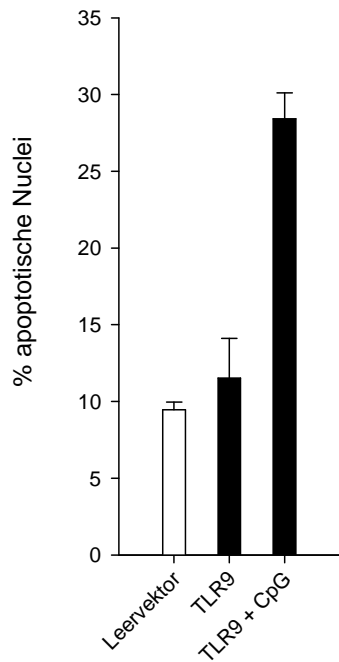


**Abbildung 031.**

Transiente TLR4-Transfektion in HaCaT-Zellen induziert nach Zugabe von TLR4-Ligand LPS vermehrt morphologisch Apoptose. HaCaT-Zellen wurden transient mit TLR4, dem Leervektor pEF sowie dem Vektor LacZ transfiziert (mittels PEI) und für 24h mit TLR4-Ligand LPS (1µg/ml) co-inkubiert. Die transfizierten Zellen zeigten sich blau gefärbt und wurden mikroskopisch auf morphologische Kennzeichen von Apoptose analysiert. Mittelwerte aus drei gleichen Versuchsansätzen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Experimente wurden je einmal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

#### TLR9

In TLR9-transfizierten HaCaT-Zellen fallen wie schon bei den TLR2- und TLR3-Transfektionen vermehrt apoptotische Nuclei auf, verglichen mit der Kontrolle (Leervektor). Die zusätzliche Behandlung mit dem TLR9-spezifischen Liganden CpG für 24h ergibt wie bei TLR2-, TLR3- und TLR4-transfizierten HaCaT-Zellen mehr als doppelt so viele apoptotische Zellen nach morphologischen Gesichtspunkten (Abb. 032). Somit induziert auch CpG Apoptose in TLR9-transfizierten HaCaT-Zellen.



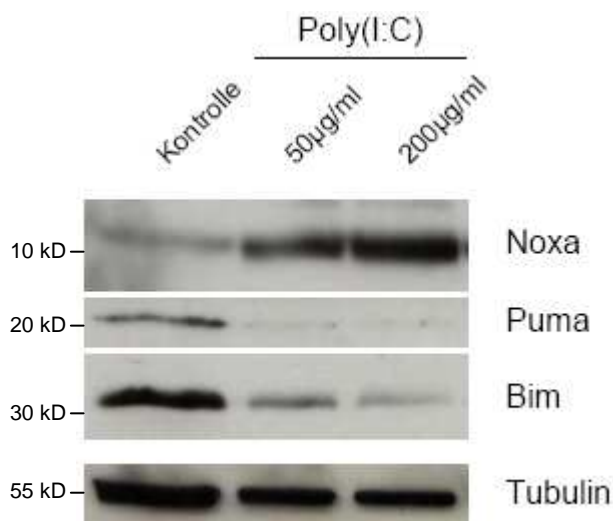
**Abbildung 032.**

Transiente TLR9-Transfektion in HaCaT-Zellen induziert nach Zugabe von TLR9-Ligand CpG vermehrt morphologisch Apoptose. HaCaT-Zellen wurden transient mit TLR9, dem Leervektor pEF sowie dem Vektor LacZ transfiziert (mittels PEI) und für 24h mit TLR4-Ligand CpG (1 $\mu$ M) co-inkubiert. Die transfizierten Zellen zeigten sich blau gefärbt und wurden mikroskopisch auf morphologische Kennzeichen von Apoptose analysiert. Mittelwerte aus drei gleichen Versuchsansätzen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Experimente wurden je einmal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

#### 4.03.1.2. Induktion von BH3-only-Proteinen durch Poly(I:C)

Wie in Kapitel 4.03.1. gezeigt, induziert Poly(I:C) Apoptose in HaCaT-Zellen. Poly(I:C) als TLR3-Ligand legt damit die Vermutung einer TLR3-Aktivierung nahe, welche im Weiteren Apoptose induziert. Um die Verknüpfung von Poly(I:C)-induzierter Apoptose mit den bekannten Apoptose-Mechanismen (Todesrezeptor-Signalweg oder mitochondrialer Signalweg) zu prüfen, werden die nachfolgenden Versuche durchgeführt.

In Abb. 033 werden Experimente mit einer klaren, konzentrationsabhängigen Noxa-Induktion durch Poly(I:C) dargestellt. Die beiden anderen getesteten BH3-Proteine Puma und Bim werden in HaCaT-Zellen schon unbehandelt exprimiert, Poly(I:C) bedingt dort sogar eine Down-Regulierung.



**Abbildung 033.**

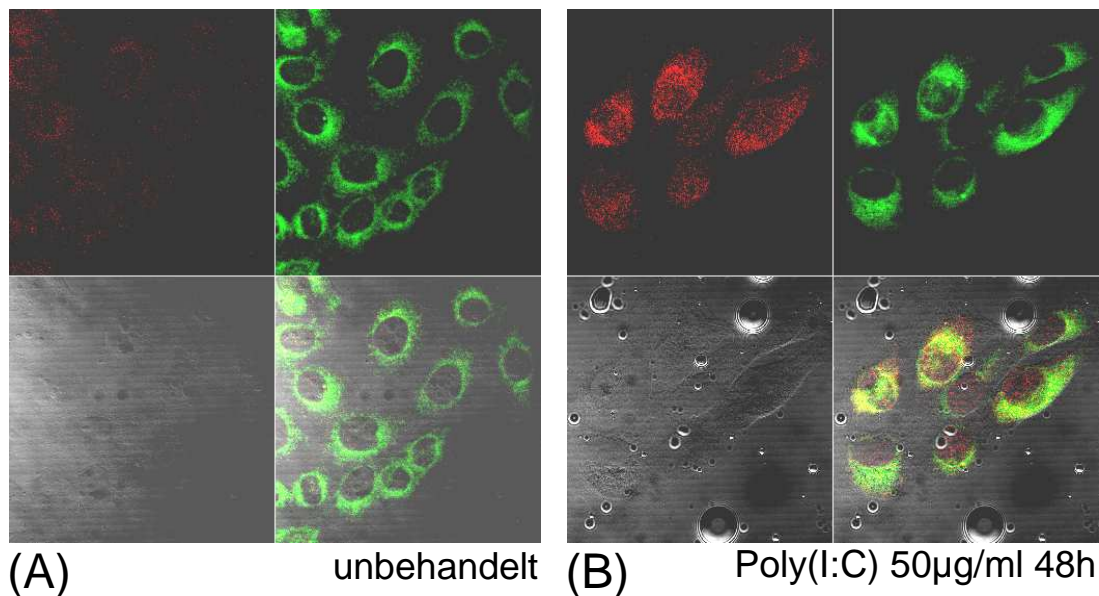
Konzentrationsabhängige Noxa-, jedoch nicht Puma- oder Bim-Induktion durch Poly(I:C)-Behandlung von HaCaT-Zellen. HaCaT-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Kontrolle: unbehandelt), dann wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden im Western Blot dargestellt. Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die Experimente wurden je einmal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

Damit wird durch Poly(I:C) zumindest ein Protein (Noxa) der BH3-only-Familie induziert, und eine Aktivierung des mitochondrialen Signalweges nach TLR3-Stimulation durch Poly(I:C) ist wahrscheinlich.

#### 4.03.1.3. Noxa-Induktion durch Toll-like-Rezeptor-Ligand Poly(I:C)

Einen Nachweis für die Poly(I:C)-verursachte Noxa-Induktion zeigen die Experimente zu Abb. 034: Hier werden HaCaT-Zellen mit Antikörpern gegen Noxa (rot) sowie einer Mitochondrien-Färbung (grün) behandelt und durch konfokale Lasermikroskopie analysiert. Bei gleichen Einstellungen des Mikroskops zeigt sich nach 48-stündiger Behandlung mit Poly(I:C) deutlich eine vermehrte Noxa-Färbung (rot, Abb. 034 (B), Ausschnitt links oben) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 034 (A), Ausschnitt links oben). Vergleicht man zudem die Lokalisation der Noxa-Freisetzung in der Zelle, fällt eine Überlagerung mit den grün gefärbten Mitochondrien auf, im Überlagerungsfenster (Abb. 034 (B) rechts unten) gelb dargestellt.

Induziertes Noxa scheint somit an den Mitochondrien exprimiert zu sein.



**Abbildung 034.**

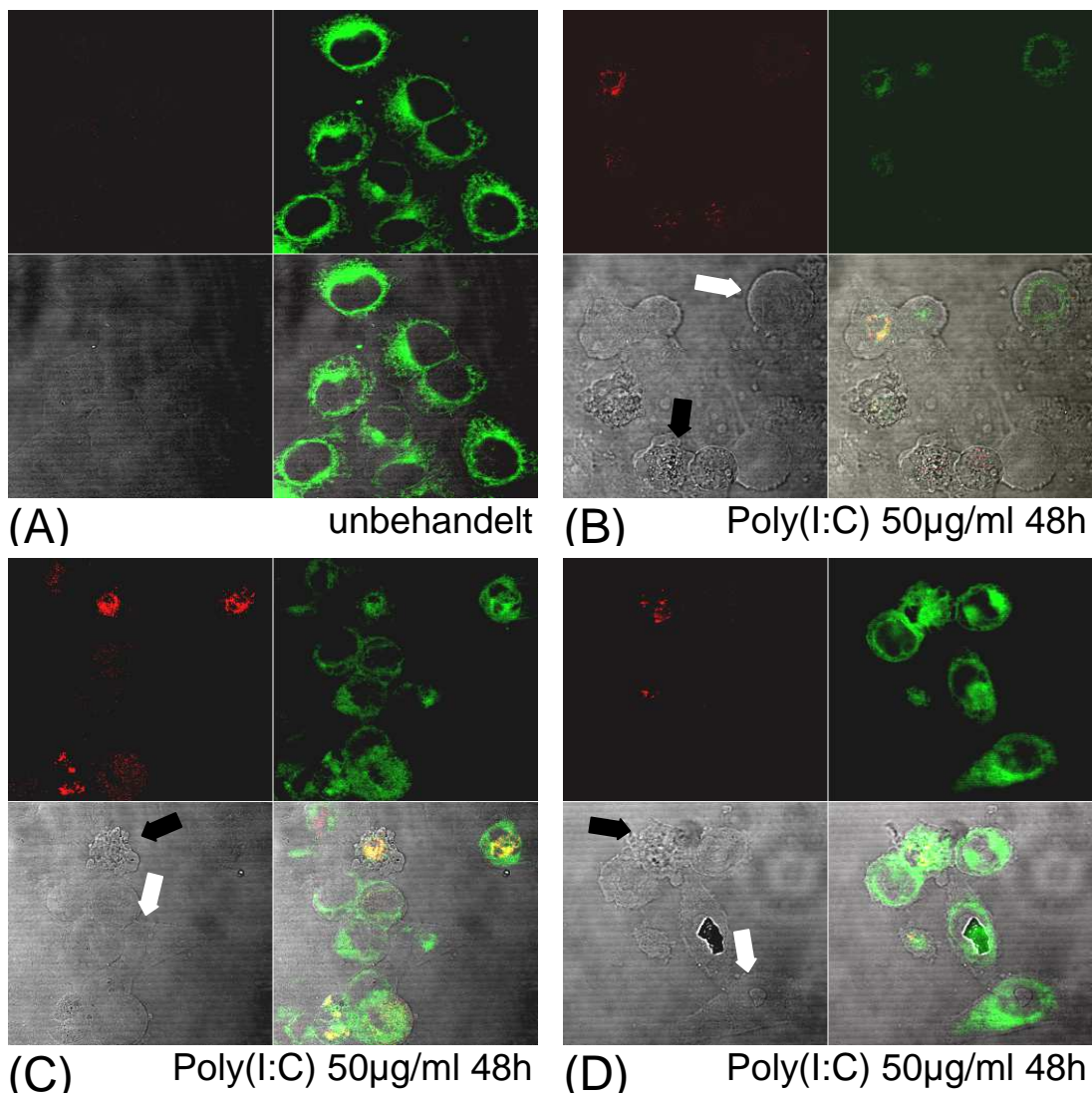
Noxa-Induktion nach Poly(I:C)-Behandlung in HaCaT-Zellen, Co-Lokalisation von Noxa und Mitochondrien.

HaCaT-Zellen wurden wie gezeigt nicht behandelt (A) und 48h mit Poly(I:C) behandelt (B), immunhistochemisch gefärbt und per Konfokalmikroskopie analysiert. Erläuterung der Aufteilung der je vier Felder: links oben Kanal „rot“, rechts oben Kanal „grün“, links unten Kanal „Durchlicht“, rechts unten Kanal „alle Kanäle übereinander gelegt“; gelbe Farbe entsteht durch Überlagerung von rot (Noxa; markiert mit spezifischem-Antikörper) und grün (Mitochondrien; markiert mit MitoTracker®-Farbstoff), bedeutet also Co-Lokalisation. Die Experimente wurden je dreimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

#### 4.03.1.4. Bax-Aktivierung durch Toll-like-Rezeptor-Ligand Poly(I:C)

In Kapitel 4.03.1.3. wird die Induktion des BH3-Proteins Noxa durch Poly(I:C) gezeigt. Der nächste Schritt des mitochondrialen Signalweges ist die Aktivierung von Bax bzw. Bak.

Um einerseits das Vorhandensein von Bax in HaCaT-Zellen zu zeigen und andererseits dessen Aktivierbarkeit durch Poly(I:C) nachzuweisen, werden wie in Abb. 035 zu sehen, HaCaT-Zellen mit und ohne Zugabe von Poly(I:C) kultiviert, immunhistochemisch gefärbt und durch konfokale Laser-Rastermikroskopie analysiert. Ein Farbstoff-gekoppelter Antikörper gegen aktives Bax (der Antikörper bindet selektiv an ein NH<sub>2</sub>-terminales Epitop, welches erst nach Bax-Aktivierung exponiert wird) zeigt rote Färbung, in grün dargestellt sind Mitochondrien.



**Abbildung 035.**

Poly(I:C) induziert Bax-Aktivierung in HaCaT-Zellen.

HaCaT-Zellen wurden wie gezeigt nicht behandelt (A) und 48h mit Poly(I:C) behandelt (B) – (D), immunhistochemisch gefärbt und per Konfokalmikroskopie analysiert. Erläuterung der Aufteilung der je vier Felder: links oben Kanal „rot“, rechts oben Kanal „grün“, links unten Kanal „Durchlicht“, rechts unten Kanal „alle Kanäle übereinander gelegt“; gelbe Farbe entsteht durch Überlagerung von rot (aktives Bax; markiert mit spezifischen Antikörpern) und grün (Mitochondrien; markiert mit MitoTracker®-Farbstoff), zeigt also Co-Lokalisation.

Die Pfeile in den Durchlicht-Feldern zeigen exemplarisch Zellen, die morphologische Kriterien von Apoptose aufweisen (schwarz) bzw. Zellen, die keine Apoptose-Kriterien erfüllen (weiß). Die Experimente wurden je dreimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

Die Mischfarbe gelb ergibt sich aus der Überlagerung (Co-Lokalisation) von rot und grün. Abb. 035 (A) zeigt unbehandelte HaCaT-Zellen, die Abb. 035 (B) – (D) Zellen nach 48-stündiger Poly(I:C)-Behandlung. Einige Poly(I:C)-stimulierte Zellen zeigen, im Vergleich zu unbehandelten, rote Bereiche, der Nachweis von aktivem Bax. Schön zu sehen ist die Co-Lokalisation mit den grün gefärbten Mitochondrien, ein Nachweis der Translokation von aktiviertem Bax in die äußere Mitochondrienmembran. Die schwarzen Pfeile im Kanal „Durchlicht“ greifen exemplarisch apoptotische Zellen nach morphologischen Gesichtspunkten heraus, ein Schrumpfen ist deutlich erkennbar (jeweils links unten). Eben diese Zellen sind es dann auch, die vermehrt aktives Bax (rot) zeigen, besonders gut zu sehen in den Abb. 035 (C) und (D). Zum Vergleich dazu deuten die weißen Pfeile auf Zellen ohne Anzeichen von Apoptose.

HaCaT-Zellen zeigen somit nach Stimulation mit Poly(I:C) Bax-Aktivierung.

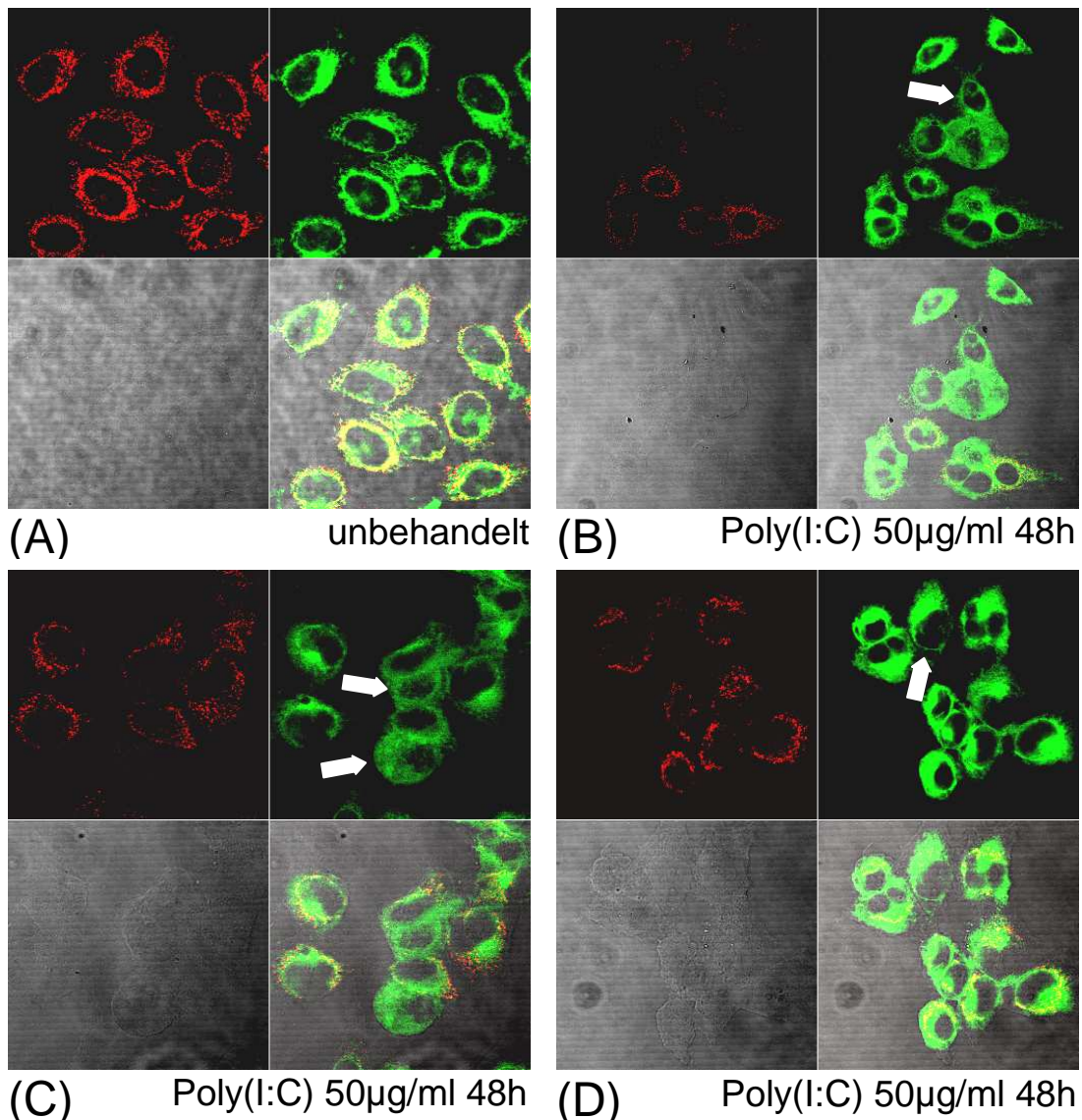
#### 4.03.1.5. Cytochrom c-Freisetzung durch Toll-like-Rezeptor-Ligand Poly(I:C)

Die Freisetzung von Cytochrom c stellt den auslösenden und damit bedeutendsten Schritt vor Ablauf der Kaskade der Effektorcaspasen dar. Sind diese einmal aktiviert, ist Zelltod die Folge.

Abb. 036 (A) zeigt unbehandelte HaCaT-Zellen, Abb. 036 (B) – (D) Zellen nach 48-stündiger Poly(I:C)-Behandlung. Ein Farbstoff-gekoppelter Antikörper gegen Cytochrom c ist rot sichtbar, Mitochondrien sind grün gefärbt. Abb. 036 (A) zeigt in unbehandeltem Zustand rechts unten Co-Lokalisation (gelb) von Mitochondrien (grün) und Cytochrom c (rot). Hingegen zeigen die Abb. 036 (B) – (D) weniger intensiv rot gefärbte Bereiche sowie ein inhomogenes Färbefeld, Hinweise auf die erfolgte Freisetzung von Cytochrom c. Dieses ist weniger verfügbar für die Antikörper-Färbung und stärker verdünnt. Die weißen Pfeile in den Feldern rechts oben der Abb. 036 (B) – (D) deuten auf Zellen, die aus dem Kanal „rot“ quasi verschwunden sind, im Kanal „grün“ jedoch nach wie vor Färbung zeigen: Keine Rotfärbung (Cytochrom c) bedeutet, dass Cytochrom c maximal freigesetzt wird (und demnach keine Färbeantikörper mehr koppeln kann), die Grünfärbung aber beweist, dass die Zellen nicht etwa verschwunden sind. Zum Vergleich Abb. 036 (A): Hier sind alle rot gefärbten Zellen auch im Kanal „grün“ angefärbt.

Mit der Freisetzung von Cytochrom c wird damit auch ein wichtiger Schritt des mitochondrialen Signalweges in Poly(I:C)-stimulierten HaCaT-Zellen nachgewiesen.





**Abbildung 036.**

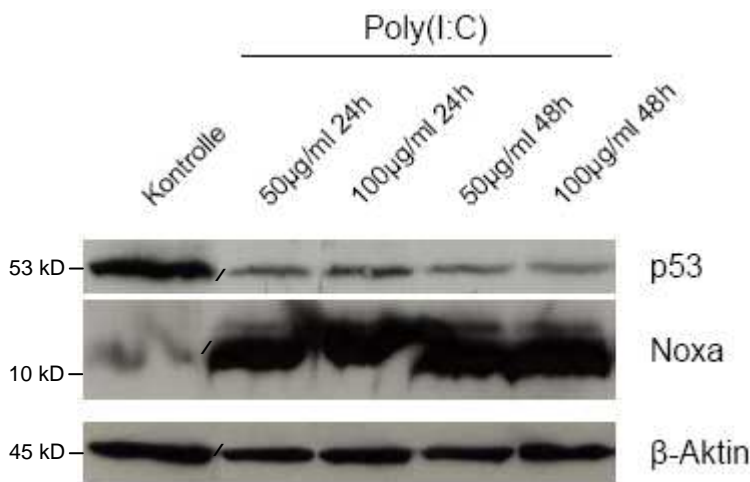
Cytochrom c wird nach Stimulation mit Poly(I:C) aus HaCaT-Zellen freigesetzt.

HaCaT-Zellen wurden wie gezeigt behandelt: Abb. (A) ohne Stimulus, (B) – (D) für 48h mit Poly(I:C). Dann wurden die Zellen mit immunhistochemischen Markern gefärbt und unter dem Konfokalmikroskop analysiert. Erläuterung der Aufteilung der je vier Felder: links oben Kanal „rot“, rechts oben Kanal „grün“, links unten Kanal „Durchlicht“, rechts unten Kanal „alle Kanäle übereinander gelegt“; gelbe Farbe entsteht durch Überlagerung von rot (Cytochrom c; markiert mit spezifischen Antikörpern) und grün (Mitochondrien; markiert mit MitoTracker®-Farbstoff), zeigt also Co-Lokalisation. Die Pfeile in den Feldern von Kanal „grün“ zeigen exemplarisch Zellen, die zwar hier Färbung zeigen, jedoch in Kanal „rot“ keinen Farbstoff mehr aufnehmen, also maximal Cytochrom c freigesetzt haben. Die Experimente wurden je dreimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

#### 4.03.1.6. p53 nach Poly(I:C)-Stimulation

Noxa-Induktion sowie -Regulierung erfolgt oft über den Tumorsuppressor p53. Die bisherigen Ergebnisse zeigen die Aktivierung des mitochondrialen Signalweges über das BH3-only-Protein Noxa durch Toll-like-Rezeptor-Stimulation mit Poly(I:C). Die Frage einer übergeordneten Regulation dieses Mechanismus durch p53 klären die Experimente zu Abb. 037. HaCaT-Zellen werden mit Poly(I:C) in verschiedenen Konzentrationen unterschiedlich lange inkubiert, um dann die Expression von p53 und Noxa mit unbehandelten Zellen zu

vergleichen. Bestätigt wird hier eine klare Induktion von Noxa durch Poly(I:C). P53 zeigt sich in unbehandelten Zellen hoch exprimiert. Die Expression nimmt nach Poly(I:C)-Behandlung ab. Eine längere Einwirkzeit scheint die Down-Regulation noch zu verstärken.

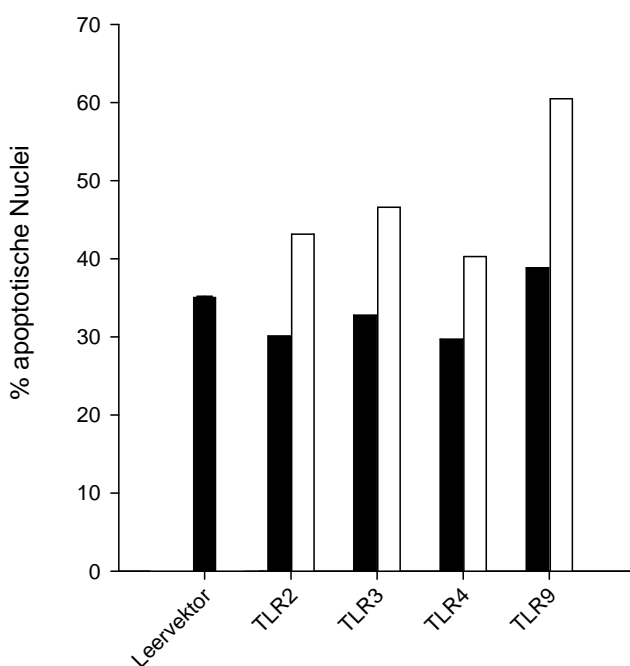


**Abbildung 037.**

Herunterregulation von p53 nach Poly(I:C)-Stimulation, Heraufregulierung von Noxa. HaCaT-Zellen wurden wie gezeigt für 24h sowie 48h behandelt (Kontrolle: unbehandelt), dann wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden im Western Blot dargestellt. β-Aktin diente als Ladungskontrolle. Das Symbol / zwischen den Banden kennzeichnet Bereiche, an denen digitale Schnitte erfolgten. Die Experimente wurden mindestens je dreimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

#### 4.03.2. Humane Melanomzellen

Ein Vergleich von gesunden Zellen mit entarteten, pathologisch veränderten Zellen aus gleichen oder ähnlichen Ursprungsgeweben (hier Haut) liegt nahe. Ein solcher Vergleich wird in dieser Arbeit gezogen. Die Keratinozyten HaCaT werden in den folgenden Kapiteln in einigen wichtigen Punkten mit humanen Melanomzellen verglichen. Alle Versuche werden nahezu identisch mit den beiden humanen Melanom-Zelllinien Mel526 und IF6 gemacht.



**Abbildung 038.**

Transiente TLR2, 3, 4 und 9-Transfektion in Mel526-Zellen induziert nach Zugabe des jeweils spezifischen Liganden vermehrt morphologisch Apoptose. Mel526-Zellen wurden transient mit TLR2, 3, 4, 9, dem Leervektor pEF sowie dem Vektor LacZ transfiziert (mittels Elektroporation) und für 24h mit den spezifischen Liganden Pam<sub>3</sub>Cys 1µg/ml (TLR2), Poly(I:C) 100µg/ml (TLR3), LPS 1µg/ml (TLR4) und CpG 1µM (TLR9) co-incubiert. Schwarze Säulen: ohne Ligand; weiße Säulen: plus Toll-like-Rezeptor-Ligand.

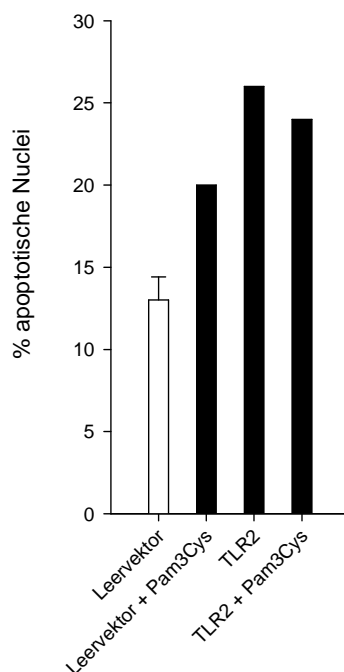
#### 4.03.2.1. Mel526 - Apoptose nach Transfektion und Stimulation von TLR2, 3, 4 und 9

Die TLR7-Liganden Imiquimid und Loxoribin können beide sowohl in HaCaT- als auch in Melanom-Zellen Apoptose induzieren. Um weitere Liganden für Toll-like-Rezeptor-induzierte Apoptose in Mel526-Zellen zu identifizieren, werden diese in den Experimenten zu Abb. 038 mit TLR2, 3, 4 und 9 transient transfiziert und den jeweiligen Liganden Pam<sub>3</sub>Cys, Poly(I:C), LPS und CpG inkubiert. Ähnlich wie in HaCaT-Zellen zeigen alle transfizierten Mel526-Zellen eine Zunahme der Apoptose-Rate nach Zugabe des spezifischen Liganden.

Um eine detailliertere Aussage zu den in Abb. 038 gezeigten und getesteten Rezeptoren machen zu können, werden in Folgeexperimenten zusätzlich neben Leervektor, Toll-like-Rezeptor ohne Stimulus und Toll-like-Rezeptor mit Stimulus Leervektor-transfizierte Mel526-Zellen nur mit dem Toll-like-Rezeptor-Liganden behandelt.

#### TLR2

Abb. 039 zeigt keine Bestätigung der gewonnenen Ergebnisse (Abb. 038) für TLR2-transfizierte Mel526-Zellen. Zwar steigt die Anzahl der apoptotischen Nuclei nach Pam<sub>3</sub>Cys-Behandlung an, jedoch induziert der Toll-like-Rezeptor-Ligand in TLR2-transfizierten Zellen nicht vermehrt Zelltod, verglichen mit transfizierten, aber unbehandelten Zellen. Demnach wird Apoptose sowohl durch Pam<sub>3</sub>Cys als auch durch TLR2-Transfektion induziert.



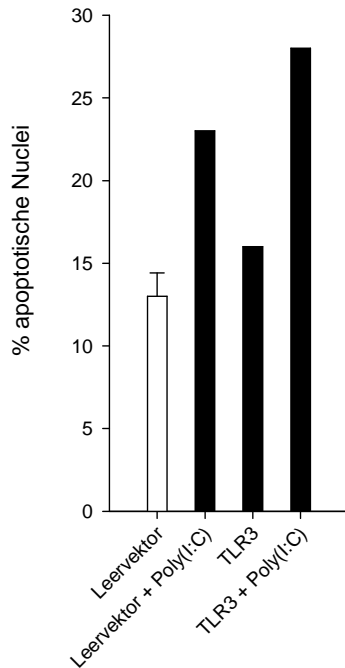
**Abbildung 039.**

TLR2-unabhängige Apoptose-Induktion in Mel526-Zellen nach Pam<sub>3</sub>Cys-Behandlung und TLR2-Transfektion.

Mel526-Zellen wurden transient mit TLR2, dem Leervektor pEF sowie dem Vektor LacZ transfiziert (mittels Elektroporation) und für 24h mit dem TLR2-spezifischen Liganden Pam<sub>3</sub>Cys (1µg/ml) co-inkubiert. Die transfizierten Zellen zeigten sich blau gefärbt und wurden mikroskopisch auf morphologische Kennzeichen von Apoptose analysiert. Das Ergebnis „Leervektor“ fasst zwei gleiche Versuchsansätze zusammen, der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. Die Experimente wurden je einmal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

### TLR3

Wie Abb. 040 zeigt, induziert Poly(I:C) in Mel526-Zellen Apoptose, sowohl ohne vorangegangene Transfektion mit TLR3 als auch in TLR3-transfizierten Zellen. Das Ergebnis der in Abb. 038 gezeigten Experimente ist damit bestätigt. Die beiden Kontrollen mit

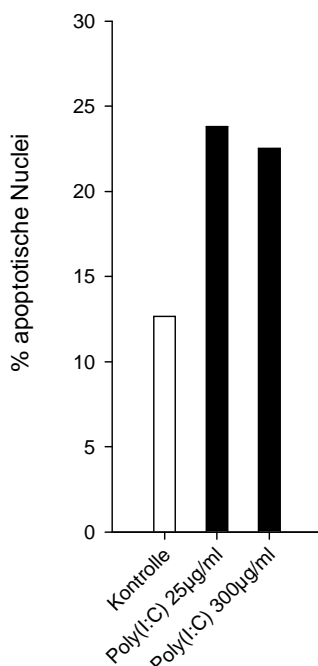


**Abbildung 040.**

TLR3-abhängige Apoptose-Induktion in Mel526-Zellen nach Poly(I:C)-Behandlung und TLR3-Transfektion plus Poly(I:C)-Behandlung. Mel526-Zellen wurden transient mit TLR3, dem Leervektor pEF sowie dem Vektor LacZ transfiziert (mittels Elektroporation) und für 24h mit dem TLR3-spezifischen Liganden Poly(I:C) 100µg/ml co-incubiert. Die positiv transfizierten Zellen zeigten sich blau gefärbt und wurden mikroskopisch auf morphologische Kennzeichen von Apoptose analysiert. Das Ergebnis „Leervektor“ fasst zwei gleiche Versuchsansätze zusammen, der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. Die Experimente wurden je einmal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

transfiziertem Leervektor und TLR3 ohne Stimulus zeigen eine um mehr als 30% verminderte Apoptose-Rate, im Vergleich zu Poly(I:C)-stimulierten Zellen.

Poly(I:C) hat in HaCaT-Zellen klar Apoptose-Induktion mit Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs gezeigt. Auch in Mel526-Zellen (Abb. 040) induziert der TLR3-Ligand Zelltod,



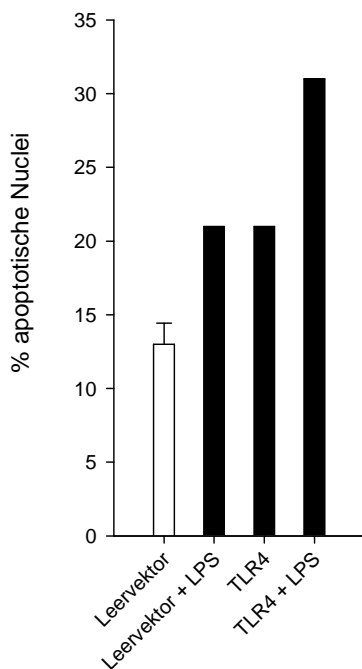
**Abbildung 041.**

Poly(I:C) induziert morphologisch Apoptose in Mel526-Zellen. Mel526-Zellen wurden wie gezeigt für 24h mit verschiedenen Poly(I:C)-Konzentrationen behandelt (Kontrolle: unbehandelt), die Kernmorphologie wurde durch Hoechst-Färbung und mikroskopische Analyse beurteilt. Die Experimente wurden je einmal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

allerdings in den bisherigen Experimenten stets in Verbindung mit Transfektion. Abb. 041 zeigt Experimente, in denen Mel526-Zellen mit verschiedenen hohen Poly(I:C)-Konzentrationen behandelt werden und nach 24-stündiger Einwirkzeit die Kernmorphologie auf Apoptose beurteilt wird: Poly(I:C) induziert Apoptose auch in Mel526-Zellen.

### TLR4

TLR4 transient in Mel526-Zellen transfiziert induziert auch ohne Stimulus Apoptose (Abb. 042). Durch Zugabe von LPS kann der Wert apoptotischer Nuclei noch einmal gesteigert werden. Jedoch auch die Zugabe von LPS auf nicht TLR4-transfizierte Zellen zeigt Induktion von Apoptose.

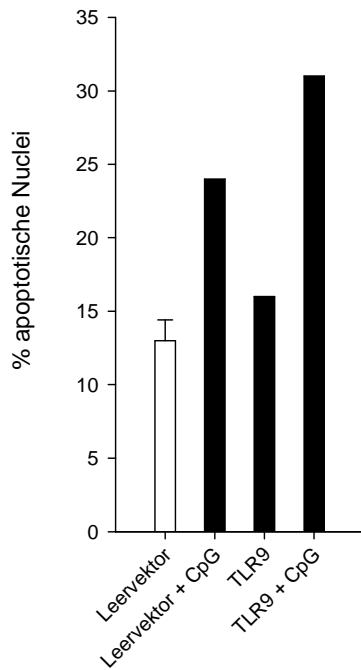


**Abbildung 042.**

LPS, TLR4-Transfektion und TLR4-Transfektion plus LPS-Stimulation in Mel526-Zellen induzieren morphologisch Apoptose. Mel526-Zellen wurden transient mit TLR4, dem Leervektor pEF sowie dem Vektor LacZ transfiziert (mittels Elektroporation) und für 24h mit dem TLR4-spezifischen Liganden LPS (1µg/ml) co-inkubiert. Die transfizierten Zellen zeigten sich blau gefärbt und wurden mikroskopisch auf morphologische Kennzeichen von Apoptose analysiert. Das Ergebnis „Leervektor“ fasst zwei gleiche Versuchsansätze zusammen, der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. Die Experimente wurden je einmal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

### TLR9

TLR9-transfizierte Mel526-Zellen verhalten sich ähnlich den TLR3-transfizierten. Auch hier (Abb. 043) steigert der Toll-like-Rezeptor-Ligand (CpG) die Apoptose-Rate in nicht transfizierten sowie TLR9-transfizierten Zellen gleichermaßen. Damit ist das Ergebnis für TLR9 (Abb. 038) bestätigt.

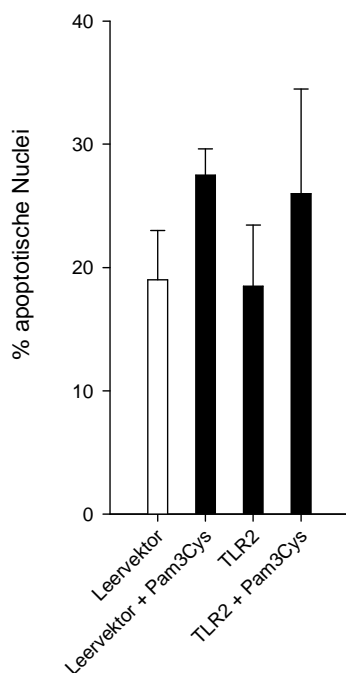


**Abbildung 043.**

TLR9-abhängige Apoptose-Induktion in Mel526-Zellen nach CpG-Behandlung und TLR9-Transfektion plus CpG-Behandlung. Mel526-Zellen wurden transient mit TLR9, dem Leervektor pEF sowie dem Vektor LacZ transfiziert (mittels Elektroporation) und für 24h mit dem TLR9-spezifischen Liganden CpG (1 $\mu$ M) co-inkubiert. Die transfizierten Zellen zeigten sich blau gefärbt und wurden mikroskopisch auf morphologische Kennzeichen von Apoptose analysiert. Das Ergebnis „Leervektor“ fasst zwei gleiche Versuchsansätze zusammen, der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. Die Experimente wurden je einmal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

#### 4.03.2.2. IF6 - Apoptose nach Transfektion und Stimulation von TLR2, 3, 4 und 9

Analog zu Mel526-Zellen wird die Melanom-Zelllinie IF6 mit TLR2, 3, 4 und 9 transient transfiziert und mit den jeweiligen Liganden Pam<sub>3</sub>Cys, Poly(I:C), LPS und CpG inkubiert. Auffällig sind, wie schon bei Mel526-Zellen zu beobachten ist, die relativ hohen Apoptose-Raten bei der Kontroll(Leervektor)-Transfektion.



**Abbildung 044.**

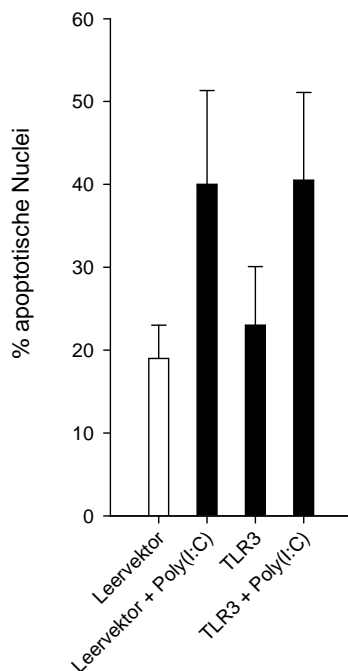
TLR2-abhängige Apoptose-Induktion in IF6-Zellen nach Pam<sub>3</sub>Cys-Behandlung und TLR2-Transfektion plus Pam<sub>3</sub>Cys-Behandlung. IF6-Zellen wurden transient mit TLR2, dem Leervektor pEF sowie dem Vektor LacZ transfiziert (mittels Elektroporation) und für 24h mit dem TLR2-spezifischen Liganden Pam<sub>3</sub>Cys (1 $\mu$ g/ml) co-inkubiert. Die transfizierten Zellen zeigten sich blau gefärbt und wurden mikroskopisch auf morphologische Kennzeichen von Apoptose analysiert. Mittelwerte aus drei gleichen Versuchsansätzen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Experimente wurden je einmal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

## TLR2

In IF6-Zellen zeigen die Kontroll-Transfektionen mit einem Leervektor bzw. TLR2 ohne Stimulation etwa gleiche Raten apoptotischer Nuclei. Nach Zugabe von TLR2-Ligand Pam<sub>3</sub>Cys steigt sowohl in unbehandelten als auch TLR2-transfizierten Zellen die Apoptose-Rate (Abb. 044).

## TLR3

TLR3-transfizierte IF6-Zellen zeigen eine qualitativ ähnliche Reaktion wie Zellen nach TLR2-Transfektion. Leervektor-transfizierte und TLR3-transfizierte Zellen ohne Stimulation zeigen ähnlich niedrige Raten apoptotischer Nuclei. Nach Zugabe von TLR3-Ligand Poly(I:C) steigt sowohl in unbehandelten als auch TLR3-transfizierten Zellen die Apoptose-Rate (Abb. 045).

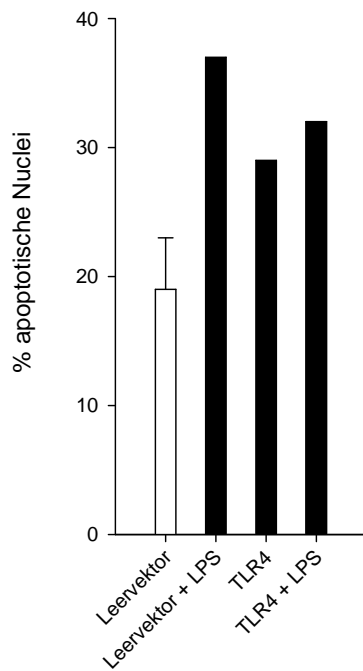


**Abbildung 045.**

TLR3-abhängige Apoptose-Induktion in IF6-Zellen nach Poly(I:C)-Behandlung und TLR3-Transfektion plus Poly(I:C)-Behandlung. IF6-Zellen wurden transient mit TLR3, dem Leervektor pEF sowie dem Vektor LacZ transfiziert (mittels Elektroporation) und für 24h mit dem TLR3-spezifischen Liganden Poly(I:C) 100µg/ml co-inkubiert. Die transfizierten Zellen zeigten sich blau gefärbt und wurden mikroskopisch auf morphologische Kennzeichen von Apoptose analysiert. Mittelwerte aus drei gleichen Versuchsansätzen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Experimente wurden je einmal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

## TLR4

In Abb. 046 zeigen LPS-behandelte IF6-Zellen vermehrt apoptotische Nuclei. Nach TLR4-Transfektion ohne Stimulus steigt die Zahl apoptotischer Zellen ebenfalls stark an, jedoch in geringerem Maße als nur durch LPS. Eine zusätzliche LPS-Behandlung kann zwar die Apoptose-Rate noch etwas steigern, der Maximalwert der alleinigen LPS-Behandlung wird jedoch nicht erreicht.

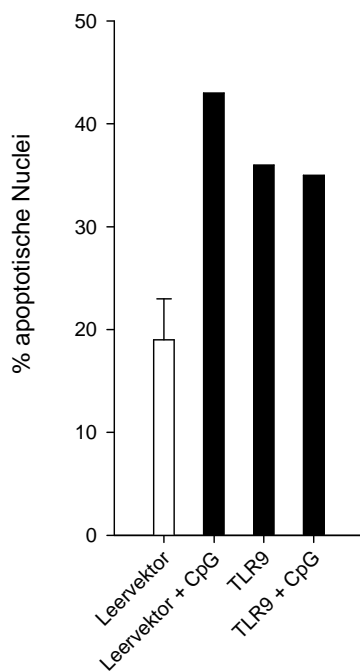


**Abbildung 046.**

LPS, TLR4-Transfektion und TLR4-Transfektion plus LPS-Stimulation in IF6-Zellen induzieren morphologisch Apoptose. IF6-Zellen wurden transient mit TLR4, dem Leervektor pEF sowie dem Vektor LacZ transfiziert (mittels Elektroporation) und für 24h mit dem TLR4-spezifischen Liganden LPS (1µg/ml) co-inkubiert. Die transfizierten Zellen zeigten sich blau gefärbt und wurden mikroskopisch auf morphologische Kennzeichen von Apoptose analysiert. Das Ergebnis „Leervektor“ fasst zwei gleiche Versuchsansätze zusammen, der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. Die Experimente wurden je einmal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

## TLR9

TLR9-Transfektion in IF6-Zellen zeigt ein ähnliches Bild wie TLR4-Transfektion. Der spezifische TLR9-Ligand CpG induziert in Leervektor-transfizierten Zellen stark Apoptose, stärker als nach TLR9-Transfektion mit oder ohne CpG-Stimulus (Abb. 047).



**Abbildung 047.**

CpG, TLR9-Transfektion und TLR9-Transfektion plus CpG-Stimulation in IF6-Zellen induzieren morphologisch Apoptose. IF6-Zellen wurden transient mit TLR9, dem Leervektor pEF sowie dem Vektor LacZ transfiziert (mittels Elektroporation) und für 24h mit dem TLR9-spezifischen Liganden CpG (1µM) co-inkubiert. Die transfizierten Zellen zeigten sich blau gefärbt und wurden mikroskopisch auf morphologische Kennzeichen von Apoptose analysiert. Das Ergebnis „Leervektor“ fasst zwei gleiche Versuchsansätze zusammen, der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. Die Experimente wurden je einmal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

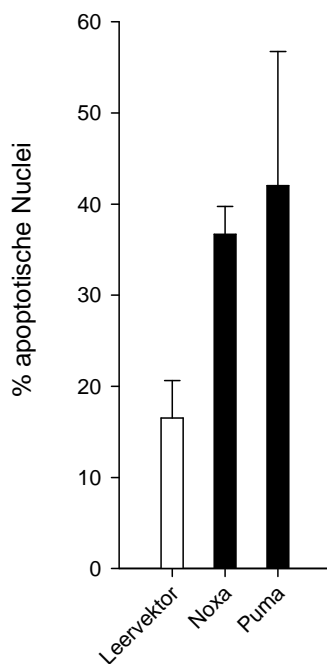


#### 4.03.2.3. Induktion von BH3-only-Proteinen in Melanom-Zellen

Die vorherigen Kapitel zeigen die Fähigkeit von Toll-like-Rezeptor-Liganden zur Apoptose-Induktion in Melanomzellen, wodurch die Frage nach dem Signalweg aufgeworfen wird. Die am häufigsten beschrittene apoptotische Signalkaskade ist der mitochondriale Signalweg mit seinen Initiatoren, den BH3-Proteinen.

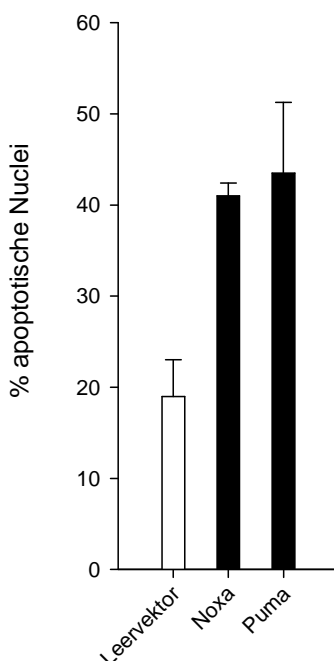
So zeigt die transiente Transfektion der beiden exemplarisch gewählten BH3-only-Proteine Noxa und Puma in Mel526- bzw. IF6-Zellen jeweils klare Apoptose-Induktion (Abb. 048 und Abb. 049).

Abb. 050 und Abb. 051 zeigen Bax als weiteres Protein des mitochondrialen Signalweges downstream der BH3-Ebene transient in Mel526- bzw. IF6-Zellen transfiziert: hier ist



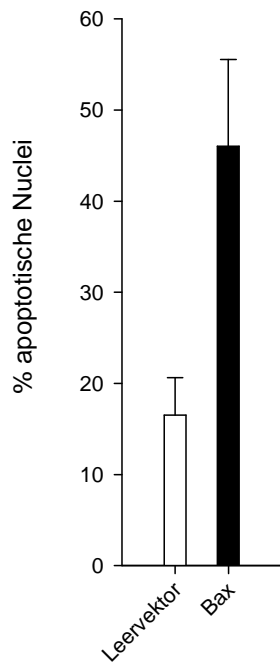
**Abbildung 048.**

Noxa- sowie Puma-Expression induzieren Apoptose in Mel526-Zellen. Mel526-Zellen wurden transient mit jeweils Noxa oder Puma, dem Leervektor pEF sowie dem Vektor LacZ transfiziert (mittels Elektroporation). Die transfizierten Zellen zeigten sich blau gefärbt und wurden mikroskopisch auf morphologische Kennzeichen von Apoptose analysiert. Mittelwerte aus zwei gleichen Versuchsansätzen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Experimente wurden mindestens zweimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.



**Abbildung 049.**

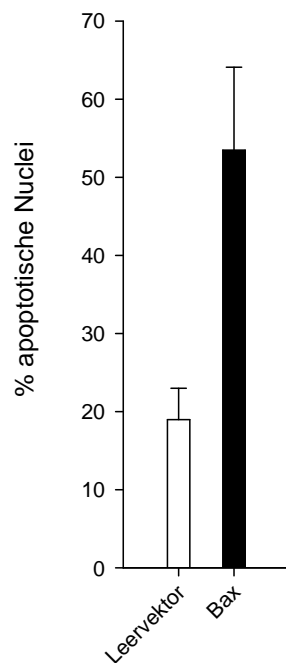
Noxa- sowie Puma-Expression induzieren Apoptose in IF6-Zellen. IF6-Zellen wurden transient mit jeweils Noxa oder Puma, dem Leervektor pEF sowie dem Vektor LacZ transfiziert (mittels Elektroporation). Die transfizierten Zellen zeigten sich blau gefärbt und wurden mikroskopisch auf morphologische Kennzeichen von Apoptose analysiert. Mittelwerte aus zwei gleichen Versuchsansätzen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Experimente wurden je zweimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.



**Abbildung 050.**

Bax-Expression induziert Apoptose in Mel526-Zellen.

Mel526-Zellen wurden transient mit Bax, dem Leervektor pEF sowie dem Vektor LacZ transfiziert (mittels Elektroporation). Die transfizierten Zellen zeigten sich blau gefärbt und wurden mikroskopisch auf morphologische Kennzeichen von Apoptose analysiert. Mittelwerte aus zwei gleichen Versuchsansätzen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Experimente wurden mindestens zweimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.



**Abbildung 051.**

Bax-Expression induziert Apoptose in IF6-Zellen.

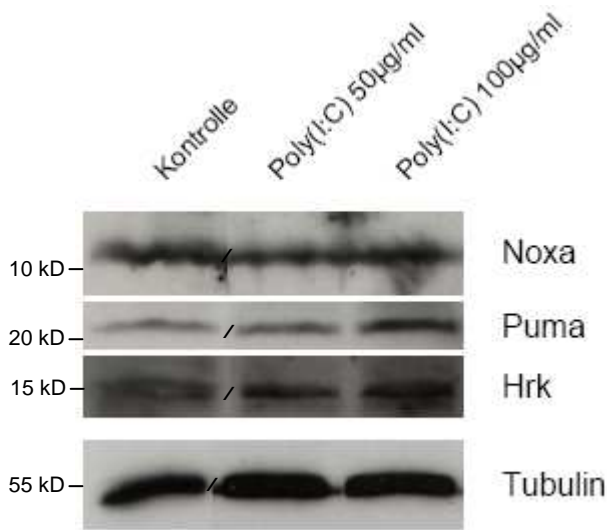
IF6-Zellen wurden transient mit Bax, dem Leervektor pEF sowie dem Vektor LacZ transfiziert (mittels Elektroporation). Die transfizierten Zellen zeigten sich blau gefärbt und wurden mikroskopisch auf morphologische Kennzeichen von Apoptose analysiert. Mittelwerte aus zwei gleichen Versuchsansätzen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Experimente wurden je zweimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

ebenfalls jeweils klare Apoptose-Induktion zu sehen.

Somit scheinen die strukturellen Voraussetzungen für den Ablauf des mitochondrialen Signalweges der Apoptose in den Melanom-Zelllinien Mel526 und IF6 gegeben zu sein.

Um das „natürliche“ Vorhandensein von BH3-Proteinen in Melanom-Zellen zu testen, werden in den Experimenten zu Abb. 052 Mel526-Zellen jeweils unbehandelt bzw. mit Poly(I:C) stimuliert auf die Expression von BH3-Proteinen untersucht. Poly(I:C) kann Noxa nicht vermehrt induzieren. Puma und Hrk werden durch Poly(I:C)-Behandlung geringfügig

nach oben reguliert. Auffällig ist vor allem bei Noxa, dass sich schon in unbehandelten Mel526-Zellen eine Expression zeigt.



**Abbildung 052.**

Keine Induktion des BH3-only-Proteins Noxa, geringfügige Induktion von Puma und Hrk durch Poly(I:C)-Behandlung. Mel526-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Kontrolle: unbehandelt), dann wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden im Western Blot dargestellt. Tubulin diente als Ladungskontrolle. Das Symbol / zwischen den Banden kennzeichnet Bereiche, an denen digitale Schnitte erfolgten. Die Experimente wurden je dreimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

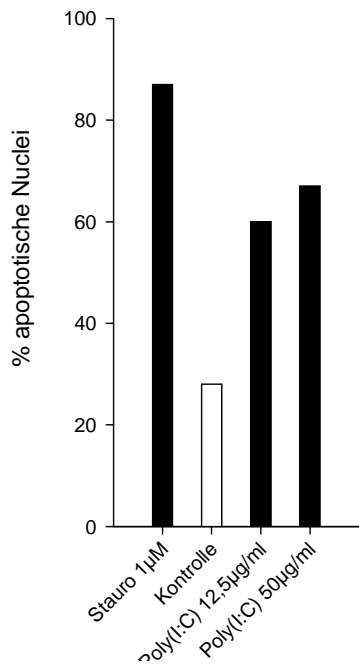
#### 4.03.3. Beteiligung weiterer Signalwege

Die Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zelltod und vielen weiteren zellulären Vorgängen unterliegt einer großen Anzahl von komplexen Systemen, von denen die Apoptose-spezifischen als Todesrezeptor- und mitochondrialer Signalweg bezeichnet werden. Weniger bekannt sind derzeit Verknüpfungsmechanismen dieser „klassischen“ Apoptose-Kaskaden mit anderen Signalwegen, die ebenfalls zelluläre Vorgänge regulieren.

In den nächsten Kapiteln soll zu den Kernfragen dieser Arbeit mit der Verflechtung von Toll-like-Rezeptor-Signaltransduktion und Apoptose-Mechanismen die Verknüpfung mit weiteren Signalwegen untersucht werden. Alle drei in den folgenden Kapiteln besprochenen Proteine (PKR, ERK, MyD88) und deren Funktionsmechanismen werden in der Literatur bereits mit Toll-like-Rezeptoren und/oder Apoptose in Verbindung gebracht.

##### 4.03.3.1. Die double-stranded RNA-activated Proteinkinase PKR

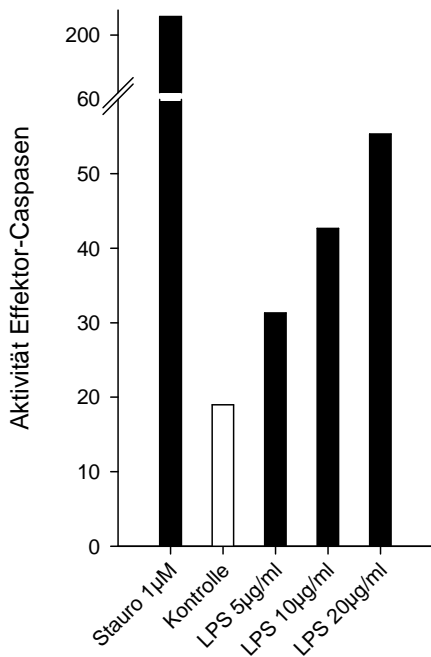
Die Zugabe der TLR3- und TLR4-Liganden Poly(I:C) und LPS als Apoptose-Stimulus zu PKR<sup>+/+</sup> Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs; sicher PKR-exprimierende Zellen) zeigt (neben der Positivkontrolle Staurosporin) für LPS eine schwache, für Poly(I:C) eine starke Apoptose-Induktion (Abb. 053 und Abb. 054).



**Abbildung 053.**

Apoptose-Induktion durch Poly(I:C) in PKR-exprimierenden Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs).

PKR-exprimierende Mouse Embryonic Fibroblasts wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Stauro: Staurosporin; Kontrolle: unbehandelt), die Kernmorphologie durch Hoechst-Färbung und mikroskopische Analyse beurteilt. Die Experimente wurden je einmal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

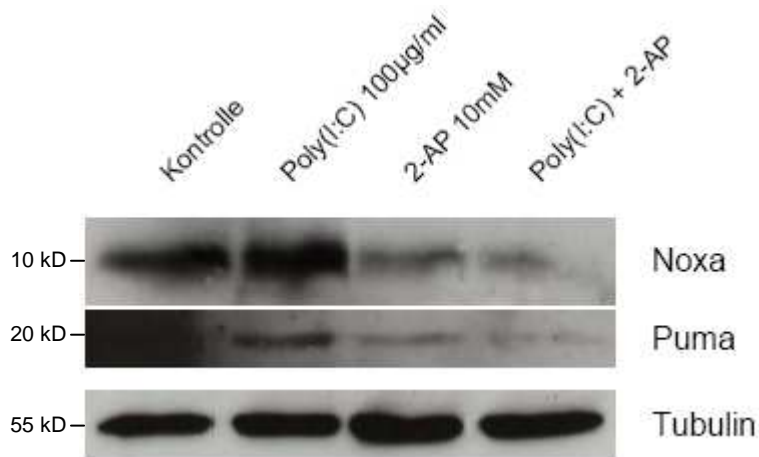


**Abbildung 054.**

LPS induziert schwach Apoptose in PKR-exprimierenden Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs).

PKR-exprimierende Mouse Embryonic Fibroblasts wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Stauro: Staurosporin; Kontrolle: unbehandelt), lysiert, die Zellextrakte mit DEVD-Probenpuffer inkubiert und freies AMC als Aktivitätsparameter für Effektor-Caspasen gemessen. Die gezeigten Werte sind Durchschnittswerte von Dreifachmessungen minus Durchschnittswert (ebenfalls Dreifachmessung) des Probenpuffers. Die Experimente wurden je zweimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

Im nächsten Schritt werden Poly(I:C)-stimulierte HaCaT-Zellen mit dem PKR-Inhibitor 2-Aminopurine (2-AP) behandelt. Abb. 055 zeigt sowohl für Noxa als auch Puma eine 2-AP-bedingte Abnahme der Expression nach Poly(I:C)-Behandlung. Poly(I:C) ohne 2-AP zeigt im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen klare Noxa-Induktion.



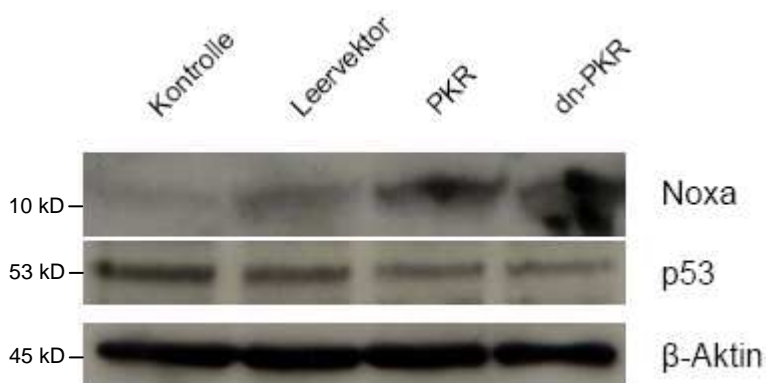
**Abbildung 055.**

Noxa-Induktion in HaCaT-Zellen durch Poly(I:C), geblockt durch den PKR-Inhibitor 2-AP.

HaCaT-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (2-AP: 2-Aminopurine; Kontrolle: unbehandelt), dann wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden im Western Blot dargestellt. Tubulin diente als Ladungskontrolle.

Die Experimente wurden je einmal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

In den Experimenten zu Abb. 056 werden HaCaT-Zellen mit PKR<sup>+/+</sup>, sowie dominant negativen PKR-Vektoren transfiziert. PKR-(Über-)Expression zeigt dabei eine vermehrte Noxa-, jedoch nicht p53-Induktion, ebenso wie bei Zellen mit dn-PKR-transfizierten Vektoren.



**Abbildung 056.**

Noxa-Induktion in HaCaT-Zellen durch PKR<sup>+/+</sup> - sowie dn-PKR-Vektor-Transfektion.

HaCaT-Zellen wurden wie gezeigt transient transfiziert (mittels Elektroporation; Leervektor pEF; Kontrolle: unbehandelt), 24h inkubiert, dann wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden im Western Blot dargestellt. β-Aktin diente als Ladungskontrolle. Die Experimente wurden mindestens je fünfmal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

#### 4.03.3.2. Die MAP-Kinase ERK

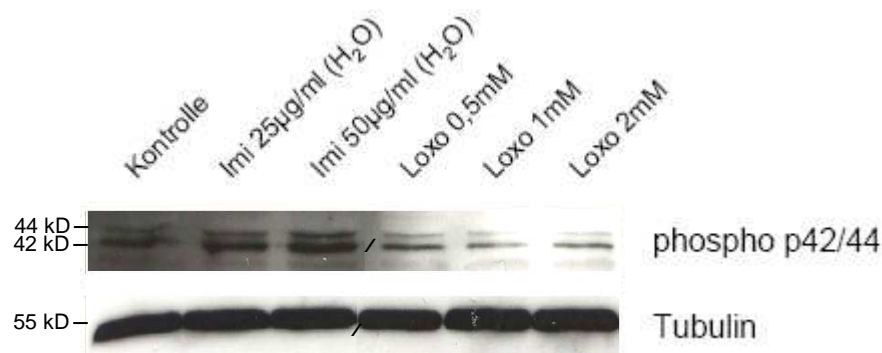
Mitogen-activated Protein Kinasen (MAP-Kinasen, MAPKs) sind eukaryontische Serin/Threonin-Kinasen, die Rezeptoren der Zelloberfläche mit Regulationsmechanismen innerhalb der Zelle verbinden (Chang & Karin, 2001). Dabei sind sie hauptsächlich an zellulärer Proliferation, Differenzierung, Altern und Apoptose beteiligt (Dent et al, 2003). Die bekanntesten Untergruppen der MAP-Kinasen sind vereinfacht extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1 und 2, p38-Kinase (p38) und c-Jun N-terminal kinase (JNK). Für eine detaillierte Übersicht siehe (Turjanski et al, 2007).

Die Beteiligung von MAP-Kinasen an Apoptose-Regulation wird diskutiert. Während ursprünglich von einer antiapoptotischen Rolle bei ERK sowie proapoptotischen Eigenschaften bei p38 und JNK ausgegangen wurde (Xia et al, 1995), zeigen aktuellere Arbeiten zwar weiterhin einen antiapoptotischen Einfluss von ERK, gestehen p38 und JNK jedoch situationsabhängig beide Möglichkeiten zu: Pro- sowie antiapoptotisch regulatorisch wirksam zu sein (Wada & Penninger, 2004).

### HaCaT und die Immunregulatoren Imiquimod, Loxoribin

Im Folgenden soll die Aktivierung von ERK1/2 in HaCaT-Zellen nach Behandlung mit Imiquimod und Loxoribin analysiert werden. Durch die Masse der beiden Proteine ERK2 und ERK1 mit 42kDa und 44kDa werden diese auch als p42/44 zusammengefasst. Die MAPK/ERK-Kinase (MEK) phosphoryliert sehr eng substrat-spezifisch ERK1/2, welche dadurch aktiviert werden (Scheid et al, 1999).

Abb. 057 zeigt in HaCaT-Zellen keine vermehrte Phosphorylierung von p42/44 nach Imiquimod- oder Loxoribin-Behandlung. Das phosphorylierte Protein ist bereits in unbehandelten Zellen vorhanden und nimmt nach Loxoribin-Behandlung sogar etwas an Expression ab.

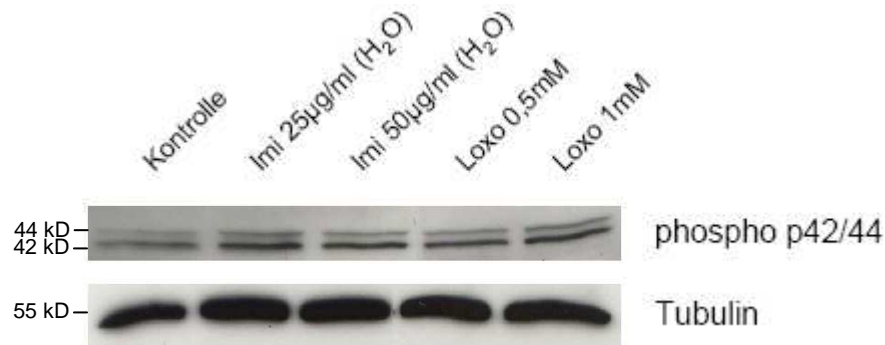


**Abbildung 057.**

Keine vermehrte Phosphorylierung von p42/44 in HaCaT-Zellen nach Behandlung mit Imiquimod und Loxoribin. HaCaT-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Imi: Imiquimod, gelöst in sterilem Wasser; Loxo: Loxoribin; Kontrolle: unbehandelt), dann wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden im Western Blot dargestellt. Tubulin diente als Ladungskontrolle. Das Symbol / zwischen den Banden kennzeichnet Bereiche, an denen digitale Schnitte erfolgten.

### Mel526 und die Immunregulatoren Imiquimod, Loxoribin

Abb. 058 zeigt denselben Versuchsaufbau in Melanomzellen wie Abb. 057 in HaCaT-Zellen. Der direkte Vergleich zeigt in Mel526-Zellen ebenfalls keine Induktion von phosphoryliertem p42/44, weder nach Imiquimod-, noch nach Loxoribin-Behandlung.



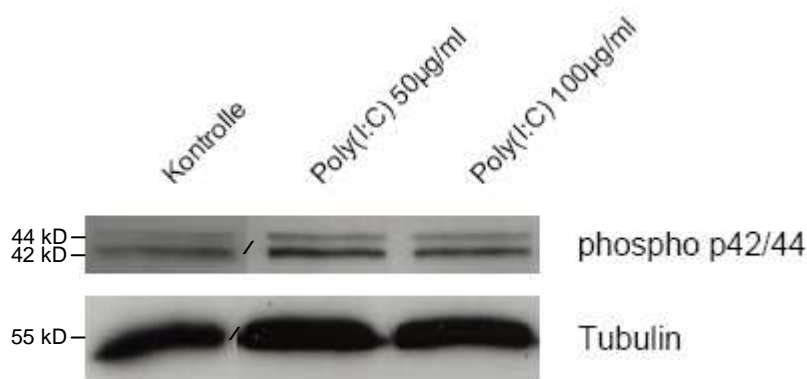
**Abbildung 058.**

Keine Phosphorylierung von p42/44 in Mel526-Zellen nach Behandlung mit Imiquimod und Loxoribin. Mel526-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Imi: Imiquimod, gelöst in sterilem Wasser; Loxo: Loxoribin; Kontrolle: unbehandelt), dann wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden im Western Blot dargestellt. Tubulin diente als Ladungskontrolle.

### Mel526 und der TLR3-Ligand Poly(I:C)

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Rolle der MAP-Kinasen p42/44 (= ERK1/2) in HaCaT- bzw. Mel526-Zellen nach Stimulation durch die Immunregulatoren und TLR7-Liganden Imiquimod und Loxoribin gezeigt. Nun soll an Mel526-Zellen nach Poly(I:C)-Stimulation die Beteiligung von p42/44 überprüft werden. Abb. 059 zeigt die Expression von p42/44 in Mel526-Zellen mit und ohne Poly(I:C)-Stimulierung.

Wie schon nach Imiquimod- und Loxoribin-Behandlung bewirkt auch Poly(I:C) in Mel526-Zellen keine Phosphorylierung von p42/44.

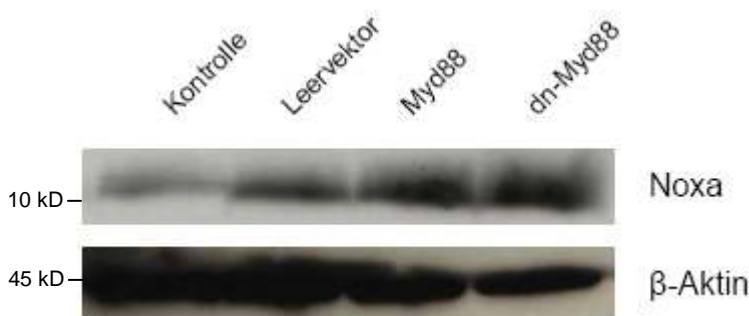


**Abbildung 059.**

Keine Phosphorylierung von p42/44 in Mel526-Zellen nach Behandlung mit Poly(I:C) bei schon vorhandener Expression in unbehandelten Zellen. Mel526-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Kontrolle: unbehandelt), dann wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden im Western Blot dargestellt. Tubulin diente als Ladungskontrolle. Das Symbol / zwischen den Banden kennzeichnet Bereiche, an denen digitale Schnitte erfolgten.

#### 4.03.3.3. Der Toll-like-Rezeptor-Adapter MyD88

Um zu prüfen, ob eine Noxa-Induktion in HaCaT-Zellen MyD88-Abhängigkeit zeigt, werden MyD88<sup>+/+</sup>- sowie MyD88-dn-Vektoren transient in HaCaT-Zellen transfiziert und die Menge der Noxa-Expression wird per Westernblot analysiert. In Abb. 060 zeigt sich MyD88-Expression als schwach Noxa-induzierend, jedoch ebenso MyD88-dn-Expression. Anhand dieses Ergebnisses kann demnach eine MyD88-abhängige Noxa-Expression weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.



**Abbildung 060.**

Noxa-Induktion in HaCaT-Zellen durch Leervektor, Myd88<sup>+/+</sup>- sowie dn-Myd88-Vektor-Transfektion. HaCaT-Zellen wurden wie gezeigt transient transfiziert (mittels Elektroporation; Leervektor pEF; Kontrolle: unbehandelt), 24h inkubiert, dann wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden im Western Blot dargestellt. β-Aktin diente als Ladungskontrolle. Die Experimente wurden mindestens je fünfmal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

#### 4.03.4. Die Monozyten-Zelllinie MonoMac6

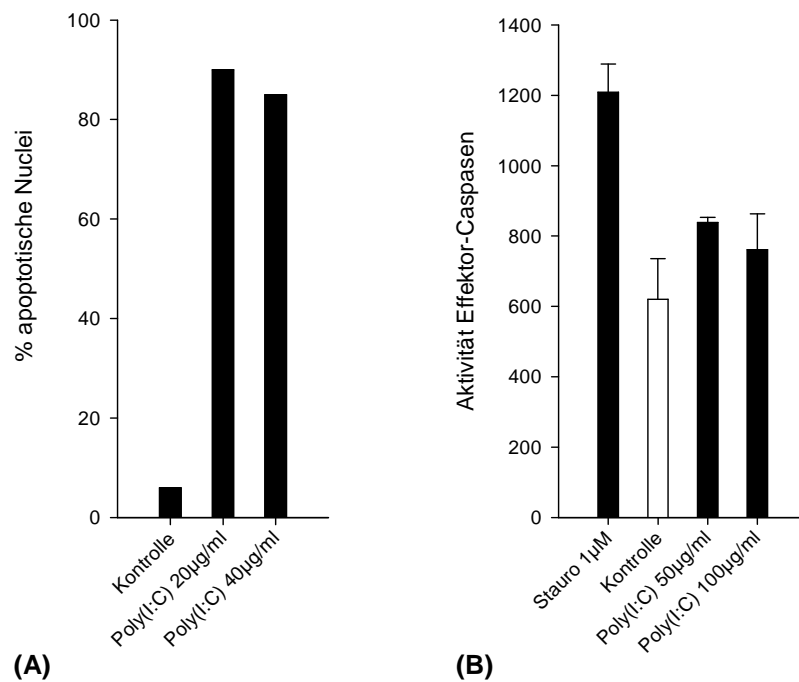
Monozyten exprimieren nahezu alle TLRs, TLR3 jedoch nur in geringem Ausmaß (Muzio et al, 2000; Takeda et al, 2003). Daher wurde die Monozyten-Zelllinie MonoMac6 für die folgenden Versuche gewählt, es handelt sich um eine alle TLRs-exprimierende, leicht zu kultivierende, menschliche Zelllinie.

##### 4.03.4.1. Apoptose-Induktion durch Poly(I:C) und LPS in MonoMac6-Zellen

###### **Nachweis**

Wie in Kapitel 4.03.1. gezeigt induzieren die Toll-like-Rezeptor-Liganden Poly(I:C) und LPS in den Keratinozyten HaCaT Apoptose. Um Poly(I:C)- und LPS-induzierte Apoptose in MonoMac6-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen für je 24h mit den jeweiligen Stimuli behandelt und dann auf Apoptose-Zeichen untersucht. Die Abb. 061 (A) und 062 (A) zeigen den morphologischen Apoptose-Nachweis nach Poly(I:C)- (Abb. 061) und LPS-Behandlung (Abb. 062). Dazu wird in den Versuchen zu Abb. 061 (B) und 062 (B) die Effektor-Caspasen-Aktivität gemessen, wobei sich ein weiterer Nachweis für Apoptose nach Poly(I:C)- (Abb. 061) und LPS-Behandlung (Abb. 062) zeigt.



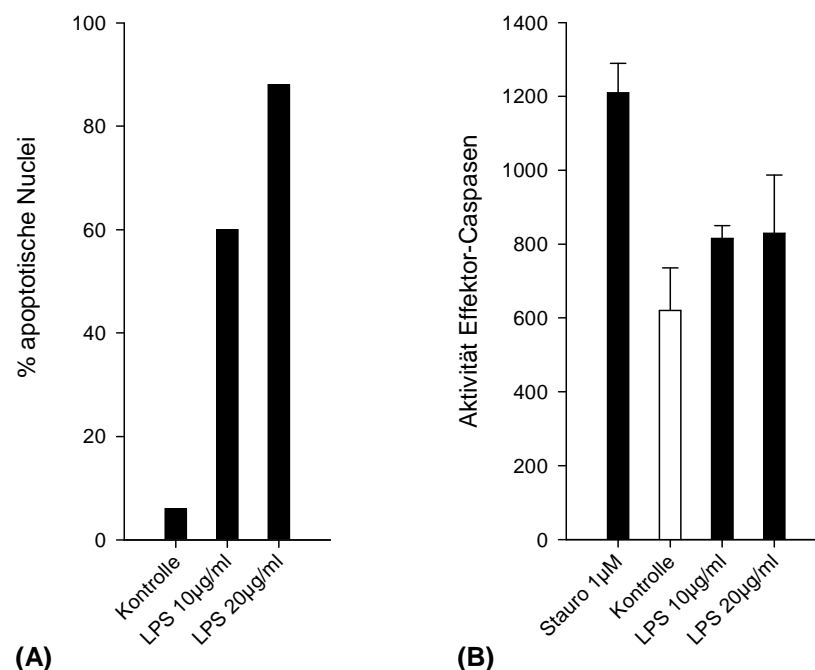


**Abbildung 061.**

Poly(I:C) induziert Apoptose in MonoMac6-Zellen.

(A) MonoMac6-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Kontrolle: unbehandelt), die Kernmorphologie wurde durch Hoechst-Färbung und mikroskopische Analyse beurteilt. Die Experimente wurden je dreimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

(B) MonoMac6-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Stauro: Staurosporin; Kontrolle: unbehandelt), lysiert, die Zellextrakte mit DEVD-Probenpuffer inkubiert und freies AMC als Aktivitätsparameter für Effektor-Caspasen gemessen. Die gezeigten Werte sind Durchschnittswerte von Dreifachmessungen minus Durchschnittswert (ebenfalls Dreifachmessung) des Probenpuffers. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Experimente wurden je dreimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.



**Abbildung 062.**

LPS induziert Apoptose in MonoMac6-Zellen.

(A) MonoMac6-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Kontrolle: unbehandelt), die Kernmorphologie wurde durch Hoechst-Färbung und mikroskopische Analyse beurteilt. Die Experimente wurden je dreimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

(B) MonoMac6-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Stauro: Staurosporin; Kontrolle: unbehandelt), lysiert, die Zellextrakte mit DEVD-Probenpuffer inkubiert und freies AMC als Aktivitätsparameter für Effektor-Caspasen gemessen. Die gezeigten Werte sind Durchschnittswerte von Dreifachmessungen minus Durchschnittswert (ebenfalls Dreifachmessung) des Probenpuffers. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Experimente wurden je dreimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

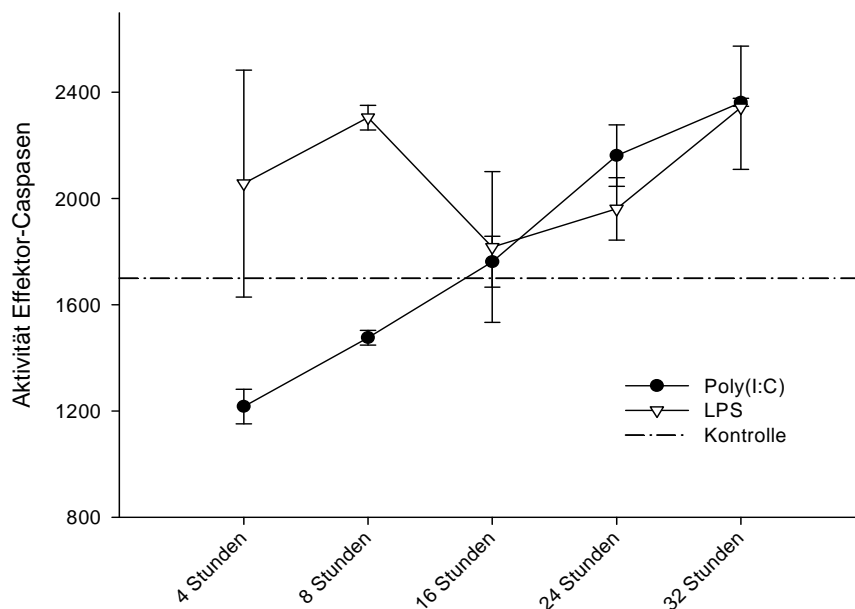
Aus den einzelnen Wiederholungen der DEVD-Experimente (Messung der Effektor-Caspasen-Aktivität) lässt sich von einer höheren Empfindlichkeit der MonoMac6-Zellen gegenüber LPS berichten, verglichen mit Poly(I:C).

### Kinetik

Um die apoptotische Wirkung von Poly(I:C) und LPS in MonoMac6-Zellen über die Zeit zu prüfen, wird wie in Abb. 063 gezeigt Poly(I:C) und LPS mit den Zellen inkubiert und zu den Zeitpunkten 4, 8, 16, 24 und 32 Stunden die Effektor-Caspasen-Aktivität analysiert.

LPS induziert schon zu den beiden ersten Zeitpunkten Apoptose im Maximalbereich. Interessanterweise liegt die Caspasen-Aktivität nach Poly(I:C)-Behandlung erst nach 16h über dem Wert für unbehandelte Kontrollzellen, zu den früheren Zeitpunkten induziert Poly(I:C) keine Apoptose. Nach 16h steigen die Apoptose-Raten bei beiden Stimuli stetig.

Vergleicht man die Aktivitätsraten der Effektor-Caspasen in diesem Versuch mit denen der Versuche zu Abb. 061 und Abb. 062, so fällt deutlich erhöhte Aktivität in Abb. 063 auf. Dies erklärt sich vermutlich dadurch, dass die Zellen bei dem Kinetik-Versuch zu Abb. 063 nach den festgelegten Zeitpunkten geerntet und dann kryokonserviert wurden, um zu einem späteren Zeitpunkt gesammelt auf Caspasenaktivität gemessen zu werden. Es ist wahrscheinlich, dass durch diese Manipulation Caspasenaktivität durch auto-katalytische Vorgänge oder durch die Aktivierung von Caspasen durch weitere proteolytische Enzyme der Zellen erhöht wurde.



**Abbildung 063.**

Poly(I:C) und LPS zeigen nach 16h apoptotische Wirkung, davor nur LPS, danach beide verstärkt. MonoMac6-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Poly(I:C) 100µg/ml, LPS 20µg/ml; Kontrolle: unbehandelte Zellen nach 32h), lysiert, die Zellextrakte mit DEVD-Probenpuffer inkubiert und freies AMC als Aktivitätsparameter für Effektor-Caspasen gemessen. Die gezeigten Werte sind Durchschnittswerte von Dreifachmessungen minus Durchschnittswert (ebenfalls Dreifachmessung) des Probenpuffers. Die Fehlerbalken zeigen die maximale Abweichung vom Mittelwert.

#### 4.03.4.2. BH3-only-Proteine und der p38-Inhibitor SB203580

Die MAP-Kinase p38 verbindet durch regulatorische Funktion Zelloberflächen mit intrazellulären Signalwegen.

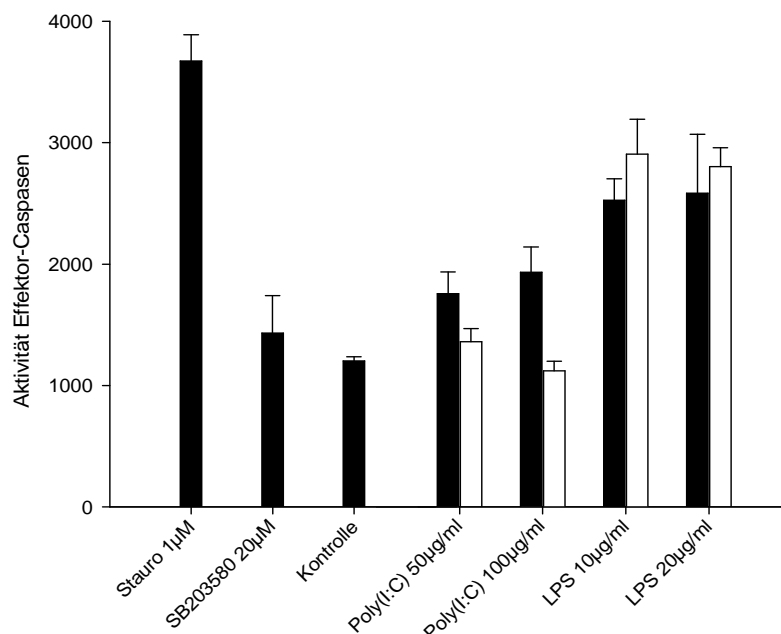
Ob p38 nach Stimulation mit den Toll-like-Rezeptor-Liganden Poly(I:C) und LPS in MonoMac6-Zellen aktiv auf die Induktion von Apoptose wirkt, sollen die folgenden Experimente mit dem p38-Inhibitor SB203580 zeigen.

SB203580, ein Pyridinyl-Imidazol, bindet kompetitiv an der ATP-Bindungsstelle von p38 und inhibiert so die MAP-Kinase spezifisch (Wilson et al, 1997).

#### Wirksamkeit von SB203580 in Poly(I:C)- und LPS-behandelten MonoMac6-Zellen

Abb. 064 zeigt Untersuchungen zur Apoptose-Induktion in MonoMac6-Zellen durch Poly(I:C) und LPS mit (weiße Balken) und ohne (schwarze Balken) Zugabe von SB203580. Es zeigt sich einerseits eine minimale Eigentoxizität von SB203580 in der verwendeten Konzentration von 20 $\mu$ M gegenüber unbehandelten Kontrollzellen, andererseits aber eine klare Reduktion von Effektor-Caspasen-Aktivität (Apoptose) bei SB203580-Zugabe zu Poly(I:C)-behandelten Zellen.

LPS-Behandlung hingegen bewirkt stärkere Apoptose-Induktion als Poly(I:C), ist durch SB203580 jedoch nicht antagonisierbar.



**Abbildung 064.**

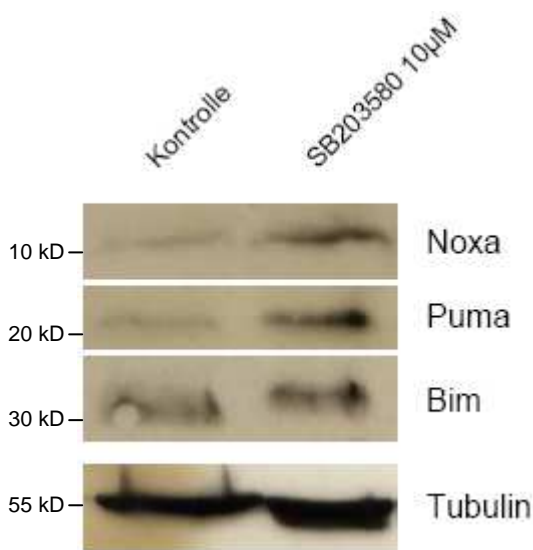
Reduktion der Effektor-Caspasen-Aktivität nach Zugabe von SB203580 zu Poly(I:C)-, jedoch nicht zu LPS-behandelten MonoMac6-Zellen.

MonoMac6-Zellen wurden wie gezeigt behandelt (Stauro: Staurosporin; Kontrolle: unbehandelte Zellen; schwarze Balken: Poly(I:C), LPS je 48h; weiße Balken: SB203580-Zugabe, 20 $\mu$ M), lysiert, die Zellextrakte mit DEVD-Probenpuffer inkubiert und freies AMC als Aktivitätsparameter für Effektor-Caspasen gemessen. Die gezeigten Werte sind Durchschnittswerte von Dreifachmessungen minus Durchschnittswert (ebenfalls Dreifachmessung) des Probenpuffers. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Experimente wurden je dreimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

Demnach weisen die Experimente zu Abb. 064 auf p38-abhängige Apoptose-Induktion nach Poly(I:C)-Stimulation, jedoch nicht nach LPS-Stimulation, hin.

#### Expression von BH3-only-Proteinen nach SB203580-Einwirkung

Oben (Abb. 064) zeigt der p38-Inhibitor SB203580 in MonoMac6-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen eine leichte Mehr-Aktivität der Effektor-Caspasen, ein Hinweis für die Apoptose-auslösende Potenz der Substanz. Die BH3-Proteine Noxa und Puma (sowie Bim in geringem Maße) zeigen sich nach SB203580-Behandlung in den analysierten MonoMac6-Zellen klar induziert (Abb. 065).



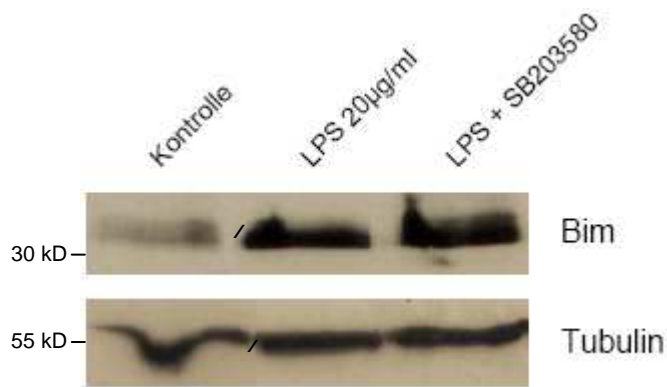
**Abbildung 065.**

SB203580 induziert die BH3-Proteine Noxa und Puma in MonoMac6-Zellen, nicht jedoch Bim.

MonoMac6-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Kontrolle: unbehandelt), dann wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden im Western Blot dargestellt. Tubulin diente als Ladungskontrolle.

Diese Beobachtung (BH3-induzierende Potenz von SB203580) dient als Hintergrund für die folgenden Versuche: MonoMac6-Zellen werden mit den Toll-like-Rezeptor-Liganden LPS sowie Poly(I:C) stimuliert, mit SB203580 co-inkubiert und die Menge an exprimierten BH3-Proteinen im Vergleich zu unbehandelten Zellen untersucht.

Die Induktion des BH3-Proteins Bim (Abb. 066) wird durch LPS-Einwirkung (alleine) deutlich gesteigert, LPS mit dem p38-Inhibitor SB203580 zusammen inkubiert bleibt ohne weitere Konsequenz. Dies ist ein Hinweis für die p38-unabhängige Bim-Induktion durch LPS-Stimulation.

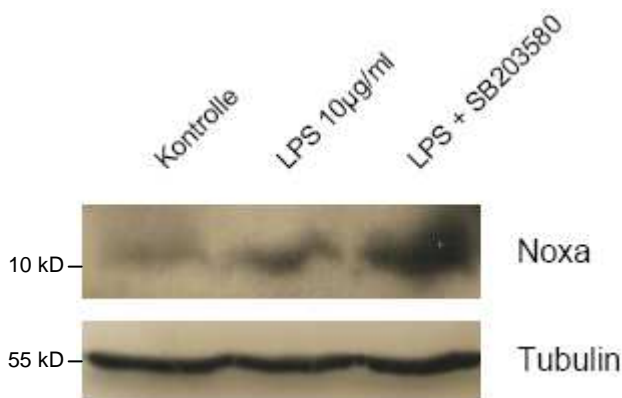


**Abbildung 066.**

LPS induziert Bim-Expression in MonoMac6-Zellen, Zugabe von SB203580 verändert diese nicht.

MonoMac6-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Kontrolle: unbehandelt; SB203580 10µM), dann wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden im Western Blot dargestellt. Tubulin diente als Ladungskontrolle. Das Symbol / zwischen den Banden kennzeichnet Bereiche, an denen digitale Schnitte erfolgten. Die Experimente wurden mindestens je zweimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

Ähnliches zeigt sich bei dem BH3-Protein Noxa, welches in MonoMac6-Zellen durch LPS induziert wird. Diese Induktion ist ebenfalls durch den p38-Blocker SB203580 nicht antagonisierbar (Abb. 067).



**Abbildung 067.**

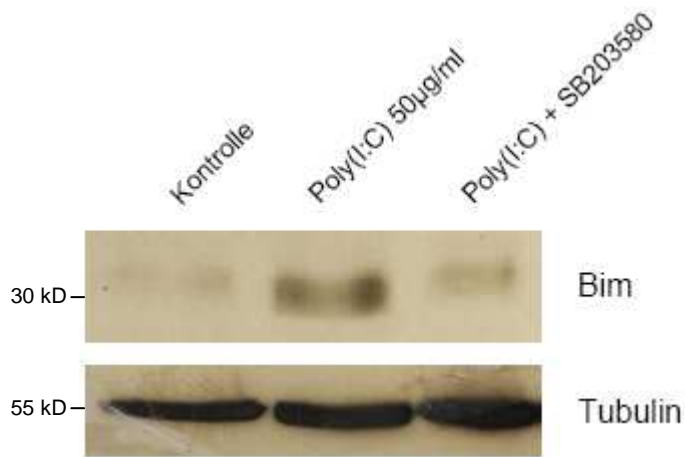
LPS induziert Noxa-Expression in MonoMac6-Zellen, Zugabe von SB203580 erhöht diese.

MonoMac6-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Kontrolle: unbehandelt; SB203580 10µM), dann wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden im Western Blot dargestellt. Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die Experimente wurden mindestens je zweimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt. In nicht abgebildeten Blots zeigte sich das identische Ergebnis mit der LPS-Konzentration 20µg/ml.

Anders ist die Situation nach Poly(I:C)-Behandlung:

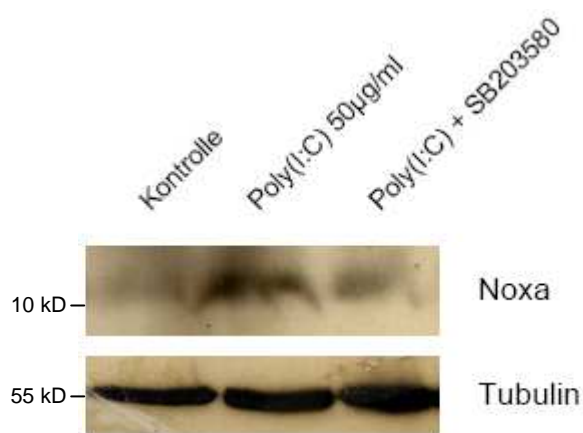
MonoMac6-Zellen zeigen nach Inkubation mit dem TLR3-Liganden zwar ebenfalls eine verstärkte Bim- (Abb. 068) sowie Noxa-Induktion (Abb. 069), diese hat jedoch nach Zugabe von SB203580 ein ähnlich niedriges Level wie in unbehandelten Kontrollzellen. Der p38-Blocker wirkt damit negativ auf die Bim- sowie Noxa-Induktion in MonoMac6-Zellen nach Poly(I:C)-Stimulation.

Dies legt den Schluss nahe, in p38 ein Schlüsselenzym bei der TLR3-abhängigen Bim- sowie Noxa-Induktion in MonoMac6-Zellen zu sehen.



**Abbildung 068.**

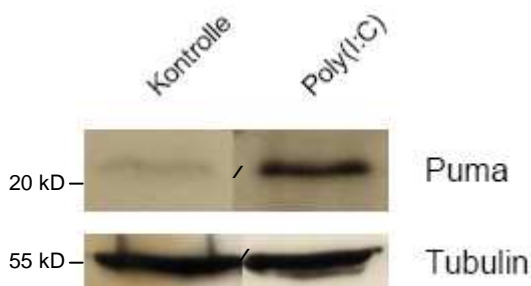
Poly(I:C) induziert Bim-Expression in MonoMac6-Zellen, die Zugabe von SB203580 verringert diese. MonoMac6-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Kontrolle: unbehandelt; SB203580 10µM), dann wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden im Western Blot dargestellt. Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die Experimente wurden mindestens je zweimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.



**Abbildung 069.**

Poly(I:C) induziert Noxa-Expression in MonoMac6-Zellen, die Zugabe von SB203580 verringert diese. MonoMac6-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Kontrolle: unbehandelt; SB203580 10µM), dann wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden im Western Blot dargestellt. Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die Experimente wurden mindestens je zweimal wiederholt und die Ergebnisse dabei bestätigt.

Puma als ein weiteres BH3-Protein lässt sich durch Poly(I:C) in MonoMac6-Zellen zwar induzieren (Abb. 070), jedoch zeigen weder Co-Inkubationen mit LPS noch mit SB203580 eine klare Änderung (Abb. nicht gezeigt).



**Abbildung 070.**

Poly(I:C) induziert Puma-Expression in MonoMac6-Zellen. MonoMac6-Zellen wurden wie gezeigt für 24h behandelt (Kontrolle: unbehandelt; Poly(I:C) 50µg/ml), dann wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden im Western Blot dargestellt. Tubulin diente als Ladungskontrolle. Das Symbol / zwischen den Banden kennzeichnet Bereiche, an denen digitale Schnitte erfolgten.

## 5. Diskussion

### 5.01. Apoptose und der Toll-like-Rezeptor 9

Toll-like-Rezeptoren als Vermittler von Immunantworten auf mikrobielle Reize zeigen in einer zunehmenden Anzahl von Berichten die Fähigkeit Apoptose zu induzieren. Dieser Gedanke ist naheliegend, da Apoptose als eigenständige Reaktion auf etwa bakterielle oder virale Infektionen bereits klar gezeigt ist (siehe Kapitel 1.06., Kapitel 1.23.). Der Nachweis von Apoptose als Teil einer Immunreaktion, vermittelt durch Toll-like-Rezeptoren, deutet sich bisher in Einzelberichten an. Eine Bestätigung und Erweiterung dieser Berichte soll diese Arbeit geben.

#### 5.01.1. Toll-like-Rezeptoren

Das Adapter-Protein MyD88 wird von allen Toll-like-Rezeptoren benutzt, mit einer Ausnahme: TLR3. Bei TLR9-Signalen ist eine zelluläre Reaktion vollständig von MyD88 abhängig (Wagner, 2004), bei zumindest TLR4 (und möglicherweise weiteren Toll-like-Rezeptoren) kann auch in MyD88-dn-Mäusen eine, wenn auch gemäßigte, Reaktion hervorgerufen werden (Kawai et al, 1999). TLR2-Liganden können Apoptose über FADD, Caspase-8 sowie MyD88 (Aliprantis et al, 2000) induzieren.

Da fast alle Toll-like-Rezeptoren über MyD88 signalisieren, liegt die Idee nahe, dass alle MyD88-abhängigen Toll-like-Rezeptoren die Fähigkeit zur Apoptose-Induktion besitzen könnten.

TLR9 als ausschließlich MyD88-abhängiger Toll-like-Rezeptor wurde für diese Arbeit exemplarisch ausgewählt.

293(human embryonic kidney fibroblast)-Zellen fehlt TLR2, jedoch reagiert die Zelle auf dessen Liganden nach stabiler Transfektion des Rezeptors (Kirschning et al, 1998). Um diese Beobachtung für TLR9 zu bestätigen, werden 293-Zellen mit humanem oder murinem TLR9 stabil transfiziert (Bauer et al, 2001) und nach Stimulation durch CpG-DNA auf Apoptose untersucht. Ein Klon (3.1) zeigt eine eher schwache (nach 48h 10-40%) apoptotische Antwort (Fischer et al, 2005). Die Ergebnisse der Versuche mit diesem Klon werden im Folgenden diskutiert.

### 5.01.2. Apoptose-Induktion durch TLR9

Apoptose-Induktion durch TLR9 scheint Zelltyp-abhängig zu sein. So kann CpG-DNA in RAW-Makrophagen im Vergleich zu einem Fibroblasten-Klon keine Apoptose induzieren, in 293-Zellen (Klon 3.1) nur schwach (Fischer et al, 2005), deutlich schwächer als durch TLR4 oder TLR2. Eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (downstream im MyD88-Signalweg lokalisiert) kann Apoptose verhindern (Liu et al, 1996), die Blockierung von NF $\kappa$ B in RAW-Zellen durch den Proteasom-Inhibitor MG132 steigert die Zahl der apoptotischen Zellen nach TLR2 und TLR4-Stimulierung, nicht jedoch nach TLR9-Aktivierung (Fischer et al, 2005).

### 5.01.3. Sensibilisierung für Apoptose

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen für TLR9 einerseits die Fähigkeit, schwach Apoptose zu induzieren, und andererseits die Kapazität, Zellen für Apoptose zu sensibilisieren (Abb. 021). Diese Sensibilisierung des Fibroblasten-Klons durch CpG-DNA für UV-induzierte Apoptose kann jedoch in RAW-Makrophagen nicht gezeigt werden (Fischer et al, 2005). Es muss sich daher um eine Zelltyp-spezifische Induktion von pro-apoptotischen Genen handeln. Ebenso scheinen die Zellen nur für einige, jedoch nicht alle Apoptosestimuli sensibilisiert zu werden. Eine Zelltyp-spezifische Apoptoseinduktion ist durchaus typisch, etwa benötigen Fibroblasten bei durch DNA-Schäden induzierter Apoptose das BH3-Protein Noxa, nicht jedoch Lymphozyten (Villunger et al, 2003).

Bei der Apoptose-Induktion sowie -Sensibilisierung ergeben sich deutliche Unterschiede in der Signalkette von TLR2 und TLR9. Beide scheinen in ihrer Signaltransduktion zwar exklusiv abhängig von MyD88 zu sein, jedoch induziert TLR2 stärker Apoptose und scheint dies, anders als TLR9, über Caspase-8 zu tun: Die Bax-Aktivierung kann durch einen Caspasen-Hemmstoff bei TLR9-Induktion nicht unterbunden werden (Abb. 019). Damit ist, anders als bei TLR2, von einer Caspase-8-unabhängigen Cytochrom c-Freisetzung auszugehen.

BH3-Proteine zeigen nach TLR9-Stimulation keine vermehrte Induktion (Abb. 022). Dies spricht gegen die „klassische“ Aktivierung des mitochondrialen Signalweges, bei dem BH3-Proteine als Auslöser agieren. Bim, Noxa oder Puma können alle durch de novo-Expression reguliert werden, und ein Rückgang von apoptotischen Zellen nach Blockierung der Protein-Neusynthese ist zu beobachten (Abb. 020). Auch die verwendeten Apoptose-Signale UV-Strahlung und Staurosporin zeigen in früheren Studien bereits Bim bzw. Puma-Induktion. Da jedoch keines der hier untersuchten BH3-Proteine vermehrt exprimiert wird (Abb. 022), wohl jedoch Bax (Abb. 019), scheinen bei TLR9-abhängiger Apoptose-Induktion entweder nicht



untersuchte BH3-Proteine eine Rolle zu spielen oder proapoptotische TLR9-Signale verwenden einen unbekanntem Mechanismus.

Ein weiteres Indiz für den Ablauf eines bisher unbeschriebenen Signalweges bei TLR9-induzierter Apoptose stellt die notwendige Protein-Neubildung dar. Diese spricht, zusammen mit der eher langsamen Kinetik der CpG-induzierten Apoptose, für die Notwendigkeit der Bildung (unbekannter bzw. nicht untersuchter) proapoptotischer Proteine.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf einen bisher unbekanntem Signalweg der Apoptoseinduktion durch TLR9 hin.

Dieser Signalweg scheint sich deutlich von einer direkten Beteiligung von FADD oder Caspase-8 abzugrenzen. Hauptsächlich diese beiden Proteine setzen den „death-inducing signalling complex“ DISC (siehe Kapitel 1.11.) zusammen, welcher die Caspase-8-Aktivierung initiiert (Peter & Krammer, 2003).

In Versuchen mit TLR2 und dominant negativen (dn) Signalkomponenten hat sich gezeigt, das dnFADD, dnCaspase-8 und die dn-Variante des im TLR-Signalweg zentralen Adapter-Proteins MyD88 (siehe Kapitel 1.22.) dnMyD88 in der Lage sind, TLR2-induzierte Apoptose zu inhibieren (Aliprantis et al, 1999; Aliprantis et al, 2000). Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, MyD88 könnte in der Lage sein, im Sinne eines Todesrezeptors (siehe Kapitel 1.12.) den DISC-Komplex zu rekrutieren.

Die Hinweise für eine von FADD und Caspase-8 unabhängige Apoptose-Induktion ergeben sich aus der gezeigten Notwendigkeit von Gen-Neuinduktion, wobei die bekannten proapoptotischen Moleküle FADD, Caspase-8 und MyD88 bereits vorhanden sind, andererseits konnte die gesehene Bax-Aktivierung durch Caspasen-Inhibierung nicht geblockt werden (Fischer et al, 2005). Somit scheint hier Cytochrom c-Freisetzung unabhängig von Caspase-8 aufzutreten, also anders als bei dem für TLR2 vorgeschlagenen Signalweg.

Da auf der Suche nach dem durch TLR9 induzierten Signalweg die sonst als „Initiatoren“ beschriebenen BH3-Proteine hier nicht aktiviert werden, ist entweder von einer weiter oben gelegenen Ebene der Aktivierung auszugehen, oder die beteiligten BH3-Proteine wurden nicht untersucht.

Dieser Teil der Arbeit, der sich mit Apoptose-Induktion durch Toll-like-Rezeptor-9 beschäftigt, wurde bereits veröffentlicht (Fischer et al, 2005). Daher flossen in die Diskussion der gezeigten Ergebnisse ergänzend die Resultate dieser Veröffentlichung mit ein.

## 5.02. Apoptose und Liganden der Toll-like-Rezeptoren

### 5.02.1. HaCaT-Zellen und Induktion von Apoptose durch Imiquimod und Loxoribin

Imiquimod zeigt sich hoch effektiv in der topischen Anwendung bei Basalzell-Karzinomen der Haut (Beutner et al, 1999), malignen Melanomen (Bong et al, 2002) sowie aktinischer Keratose (Stockfleth et al, 2001).

Der Wirkmechanismus von Imiquimod, einem Imidazoquinolin, scheint eine lokale Induktion von Interferon- $\alpha$  zu sein (Chosidow & Dummer, 2003), ausgelöst durch TLR7-Aktivierung (Hemmi et al, 2002).

Neben Interferon-vermittelten Effekten auf epitheliale Tumorzellen, kann Imiquimod ebenso direkt Apoptose als TLR7-Ligand bei epithelialen Tumorzellen induzieren (Schön et al, 2003). Auch die Wirkung eines anderen Immunregulators, Loxoribin, wird über TLR7 vermittelt (Heil et al, 2003). Das Guanosin-Analogon zeigt dabei anti-virale- sowie anti-Tumor-Aktivität und wird derzeit in klinischen Phase-I Studien getestet (Agarwala et al, 2000).

Die beiden Substanzen Imiquimod sowie Loxoribin können in HaCaT-Zellen Apoptose induzieren (Abb. 023). Da es sich bei beiden Substanzen um TLR7-Agonisten handelt, ist diese Induktion möglicherweise durch TLR7 vermittelt.

Interessanterweise zeigen sich HaCaT-Zellen jedoch TLR7- und TLR8-defizitär (Kollisch et al, 2005; Schön et al, 2006). Da Apoptose dennoch eindeutig die Folge einer Behandlung ist, kann von einem unbekanntem Aktivierungsweg nach Imiquimod- sowie Loxoribin-Behandlung ausgegangen werden.

Trotzdem scheint der klassische Apoptose-Signalweg in diesen Zellen zu existieren und zu funktionieren (eigene Ergebnisse, siehe unten). Unstimulierte HaCaT-Zellen exprimieren BH3-Proteine in unterschiedlichem Maße: Bim (Abb. 025), Puma (Abb. 026) und Hrk (Abb. 026) werden in hohen Leveln exprimiert, ohne vorangehende Stimulation. Lediglich Noxa scheint von den getesteten BH3-Proteinen erst nach einem adäquaten Zellreiz gesteigert exprimiert zu werden (Abb. 025). Damit zeigt sich ein erster Hinweis auf die exklusive Rolle dieses Proteins bei der Apoptose-Induktion in HaCaT-Zellen, denn weder Bim, Puma noch Hrk lassen sich durch Imiquimod oder Loxoribin zur vermehrten Expression anregen (Abb. 025 und 026). Die Menge an Bim geht nach Loxoribin-Behandlung sogar zurück (Abb. 025), ein Phänomen, das noch ausgeprägter bei der Behandlung von HaCaT-Zellen mit dem TLR3-Liganden Poly(I:C) bemerkbar wird (Abb. 033).

Eine Apoptose-Induktion in HaCaT-Zellen über das BH3-Protein Noxa nach Imiquimod-, stärker noch nach Loxoribin-Behandlung, ist demnach wahrscheinlich.

## 5.02.2. Apoptoseinduktion und die Toll-like-Rezeptoren 2, 3, 4 und 9

### 5.02.2.1. HaCaT

Werden TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9 in HaCaT-Zellen transfiziert und mit den spezifischen Toll-like-Rezeptor-Liganden Pam<sub>3</sub>Cys, Poly(I:C), LPS und CpG co-inkubiert, zeigen alle Zellen Apoptose-Induktion (Abb. 028, 029, 031 und 032), und bei allen lässt sich, in verschieden starker Ausprägung, folgender Effekt nachweisen:

Die Vergleiche von Apoptose-Raten bei Leervektor-transfizierten- und TLR-transfizierten-HaCaT-Zellen ohne Stimulus zeigen eine deutliche Diskrepanz. Diese ist, am geringsten ausgeprägt, bei TLR4-Transfektion zu beobachten, deutlicher bei TLR9, eindeutig bei TLR2 und stark erkennbar bei TLR3-Transfektion. Die genannten Rezeptoren scheinen auf den Zellen exprimiert zu werden, was kombiniert mit der künstlichen Erhöhung (Transfektion) der Rezeptordichte die Zellen gegenüber unspezifischen Reizen sensibler macht.

TLR3 mit seinem Liganden Poly(I:C) zeigt bei Transfektion im Vergleich zum Leervektor die zahlenmäßig stärkste Differenz apoptotischer Kerne. Werden HaCaT-Zellen mit verschiedenen hohen Poly(I:C)-Konzentrationen behandelt, erweist sich der TLR3-Ligand Poly(I:C) sich daraufhin als potenter, konzentrationsabhängiger Apoptose-Stimulus (Abb. 030). TLR3 scheint demnach auf HaCaT-Zellen exprimiert zu sein, der Apoptose-Apparat wird durch TLR3-Stimulation aktiviert.

Über Toll-like-Rezeptoren in HaCaT-Zellen kann somit effektiv Apoptose induziert werden. Toll-like-Rezeptoren dienen also als Zielstrukturen, um bei Zellen über spezifische chemische Reize in die Apoptose-Regulation einzugreifen.

Ob dabei ein bekannter Mechanismus der Apoptose-Induktion abläuft oder ob TLR3 auf einem anderen, direkten Weg Apoptose auslöst, ist bislang unbekannt.

Der klassische, mitochondriale Signalweg wird von den BH3-Proteinen initiiert. Welcher Stimulus jedoch welches BH3-Mitglied aktiviert, ist stark unterschiedlich (Bouillet & Strasser, 2002). Noxa und Puma können etwa durch p53 nach DNA-Schäden induziert werden (Culmsee & Mattson, 2005). Für Noxa wird dies hier nach Poly(I:C)-Behandlung in HaCaT-Zellen nicht bestätigt (Abb. 037).

Dennoch ist Noxa von den hier getesteten BH3-Proteinen das einzige, welches auf den Stimulus Poly(I:C) eine BH3-Induktion zeigt (Abb. 033 und 034). Die weiteren getesteten BH3-Proteine reagieren nicht mit Induktion auf Poly(I:C), es zeigt sich sogar ein Rückgang der Expressionen (Abb. 033).

Noxa wird transkriptionell reguliert, nach seiner Aktivierung durch Poly(I:C) transloziert es an die Mitochondrien der Zelle. Das inaktive, meist cytosolisch lagernde pro-apoptotische Protein Bax transloziert daraufhin an die äußere Mitochondrien-Membran. Poly(I:C)-

stimulierte HaCaT-Zellen lassen dies ebenfalls beobachten (Abb. 035). Es folgt die Freisetzung von mitochondrial lokalisiertem Cytochrom c (Abb. 036).

Damit sind drei der Hauptschritte des mitochondrialen Signalweges gegangen: Noxa-, also BH3-Protein-Induktion, gefolgt von Bax-Aktivierung mit anschließender Cytochrom c-Freisetzung.

Poly(I:C) induziert demnach Apoptose über TLR3, Noxa, Bax und Cytochrom c.

Im Anschluss daran wird sehr wahrscheinlich Caspase-8 aktiviert, der direkte experimentelle Beweis steht jedoch noch aus.

Ebenso ungeklärt bleibt die Frage, weshalb Noxa als einziges BH3-Protein durch Poly (I:C) induziert wird und ob Noxa-Induktion zwingend zur TLR3-abhängigen Apoptose-Induktion notwendig ist.

#### 5.02.2.2. MonoMac6

Monozyten spielen bei entzündlichen Prozessen sowie Immunreaktionen eine entscheidende Rolle. Eine zusätzliche Aufgabe kommt ihnen bei der Antigenpräsentation der spezifischen Abwehr zu. Toll-like-Rezeptoren finden sich daher auf diversen Immunzellen, Monozyten und Makrophagen eingeschlossen (Lancaster et al, 2005; Zhou et al, 2005).

Bisher bekannt ist Apoptose-Induktion durch TLR4 in Makrophagen, vermutlich unter Ablauf der Signalkette FADD/Caspase-8/Bid (Haase et al, 2003; Ruckdeschel et al, 2004). Zudem zeigt sich in Makrophagen, dass die TLRs, welche TRIF als Adapterprotein nutzen, Apoptose nur induzieren können, wenn NF $\kappa$ B blockiert wird (Ruckdeschel et al, 2004).

Ähnliches wurde hier für LPS-Behandlung (TLR4-Stimulation) in MonoMac6-Zellen gefunden (Abb. 062). Zudem zeigen die Experimente dieser Arbeit die zuvor nicht beschriebene Apoptose-Induktion durch Poly(I:C), also TLR3-Stimulation, in der Monozyten-Zelllinie MonoMac6 (Abb. 061). Dass dabei analog zu LPS die Signalkette über FADD/Caspase-8/Bid abläuft scheint wahrscheinlich, muss jedoch noch bestätigt werden.

### 5.02.2.3. Mel526

Imiquimod topisch appliziert zeigt therapeutische Erfolge beim malignen Melanom (Ray et al, 2005) sowie bei Metastasen maligner Melanome (Bong et al, 2002). Einer der Wirkmechanismen ist die Induktion von Apoptose (Schön et al, 2004). Sowohl Imiquimod als auch Loxoribin wirken dabei über TLR7-Aktivierung, nicht über TLR8 (Lee et al, 2003).

Eine schwache Apoptose-Induktion durch die TLR7-Liganden in Mel526-Zellen kann hier gezeigt werden (Abb. 024). Auch sind BH3-Proteine in diesen Zellen nachweisbar (Abb. 027), was zusammenfassend für eine vorhandene Apoptose-Maschinerie spricht (siehe auch Abb. 048 und 050). Die gering ausgeprägte apoptotische Antwort (maximal 10%) auf Imiquimod und Loxoribin kann entweder einen Defekt in der Signalkaskade und damit weitgehende Therapieresistenz bedeuten, oder aber eine zu geringe Anzahl von vermittelnden Rezeptoren. Die Erhöhung der Rezeptordichte durch Transfektion von TLR2, 3, 4 und 9 und Zugabe der spezifischen Liganden zeigt für alle getesteten Toll-like-Rezeptoren weit höhere Apoptose-Raten (Abb. 038), die Empfindlichkeit gegenüber Apoptose-Reizen wird damit gesteigert. Kritisch anzumerken ist dabei die ebenfalls schon stark erhöhte Anzahl apoptotischer Nuclei der Kontrolle sowie der Proben transfizierter Toll-like-Rezeptoren ohne Ligand. Die Erklärung hierfür stellt, wie auch in anderen Transfektions-Experimenten dieser Arbeit, sehr wahrscheinlich der vermehrte Zellstress durch die Transfektionstechnik und der daraus folgenden Apoptose-Induktion dar.

Eine differenzierte Untersuchung einzelner transfizierter Toll-like-Rezeptoren zeigt keine Apoptose-Induktion durch den Liganden Pam<sub>3</sub>Cys (Abb. 039). Demnach scheinen Mel526-Zellen TLR2 zu exprimieren. Die erhöhte Apoptose-Rate nach TLR2-Transfektion und Stimulation lässt sich nicht eindeutig als Effekt der Stimulation werten, ebenfalls denkbar wäre der bereits genannte Effekt von Zellstress und Apoptose nach Transfektion. Weiterhin ist die Möglichkeit zu diskutieren, ob der Toll-like-Rezeptor-Ligand Pam<sub>3</sub>Cys TLR2-unabhängig, auf einem unbekanntem Wege Apoptose in Mel526-Zellen induziert.

TLR3 wird in Melanom- und weiteren Tumorzellen exprimiert. Jedoch ist die bisher gezeigte Apoptose-Induktion durch den TLR3-Liganden Poly(I:C) in diesen Zellen von zusätzlichen Stimuli (Blockierung von Proteinsynthese, Interferon-Behandlung) abhängig (Salaun et al, 2007). In den Versuchen hier mit TLR3 und der Melanom-Zelllinie Mel526 zeigt sich ein klar anderes Bild. Poly(I:C) alleine induziert bereits Apoptose (Abb. 041). Der Toll-like-Rezeptor scheint in unbehandelten Mel526-Zellen exprimiert zu sein, nach Transfektion und Stimulation mit Poly(I:C) lässt sich eine noch stärkere Apoptose-Rate ablesen (Abb. 040). Somit kann in Mel526-Zellen Poly(I:C)-abhängige Apoptose gezeigt werden, in der Rate abhängig von der Rezeptordichte.

Die Transfektionsreihe von Mel526-Zellen und Toll-like-Rezeptor-4 lässt ähnliche Schlussfolgerungen zu wie bei Toll-like-Rezeptor-2. Der Rezeptor wird wohl exprimiert und die Apoptose-Rate lässt sich durch Transfektion und LPS-Stimulation noch steigern (Abb. 042). Aber auch hier besteht die Möglichkeit einer unbekanntem, TLR4-unabhängigen Induktion von Apoptose durch LPS.

Von eindeutiger Toll-like-Rezeptor-unabhängiger Apoptose kann daher nicht gesprochen werden.

TLR9 wiederum zeigt ähnliche Verhältnisse wie TLR3. TLR9 wird in unbehandelten Mel526-Zellen exprimiert (Abb. 043), eine CpG-Behandlung führt zu Apoptose. Zudem liegt TLR9-abhängige Induktion von Apoptose vor, in der Stärke von der Menge der exprimierten Toll-like-Rezeptoren abhängig.

#### 5.02.2.4. IF6

Analog zu Mel526-Zellen wurde eine zweite Melanom-Zelllinie, IF6, befolgt.

Diese zeigt, wie Mel526, Hinweise auf vorhandene Elemente des mitochondrialen Signalweges der Apoptose (Abb. 049 und 051).

Überraschenderweise gibt es Unterschiede in der Apoptose-Induktion durch TLR-Agonisten, verglichen mit Mel526. In IF6-Zellen sind es TLR2 (Abb. 044) und TLR3 (Abb. 045), von denen Apoptose-Induktion nach Pam<sub>3</sub>Cys- bzw. Poly(I:C)-Behandlung abhängig erscheint. Es kann jedoch eine Rezeptor-Transfektion kombiniert mit Zugabe des jeweiligen Liganden keine Erhöhung der Apoptose-Rate bewirken. TLR2 und TLR3 scheinen demnach auf IF6-Zellen exprimiert zu sein, die Induktion von Apoptose ist jedoch hier nicht an die Toll-like-Rezeptor-Konzentration gebunden.

Nahezu „spiegelverkehrt“ verhalten sich IF6-Zellen bei der Transfektion mit TLR4 (Abb. 046) oder TLR9 (Abb. 047). Hier ist eine TLR-unabhängige und demnach unbekannte Art der Induktion von Apoptose durch LPS bzw. CpG die wahrscheinlichere Variante.

Auch in IF6-Zellen zeigen sich schon in den Kontrollen erhöhte Apoptose-Raten. Wie auch in Mel526-Zellen (etwas weniger als 15%) sind diese relativ konstant (IF6-Zellen: etwa 20%) und sind in allen Versuchen zu beobachten. Dies spricht für einen gewissen „Grundstress“ bei der Transfektion.

### 5.02.3. Der mitochondriale Signalweg in Melanom-Zellen

In humanen Melanom-Zellen sowie weiteren Tumor-Zelllinien zeigt der TLR3-Ligand Poly(I:C) die Fähigkeit zur Noxa- sowie Apoptose-Induktion (Sun & Leaman, 2005).

Anders als in HaCaT-Zellen kann Poly(I:C) Noxa in Mel526-Zellen nicht vermehrt induzieren. Puma und Hrk werden durch Poly(I:C)-Behandlung nur geringfügig nach oben reguliert. Da jedoch bei Poly(I:C)-behandelten Mel526-Zellen morphologisch vermehrt apoptotische Zellkerne nachweisbar sind (Abb. 041), eine BH3- bzw. Noxa-Induktion nach Poly(I:C)-Behandlung jedoch ausbleibt (Abb. 052), liegt wie schon bei Imiquimod und Loxoribin auch bei Poly(I:C)-Behandlung der Schluss einer zumindest *Noxa*-unabhängigen Apoptose-Induktion in Mel526-Zellen nahe.

Zudem zeigen sich die getesteten BH3-Proteine, insbesondere Noxa, schon in unbehandelten Kontroll-Mel526-Zellen stark exprimiert (Abb. 027 und 052). Eine ähnlich starke (Noxa-) Hochregulierung zeigt sich in Vergleichszellen wie HaCaT erst nach Stimulation (Abb. 025 und 033).

### 5.02.4. Apoptose nach Toll-like-Rezeptor-Stimulation: Ablauf des TLR-Signalweges

#### 5.02.4.1. MyD88, die MAP-Kinasen ERK/p38 und NF $\kappa$ B

Nach Binden von Liganden an Toll-like-Rezeptoren vollziehen diese Konformationsänderungen, die es ihnen erlauben, weitere Signalmoleküle und Signaladapter zu rekrutieren. Das *Myeloid Differentiation Primary-Response Protein 88*, kurz MyD88, ist eines dieser intrazellulären Adaptermoleküle. MyD88 funktioniert durch seine Todesdomäne (*Death Domain*, DD) sowie TIR-Domäne (*Toll/IL-1R homology domain*) als Adapter zwischen TLRs und weiter downstream befindlichen Molekülen, die ebenfalls Todesdomänen besitzen (Akira & Takeda, 2004). Es aktiviert entzündungsspezifische Signalwege und wird mit Ausnahme von TLR3 von allen Toll-like-Rezeptoren exprimiert.

Nicht alle TLRs benutzen ausschließlich MyD88 als Adapter. TLR4 etwa nutzt TRIF (*TIR-domain-containing adapter inducing IFN- $\beta$* ) und MyD88 als Adapter-Proteine (Ruckdeschel et al, 2004). TLR3 hingegen nutzt nicht MyD88, sondern nur TRIF zur Signaltransduktion. Anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnte eine Beteiligung von MyD88 bei der Apoptose-Induktion nach TLR3-Stimulation weder ausgeschlossen noch bestätigt werden (Abb. 060). Einiges jedoch spricht dafür, das TRIF hier die alleinige Adapterfunktion übernimmt (Ruckdeschel et al, 2004). Generell scheint eine TLR-abhängige Apoptose-Induktion eher TRIF- als MyD88-abhängig zu sein (Kaiser & Offermann, 2005).

Nach der MyD88-Rekrutierung werden MAP-Kinasen (ERK, JNK, p38) sowie der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B aktiviert, um die Expression proinflammatorischer Cytokine zu regulieren.

Um weitere Schritte des Toll-like-Rezeptor-Signalweges und die Verbindung zu Apoptose-Induktion zu analysieren, werden der Großteil der im Folgenden diskutierten Experimente mit Monozyten durchgeführt. Die verwendete Monozyten-Zelllinie MonoMac6 zeigt phänotypisch sowie funktionell die Eigenschaften reifer Monozyten (Ziegler-Heitbrock et al, 1988).

Der TLR3-Ligand Poly(I:C) (Abb. 061 und 063) sowie der TLR4-Ligand LPS (Abb. 062 und 063) induzieren wie erwartet klar Apoptose in MonoMac6-Zellen. Durch die spezifische Bindung dieser Liganden an die jeweiligen Toll-like-Rezeptoren kann daher von Toll-like-Rezeptor-vermittelter Apoptose ausgegangen werden. Beide oben genannten TLR-Liganden zeigen zudem eine breite BH3-Induktion, die Proteine Noxa, Puma sowie Bim weisen durch Mehr-Expression auf den Ablauf des mitochondrialen Signalweges hin (Abb. 066-070).

Bei der Involvierung von MAP-Kinasen muss jedoch differenziert werden:

So induzieren sowohl Poly(I:C) als auch LPS in MonoMac6-Zellen Apoptose, jedoch nur nach Poly(I:C)-Stimulation leitet die MAP-Kinase p38 das Signal weiter. Schaltet man das Protein durch die p38-blockierende Substanz SB203580 aus, zeigt sich die Apoptose-Rate vermindert (Abb. 064). Nach LPS-Stimulation jedoch (LPS induziert Apoptose potenter als Poly(I:C)) ist der p38-Blocker „wirkunglos“, die Apoptose-Rate steigt tendenziell noch an (Abb. 064). Damit läuft LPS-induzierte Apoptose (via TLR4) in MonoMac6-Zellen an p38 hochwahrscheinlich vorbei, wohingegen Poly(I:C)-induzierte Apoptose (via TLR3) p38-abhängig funktioniert. Die Bestätigung dieser bis dato unbeschriebenen Unterschiede bringen Versuche mit BH3-Proteinen.

LPS induziert Noxa und Bim unabhängig von p38, eine Blockade erhöht die Proteinmenge noch (Abb. 066 und 067). Poly(I:C) hingegen induziert Noxa und Bim in Abhängigkeit von p38, die Up-Regulation beider BH3-only-Proteine kann durch SB203580 geblockt werden (Abb. 064 und 069).

Somit kann eine Apoptose-Induktion über die Toll-like-Rezeptoren 3 und 4 in MonoMac6-Zellen gezeigt werden, im Falle von TLR3 in Abhängigkeit von der MAP-Kinase p38, im Falle von TLR4 p38-unabhängig. Beide Aussagen sind so nicht vorbeschrieben und müssen durch weitere Experimente bestätigt werden.

Die Nutzbarkeit dieser Erkenntnisse liegt auf der Hand: Durch eine chemische Blockade eines der Schlüsselenzyme TLR3-vermittelter Apoptose kann vergleichsweise einfach in die Regulation eingegriffen werden. Apoptose kann in gewissem Rahmen so zugelassen oder verhindert werden.



Von der zweiten getesteten MAP-Kinase ERK kann Ähnliches beschrieben werden, allerdings in eingeschränktem Rahmen. In „gesunden“ Zellen (hier HaCaT) wird ERK TLR3-unabhängig exprimiert, Poly(I:C) kann eine Induktion nicht steigern. Dies gilt auch für Imiquimod und Loxoribin (Abb. 057), welche über einen bislang unbekanntem Mechanismus Apoptose in HaCaT-Zellen induzieren (siehe Kapitel 5.02.1.), nicht jedoch über TLR7 oder TLR8 (beide sind in HaCaT-Zellen nicht exprimiert).

In Mel526-Zellen wurden andere Effekte beobachtet. Hier ist ERK in unbehandelten Zellen weniger hoch exprimiert und kann durch Poly(I:C), Imiquimod und Loxoribin schwach induziert werden (Abb. 058 und 059). Apoptose in Mel526-Zellen scheint demnach in Abhängigkeit der MAP-Kinase ERK über TLR3-, TLR7- sowie TLR8-Stimulation induzierbar zu sein. HaCaT-Zellen exprimieren ERK schon in unbehandeltem Zustand, eine Stimulierung über Toll-like-Rezeptoren bleibt aus.

#### 5.02.4.2. Die Protein-Kinase R (PKR)

Doppelsträngige RNA (dsRNA) als molekulares Muster (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) für virale Infektionen wird von Toll-like-Rezeptoren erkannt und aktiviert daraufhin die double-stranded RNA-activated Proteinkinase PKR (He, 2006). PKR ist ein durch Interferon und dsRNA induzierbares Enzym, welches durch Aktivierung autophosphoryliert und daraufhin sein spezifisches Substrat, die  $\alpha$ -Subunit des eukaryontischen Initiationsfaktors 2 (eIF2 $\alpha$ ), phosphoryliert. Dies führt zu einem Abfall an zellulärer Proteinsynthese und inhibiert damit virale Replikation (Cole, 2007).

Darüber hinaus ist PKR in Zell-Wachstum, -Differenzierung und Apoptose verwickelt (Baltzis et al, 2004; Onuki et al, 2004), wobei im Lichte dieser Arbeit die PKR-regulierte TLR4-Abhängigkeit von Apoptose in Makrophagen (Hsu et al, 2004) besonders interessant erscheint.

In HaCaT-Zellen kann durch PKR-Überexpression eine Noxa- und damit vermutlich konsekutive Apoptose-Induktion gezeigt werden (Abb. 056). Den entscheidenden Hinweis für eine PKR-abhängige Noxa- und damit Apoptose-Induktion durch Poly(I:C) in HaCaT-Zellen ergeben Versuche mit Anwendung des PKR-Inhibitors 2-AP (Abb. 055).

## 6. Schlusswort

Ein Schritt zur Etablierung der Verknüpfung von Apoptose und Toll-like-Rezeptoren konnte in dieser Arbeit gegangen werden. Diese relativ neue Entwicklung stellt vielversprechende Anwendungen in Aussicht, etwa sind kombinierte Therapieansätze denkbar, welche sowohl in die Signalwege der Apoptose als auch die der Toll-like-Rezeptoren eingreifen. Die bisherige Domäne der therapeutischen Apoptose-Regulation (Neoplasien) könnte um die Komponente der Toll-like-Rezeptor-Regulation erweitert werden.

Einige Bindeglieder beider Themenkomplexe konnten in dieser Arbeit erarbeitet und näher beleuchtet werden. Vieles jedoch bleibt unbekannt und bietet für die Zukunft einen weiten, fordernden und spannenden wissenschaftlichen Betätigungsbereich.

## Danksagung

Dr. Silke Fischer hat mich während meiner Zeit im Labor stets mit Rat, Tat, Ideen und Motivation versorgt. Eine bessere Betreuerin kann man sich nicht wünschen.

Prof. Georg Häcker hat mich in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen und mir die Möglichkeit gegeben, molekularbiologische Forschung kennen- und verstehen zu lernen. Seine Begeisterung dafür, sein Engagement und Interesse, seine besonnene Führung, seine Geduld und seine professionelle Arbeit haben einen bleibenden Eindruck hinterlassen.

Ein herausragender Doktorvater.

Die AG Häcker war stets ein Spitzenteam, die Arbeit mit Euch war klasse !!  
Besonders durch Dr. Anette Bauer, meine Banknachbarin, hatte ich viel Spaß und habe gute Freunde gefunden.



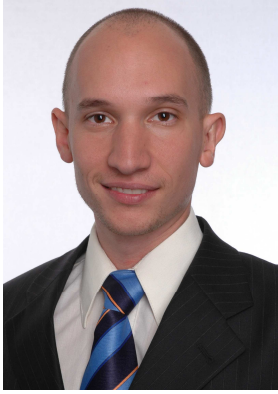
Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. H. Wagner und Prof. D. Busch durchgeführt. Ich danke allen am Institut für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und gutes Miteinander, die Basis für erfolgreiche Projekte.

---

Tiefste Dankbarkeit gilt meinen Eltern Magdalena und Heinz Höfling.  
Ihr ermöglicht mir glücklich und zufrieden zu sein.

Meine Frau Anke und mein Sohn Noah machen mich komplett. Ich liebe Euch.





## Curriculum vitae

Schöffauer Strasse 17  
82449 Uffing am Staffelsee  
Telefon: +49/8846/218003  
Mobil: +49/174/9910603  
Email : frederikhoefling@gmx.de

### Persönliche Daten

Name: Frederik Hoefling  
Geburtsdatum/-ort: 02.01.1978 in München  
Mutter: Magdalena Hoefling, Studienrätin  
Vater: Dr. Heinz Hoefling, Rechtsanwalt/Steuerberater  
Geschwister: Florian Hoefling, geb. 1980, Bosch Group Management  
Familienstand: verheiratet mit Anke Helmke, Ärztin (Innere Medizin)

### Beruf / Studium

ab 07/2010 **Assistenzarzt Sportorthopädie/Unfallchirurgie, Klinikum Garmisch-Partenkirchen** (in Kooperation mit BGU Murnau)  
Dr. med. Peter Gutfeld, Prof. Dr. med. Volker Bühren

ab 11/2007 **Assistenzarzt Unfallchirurgie, BG Unfallklinik Murnau**  
Prof. Dr. med. Volker Bühren

11/2006 **Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung; Vollapprobation als Arzt**

06.06.2006 – 22.09.2006 **Praktisches Jahr Tertial Gynäkologie/Geburtshilfe, Technische Universität München (TUM), Klinikum Rechts-der-Isar München**  
Prof. Dr. med. Marion Kiechle-Bahat

13.02.2006 – 02.06.2006 **Praktisches Jahr Tertial Innere Medizin, NYU – New York University, NYC, USA** Bellevue Hospital  
Lewis Nelson, M.D., Robert S. Hoffman, M.D. (Toxicology)  
William R. Slater, M.D. (Cardiology)  
Lewis Goldfrank, M.D., FACMT (Emergency Medicine)

19.12.2005 – 10.02.2006 **Praktisches Jahr Tertial Chirurgie, Cochabamba, Bolivien**  
Hospital Viedma, Universidad Mayor San Simon  
Dr. Walter Antezana

24.10.2005 – 16.12.2005 **Praktisches Jahr Tertial Chirurgie, Merida, Mexico**  
Hospital O'Horan, Universidad Anahuac del Mayab  
Dr. Jesús Manuel Bernal Mier

08 und 09/2005 **Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung**

seit 10/2003 **Labor-experimentelle Doktorarbeit** Prof. Dr. med. Georg Häcker,  
Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene des Klinikums  
Rechts-der-Isar, TU-München  
Thema: „Induktion von Apoptose durch Toll-like-Rezeptor-Liganden“

08/2003 **Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung**

ab 10/2001	<b>Klinisches Studium Humanmedizin</b> Technische Universität München, Klinikum Rechts-der-Isar
05/1999 – 09/2001	<b>Vorklinisches Studium Humanmedizin</b> Friedrich-Alexander-Universität Erlangen <b>ärztliche Vorprüfung (Physikum)</b>
<hr/>	
	<a href="#"><u>praktische Tätigkeiten / Famulaturen</u></a>
19.09.2004 – 01.10.2004	<b>Ferienakademie der TU-München, Kurs: „Clinical Case Presentations and Innovations in the Field of molecular Medicine“</b> Prof. Dr. med. B. Gänsbacher, Professor Steinkasserer (FAU-Erlangen), Dr. Y. Kang (Cornell Medical College, New York)
30.07.2004 – 28.08.2004	<b>Famulatur Lilongwe Central Hospital, Malawi, Afrika</b> <b>Geburtshilfe/Gynäkologie</b> Dr. med. B. Reich
05/2004 – 10/2005	<b>OP-Assistenz im Krankenhaus der barmherzigen Brüder München</b> <b>Orthopädie</b> Prof. Dr. med. W. Ploetz
08.01.2003 – 07.02.2003	<b>Famulatur Sri Ramachandra Medical College, Chennai (Madras), Indien</b> <b>Herz-Thorax-Chirurgie, Kardiologie</b> Professor K.R. Balakrishnan
05.11.2002 – 05.12.2002	<b>Famulatur Clinic Nallam, Pondicherry, Indien</b> <b>Viszeralchirurgie</b> Professor V. Nallam
Sommersemester 2002	<b>Assistent des mikrobiologischen Praktikums</b> Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München
11.03.2002 – 12.04.2002	<b>Famulatur UCSF - University of California San Francisco</b> <b>Radiology</b> Professor Lynne Steinbach
02.05.2001 – 29.06.2001	<b>Festanstellung als Rettungssanitäter</b> Johanniter-Unfall-Hilfe München
Sommersemester 2000	<b>Tutor im Kursus der makroskopischen Anatomie</b> ("Präpkurs") anatomisches Institut der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen
01.03.2000 – 30.04.2000	<b>Krankenpflegepraktikum</b> Kreiskrankenhaus München-Perlach Fachbereiche: <i>Chirurgie (allgemein), septische Chirurgie</i>
01.09.1999 – 30.09.1999	<b>Festanstellung als Rettungssanitäter</b> Johanniter-Unfall-Hilfe München
30.11.1998 – 25.12.1998	<b>Praktikum als Rettungssanitäter</b> Kreiskrankenhaus München-Perlach Fachbereiche: <i>Nothilfe, Wachraum, Intensiv, Anästhesie/OP</i>
10/1998 – 04/1999	<b>Rettungswagenpraktikum</b> als Rettungssanitäter Johanniter-Unfall-Hilfe München

## Studium – Zusatzkurse

Sommersemester 2004	<b>Manuelle Medizin</b> Dr. Marx
Sommersemester 2004	<b>Prophylaxe, Diagnostik und Chemotherapie von Infektionskrankheiten</b> Prof. Dr. med. Braveny
Sommersemester 2002	<b>chirurgischer Nahtkurs</b> plastische Chirurgie Rechts-der-Isar
Wintersemester 2001 und Sommersemester 2002	<b>Tropenmedizin</b> Prof. Dr. med. Rüdiger Disko
Wintersemester 2001	<b>Homöopathie</b>
Wintersemester 2001	<b>Englisch für Mediziner</b>
Wintersemester 2001	<b>chirurgischer Nahtkurs</b> Prof. Dr. med. Liebermann-Meffert

## berufliche Ausbildung

08/1998 – 02/1999	<b>Ausbildung zum Rettungssanitäter</b> Johanniter-Unfall-Hilfe München
-------------------	--

## Zivildienst

01.09.1997 – 31.09.1998	<b>Behindertenfahrdienst</b> Johanniter-Unfall-Hilfe München
-------------------------	--

## Schulbildung

1984 – 1988	<b>Grundschule am Pfanzeltplatz</b> München
1988 – 1997	<b>Heinrich-Heine-Gymnasium</b> München Abschluss: allgemeine Hochschulreife

## Sprachkenntnisse

Deutsch:	Muttersprache
Englisch:	flüssig/flüssig/flüssig (lesen/schriftlich/mündlich)
Spanisch:	gut/gut/gut
Französisch:	gut/ausreichend/gut

## IT-Kenntnisse

sehr gute Kenntnisse: MS Office incl. Access, SAP, Photoshop, Windows, Internet, etc.  
gute Kenntnisse: Linux, Virtual Basic, HTML, weitere

## private Interessen

Sport (Laufen (Langstrecke), Choy Lay Fut Kung Fu, Squash, Snowboard, Sportklettern), Individualreisen, Fotografie (SW-Eigenentwicklung), Kino & Literatur, Computer, Musik (DJ, Schallplatten), Sprachen



Unterschrift

## 7. Referenzen

- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* **9**: 423-432
- Adams JM (2003) Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* **17**: 2481-2495
- Agarwala SS, Kirkwood JM, Bryant J (2000) Phase 1, randomized, double-blind trial of 7-allyl-8-oxoguanosine (loxoribine) in advanced cancer. *Cytokines, cellular & molecular therapy* **6**: 171-176
- Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**: 499-511
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**: 783-801
- Alberts B. JA, Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002) *Molecular Biology of the Cell - Fourth Edition*: Online; Garland Science, "Visualizing Cells" Summary Chapter **9**: 1
- Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A (1999) Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* **285**: 736-739
- Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A (2000) The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *Embo J* **19**: 3325-3336
- Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* **42**: 779-789
- Baltzis D, Qu LK, Papadopoulou S, Blais JD, Bell JC, Sonenberg N, Koromilas AE (2004) Resistance to vesicular stomatitis virus infection requires a functional cross talk between the eukaryotic translation initiation factor 2alpha kinases PERK and PKR. *J Virol* **78**: 12747-12761
- Basanez G, Nechushtan A, Drozhinin O, Chanturiya A, Choe E, Tutt S, Wood KA, Hsu Y, Zimmerberg J, Youle RJ (1999) Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5492-5497
- Bauer A, Villunger A, Labi V, Fischer SF, Strasser A, Wagner H, Schmid RM, Hacker G (2006) The NF-kappaB regulator Bcl-3 and the BH3-only proteins Bim and Puma control the death of activated T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10979-10984
- Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB (2001) Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9237-9242
- Belvin MP, Anderson KV (1996) A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 393-416
- Beutner KR, Geisse JK, Helman D, Fox TL, Ginkel A, Owens ML (1999) Therapeutic response of basal cell carcinoma to the immune response modifier imiquimod 5% cream. *Journal of the American Academy of Dermatology* **41**: 1002-1007
- Bong AB, Bonnekoh B, Franke I, Schön MP, Ulrich J, Gollnick H (2002) Imiquimod, a topical immune response modifier, in the treatment of cutaneous metastases of malignant melanoma. *Dermatology (Basel, Switzerland)* **205**: 135-138
- Bossy-Wetzell E, Green DR (1999) Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *J Biol Chem* **274**: 17484-17490
- Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, Adams JM, Strasser A (1999) Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* **286**: 1735-1738

- Bouillet P, Strasser A (2002) BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* **115**: 1567-1574
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* **106**: 761-771
- Bowie A, O'Neill LA (2000) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* **67**: 508-514
- Boyd JM, Gallo GJ, Elangovan B, Houghton AB, Malstrom S, Avery BJ, Ebb RG, Subramanian T, Chittenden T, Lutz RJ, et al. (1995) Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* **11**: 1921-1928
- Cascino I, Fiucci G, Papoff G, Ruberti G (1995) Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J Immunol* **154**: 2706-2713
- Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**: 37-40
- Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DC (2005) Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* **17**: 393-403
- Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* **8**: 705-711
- Chiou SK, Rao L, White E (1994) Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Mol Cell Biol* **14**: 2556-2563
- Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G, Lutz RJ (1995) A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *Embo J* **14**: 5589-5596
- Chosidow O, Dummer R (2003) Imiquimod: mode of action and therapeutic potential. *Acta dermato-venereologica*: 8-11
- Clarke PG, Clarke S (1996) Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol (Berl)* **193**: 81-99
- Cleary ML, Smith SD, Sklar J (1986) Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* **47**: 19-28
- Cole JL (2007) Activation of PKR: an open and shut case? *Trends Biochem Sci* **32**: 57-62
- Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**: 647-656
- Coultas L, Bouillet P, Loveland KL, Meachem S, Perlman H, Adams JM, Strasser A (2005) Concomitant loss of proapoptotic BH3-only Bcl-2 antagonists Bik and Bim arrests spermatogenesis. *Embo J* **24**: 3963-3973
- Coultas L, Bouillet P, Stanley EG, Brodnicki TC, Adams JM, Strasser A (2004) Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bik/Blk/Nbk is expressed in hemopoietic and endothelial cells but is redundant for their programmed death. *Mol Cell Biol* **24**: 1570-1581
- Culmsee C, Mattson MP (2005) p53 in neuronal apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* **331**: 761-777
- Daniel NN, Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell* **116**: 205-219
- Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003) A decade of caspases. *Oncogene* **22**: 8543-8567



- Dent P, Yacoub A, Fisher PB, Hagan MP, Grant S (2003) MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene* **22**: 5885-5896
- Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC (1999) Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* **144**: 891-901
- Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ (2000) Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol* **10**: 1201-1204
- Ekert PG, Vaux DL (2005) The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Curr Opin Cell Biol* **17**: 626-630
- Ellis HM, Horvitz HR (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44**: 817-829
- Erlacher M, Michalak EM, Kelly PN, Labi V, Niederegger H, Coultas L, Adams JM, Strasser A, Villunger A (2005) BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood* **106**: 4131-4138
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* **20**: 929-935
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* **101**: 890-898
- Fas SC, Fritzsching B, Suri-Payer E, Krammer PH (2006) Death receptor signaling and its function in the immune system. *Curr Dir Autoimmun* **9**: 1-17
- Fischer SF, Rehm M, Bauer A, Hofling F, Kirschnek S, Rutz M, Bauer S, Wagner H, Hacker G (2005) Toll-like receptor 9 signaling can sensitize fibroblasts for apoptosis. *Immunol Lett* **97**: 115-122
- Fletcher JI, Huang DC (2006) BH3-only proteins: orchestrating cell death. *Cell Death Differ* **13**: 1268-1271
- Fuentes-Prior P, Salvesen GS (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* **384**: 201-232
- Gillissen B, Essmann F, Graupner V, Starck L, Radetzki S, Dorken B, Schulze-Osthoff K, Daniel PT (2003) Induction of cell death by the BH3-only Bcl-2 homolog Nbk/Bik is mediated by an entirely Bax-dependent mitochondrial pathway. *Embo J* **22**: 3580-3590
- Godbey WT, Wu KK, Hirasaki GJ, Mikos AG (1999) Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency. *Gene Ther* **6**: 1380-1388
- Gonzales DH, Neupert W (1990) Biogenesis of mitochondrial c-type cytochromes. *J Bioenerg Biomembr* **22**: 753-768
- Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**: 626-629
- Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, Dive C, Hickman JA (1999) Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* **144**: 903-914
- Haase R, Kirschning CJ, Sing A, Schrottner P, Fukase K, Kusumoto S, Wagner H, Heesemann J, Ruckdeschel K (2003) A dominant role of Toll-like receptor 4 in the signaling of apoptosis in bacteria-faced macrophages. *J Immunol* **171**: 4294-4303
- Häcker G (2000) The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* **301**: 5-17

- Häcker G, Bauer A, Villunger A (2006) Apoptosis in Activated T Cells: What Are the Triggers, and What the Signal Transducers? *Cell Cycle* **5**: 2421-4
- Häcker G, Weber A (2007) BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? *Arch Biochem Biophys* **462(2)**: 150-5
- Harris CA, Johnson EM, Jr. (2001) BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons. *J Biol Chem* **276**: 37754-37760
- He B (2006) Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell Death Differ* **13**: 393-403
- Heemels MT (2000) Nature Insight Apoptosis - Introduction. *Nature* **407**: 769
- Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, Dietrich H, Lipford G, Takeda K, Akira S, Wagner H, Bauer S (2003) The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* **33**: 2987-2997
- Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S (2002) Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature immunology* **3**: 196-200
- Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Kappler J, Marrack P (2002) Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr Opin Immunol* **14**: 354-359
- Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J, Beutler B (2003) Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* **424**: 743-748
- Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer JL, Schneider P, Seed B, Tschopp J (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* **1**: 489-495
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* **253**: 49-53
- Horvitz HR, Sternberg PW, Greenwald IS, Fixsen W, Ellis HM (1983) Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **48 Pt 2**: 453-463
- Hsu LC, Park JM, Zhang K, Luo JL, Maeda S, Kaufman RJ, Eckmann L, Guiney DG, Karin M (2004) The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. *Nature* **428**: 341-345
- Huang DC, Strasser A (2000) BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* **103**: 839-842
- Huang Y, Sheikh MS (2006) TRAIL death receptors and cancer therapeutics. *Toxicol Appl Pharmacol* **224(3)**: 284-289
- Hutchins JB, Barger SW (1998) Why neurons die: cell death in the nervous system. *Anat Rec* **253**: 79-90
- Imaizumi K, Benito A, Kiryu-Seo S, Gonzalez V, Inohara N, Lieberman AP, Kiyama H, Nunez G (2004) Critical role for DP5/Harakiri, a Bcl-2 homology domain 3-only Bcl-2 family member, in axotomy-induced neuronal cell death. *J Neurosci* **24**: 3721-3725
- Imaizumi K, Tsuda M, Imai Y, Wanaka A, Takagi T, Tohyama M (1997) Molecular cloning of a novel polypeptide, DP5, induced during programmed neuronal death. *J Biol Chem* **272**: 18842-18848
- Inohara N, Ding L, Chen S, Nunez G (1997) harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *Embo J* **16**: 1686-1694

- InternationalLymphomaStudyGroup (1997) A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* **89**: 3909-3918
- Jarrous N, Osman F, Kaempfer R (1996) 2-Aminopurine selectively inhibits splicing of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Molecular and cellular biology* **16**: 2814-2822
- Jeffers JR, Parganas E, Lee Y, Yang C, Wang J, Brennan J, MacLean KH, Han J, Chittenden T, Ihle JN, McKinnon PJ, Cleveland JL, Zambetti GP (2003) Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* **4**: 321-328
- Kaiser WJ, Offermann MK (2005) Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif. *J Immunol* **174**: 4942-4952
- Karin M, Lin A (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* **3**: 221-227
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**: 115-122
- Kawai T, Akira S (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ* **13**: 816-825
- Kawai T, Akira S (2007) TLR signaling. *Seminars in immunology* **19**: 24-32
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* **26**: 239-257
- Kim SO, Ono K, Han J (2001) Apoptosis by pan-caspase inhibitors in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**: L1095-1105
- Kirchheis R, Wightman L, Wagner E (2001) Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Advanced drug delivery reviews* **53**: 341-358
- Kirschnek S, Ying S, Fischer SF, Hacker H, Villunger A, Hochrein H, Hacker G (2005) Phagocytosis-induced apoptosis in macrophages is mediated by up-regulation and activation of the Bcl-2 homology domain 3-only protein Bim. *J Immunol* **174**: 671-679
- Kirschning CJ, Wesche H, Merrill Ayres T, Rothe M (1998) Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* **188**: 2091-2097
- Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, Brown GA, Korsmeyer SJ (1995) Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* **270**: 96-99
- Kollisch G, Kalali BN, Voelcker V, Wallich R, Behrendt H, Ring J, Bauer S, Jakob T, Mempel M, Ollert M (2005) Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology* **114**: 531-541
- Kumar S (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* **14**: 32-43
- Kunz M, Hartmann A, Flory E, Toksoy A, Koczan D, Thiesen HJ, Mukaida N, Neumann M, Rapp UR, Brocker EB, Gillitzer R (1999) Anoxia-induced up-regulation of interleukin-8 in human malignant melanoma. A potential mechanism for high tumor aggressiveness. *The American journal of pathology* **155**: 753-763
- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD (2005) BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* **17**: 525-535
- Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneiter R, Green DR, Newmeyer DD (2002) Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* **111**: 331-342

- Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandennebeele P (2002) Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ* **9**: 358-361
- Lancaster GI, Khan Q, Drysdale P, Wallace F, Jeukendrup AE, Drayson MT, Gleeson M (2005) The physiological regulation of toll-like receptor expression and function in humans. *The Journal of physiology* **563**: 945-955
- Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**: 15-16
- Lee J, Chuang TH, Redecke V, She L, Pitha PM, Carson DA, Raz E, Cottam HB (2003) Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6646-6651
- Lee JW, Soung YH, Kim SY, Nam SW, Kim CJ, Cho YG, Lee JH, Kim HS, Park WS, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH (2004) Inactivating mutations of proapoptotic Bad gene in human colon cancers. *Carcinogenesis* **25**: 1371-1376
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**: 973-983
- Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**: 183-192
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA (1991) The p53 tumour suppressor gene. *Nature* **351**: 453-456
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**: 491-501
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**: 479-489
- Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR, Thompson CB (2000) The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* **6**: 1389-1399
- Linette GP, Hess JL, Sentman CL, Korsmeyer SJ (1995) Peripheral T-cell lymphoma in lckpr-bcl-2 transgenic mice. *Blood* **86**: 1255-1260
- Linton SD, Aja T, Armstrong RA, Bai X, Chen LS, Chen N, Ching B, Contreras P, Diaz JL, Fisher CD, Fritz LC, Gladstone P, Groessl T, Gu X, Herrmann J, Hirakawa BP, Hoglen NC, Jahangiri KG, Kalish VJ, Karanewsky DS, Kodandapani L, Krebs J, McQuiston J, Meduna SP, Nalley K, Robinson ED, Sayers RO, Sebring K, Spada AP, Ternansky RJ, Tomaselli KJ, Ullman BR, Valentino KL, Weeks S, Winn D, Wu JC, Yeo P, Zhang CZ (2005) First-in-class pan caspase inhibitor developed for the treatment of liver disease. *J Med Chem* **48**: 6779-6782
- Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* **87**: 565-576
- Lockshin RA, Williams CM (1965) Programmed Cell Death--I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkworm. *J Insect Physiol* **11**: 123-133
- Loefering DA, Ruchaud S, Earnshaw WC, Kaufmann SH (2006) Evaluation of the role of caspase-6 in anticancer drug-induced apoptosis. *Cell Death Differ* **13**: 346-347
- Lohrum MA, Vousden KH (1999) Regulation and activation of p53 and its family members. *Cell Death Differ* **6**: 1162-1168
- Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T (1993) p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* **362**: 847-849

- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**: 481-490
- Mattson MP, Kroemer G (2003) Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med* **9**: 196-205
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**: 394-397
- Meier P, Finch A, Evan G (2000) Apoptosis in development. *Nature* **407**: 796-801
- Moore J, Seiter K, Kolitz J, Stock W, Giles F, Kalaycio M, Zenk D, Marcucci G (2006) A Phase II study of Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) combined with gemtuzumab ozogamicin in older patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *Leuk Res* **30**: 777-783
- Moreau C, Cartron PF, Hunt A, Meflah K, Green DR, Evan G, Vallette FM, Juin P (2003) Minimal BH3 peptides promote cell death by antagonizing anti-apoptotic proteins. *J Biol Chem* **278**: 19426-19435
- Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettlesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**: 335-341
- Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A (2000) Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* **164**: 5998-6004
- Nakano K, Vousden KH (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**: 683-694
- Neu M, Fischer D, Kissel T (2005) Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *The journal of gene medicine* **7**: 992-1009
- Nicholson DW (2000) From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* **407**: 810-816
- Nicotera P, Lipton SA (1999) Excitotoxins in neuronal apoptosis and necrosis. *J Cereb Blood Flow Metab* **19**: 583-591
- O'Brien S, Moore JO, Boyd TE, Larratt LM, Skotnicki A, Koziner B, Chanan-Khan AA, Seymour JF, Gregory Bociek R, Pavletic S, Rai KR (2007) Randomized Phase III Trial of Fludarabine Plus Cyclophosphamide With or Without Oblimersen Sodium (Bcl-2 antisense) in Patients With Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol* **25(9)**: 1114-20
- O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC (1998) Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *Embo J* **17**: 384-395
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**: 1053-1058
- Onuki R, Bando Y, Suyama E, Katayama T, Kawasaki H, Baba T, Tohyama M, Taira K (2004) An RNA-dependent protein kinase is involved in tunicamycin-induced apoptosis and Alzheimer's disease. *Embo J* **23**: 959-968
- Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* **14**: 453-501
- Pellegrini M, Belz G, Bouillet P, Strasser A (2003) Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 14175-14180
- Peter ME, Krammer PH (2003) The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* **10**: 26-35

- Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* **3**: 287-296
- Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC, Strasser A (2001) Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* **293**: 1829-1832
- Ranger AM, Zha J, Harada H, Datta SR, Danial NN, Gilmore AP, Kutok JL, Le Beau MM, Greenberg ME, Korsmeyer SJ (2003) Bad-deficient mice develop diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 9324-9329
- Ray CM, Kluk M, Grin CM, Grant-Kels JM (2005) Successful treatment of malignant melanoma in situ with topical 5% imiquimod cream. *International journal of dermatology* **44**: 428-434
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF (1998) A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 588-593
- Rosetto M, Engstrom Y, Baldari CT, Telford JL, Hultmark D (1995) Signals from the IL-1 receptor homolog, Toll, can activate an immune response in a Drosophila hemocyte cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **209**: 111-116
- Ruchaud S, Korfali N, Villa P, Kottke TJ, Dingwall C, Kaufmann SH, Earnshaw WC (2002) Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *Embo J* **21**: 1967-1977
- Ruckdeschel K, Pfaffinger G, Haase R, Sing A, Weighardt H, Hacker G, Holzmann B, Heesemann J (2004) Signaling of apoptosis through TLRs critically involves toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta, but not MyD88, in bacteria-infected murine macrophages. *J Immunol* **173**: 3320-3328
- Rudolphi K, Gerwin N, Verzijl N, van der Kraan P, van den Berg W (2003) Pralnacasan, an inhibitor of interleukin-1beta converting enzyme, reduces joint damage in two murine models of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **11**: 738-746
- Saito M, Korsmeyer SJ, Schlesinger PH (2000) BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol* **2**: 553-555
- Salaun B, Lebecque S, Matikainen S, Rimoldi D, Romero P (2007) Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? *Clin Cancer Res* **13**: 4565-4574
- Salvesen GS, Dixit VM (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* **91**: 443-446
- Sattler M, Liang H, Nettlesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW (1997) Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* **275**: 983-986
- Scheid MP, Schubert KM, Duronio V (1999) Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *J Biol Chem* **274**: 31108-31113
- Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R (2001) Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* **2**: 947-950
- Schön M, Bong AB, Drewniok C, Herz J, Geilen CC, Reifenberger J, Benninghoff B, Slade HB, Gollnick H, Schön MP (2003) Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod. *J Natl Cancer Inst* **95**: 1138-1149
- Schön MP, Schön M, Klotz KN (2006) The small antitumoral immune response modifier imiquimod interacts with adenosine receptor signaling in a TLR7- and TLR8-independent fashion. *The Journal of investigative dermatology* **126**: 1338-1347

- Schön MP, Wienrich BG, Drewniok C, Bong AB, Eberle J, Geilen CC, Gollnick H, Schön M (2004) Death receptor-independent apoptosis in malignant melanoma induced by the small-molecule immune response modifier imiquimod. *The Journal of investigative dermatology* **122**: 1266-1276
- Scott FL, Denault JB, Riedl SJ, Shin H, Renatus M, Salvesen GS (2005) XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *Embo J* **24**: 645-655
- Shibue T, Takeda K, Oda E, Tanaka H, Murasawa H, Takaoka A, Morishita Y, Akira S, Taniguchi T, Tanaka N (2003) Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev* **17**: 2233-2238
- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**: 483-487
- Stockfleth E, Meyer T, Benninghoff B, Christophers E (2001) Successful treatment of actinic keratosis with imiquimod cream 5%: a report of six cases. *The British journal of dermatology* **144**: 1050-1053
- Strasser A (2005) The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* **5**: 189-200
- Strasser A, Harris AW, Cory S (1992) The role of bcl-2 in lymphoid differentiation and neoplastic transformation. *Curr Top Microbiol Immunol* **182**: 299-302
- Strasser A, Huang DC, Vaux DL (1997) The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumorigenesis and resistance to chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* **1333**: F151-178
- Sulston JE (1976) Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **275**: 287-297
- Sulston JE, Horvitz HR (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **56**: 110-156
- Sun Y, Leaman DW (2005) Involvement of Noxa in cellular apoptotic responses to interferon, double-stranded RNA, and virus infection. *J Biol Chem* **280**: 15561-15568
- Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**: 335-376
- Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S (1995) Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *Embo J* **14**: 1129-1135
- Tata JR (1966) Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. *Dev Biol* **13**: 77-94
- Timmer JC, Salvesen GS (2007) Caspase substrates. *Cell Death Differ* **14**: 66-72
- Topalian SL, Solomon D, Rosenberg SA (1989) Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas. *J Immunol* **142**: 3714-3725
- Turjanski AG, Vaque JP, Gutkind JS (2007) MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* **26**: 3240-3253
- Van Muijen GN, Cornelissen LM, Jansen CF, Figdor CG, Johnson JP, Brocker EB, Ruiter DJ (1991) Antigen expression of metastasizing and non-metastasizing human melanoma cells xenografted into nude mice. *Clin Exp Metastasis* **9**: 259-272
- Vaux DL (2002) Apoptosis timeline. *Cell Death Differ* **9**: 349-354
- Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**: 440-442
- Vaux DL, Korsmeyer SJ (1999) Cell death in development. *Cell* **96**: 245-254

- Vaux DL, Strasser A (1996) The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 2239-2244
- Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A (2003) p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* **302**: 1036-1038
- Vincenz C (2001) Death receptors and apoptosis. Deadly signaling and evasive tactics. *Cardiol Clin* **19**: 31-43
- Virchow R (1871) *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre - Vierte Auflage*. Kapitel 15/16/17 328-431, Verlag August Hirschwald, Berlin.
- Vogelstein B, Kinzler KW (1992) p53 function and dysfunction. *Cell* **70**: 523-526
- Vogt CA (1842) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricians*). *Solothurn, Switzerland: Jent & Gassman*: pp130
- Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I (1997) Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* **390**: 350-351
- Wada T, Penninger JM (2004) Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* **23**: 2838-2849
- Wagner H (2004) The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol* **25**: 381-386
- Wang K, Gross A, Waksman G, Korsmeyer SJ (1998) Mutagenesis of the BH3 domain of BAX identifies residues critical for dimerization and killing. *Mol Cell Biol* **18**: 6083-6089
- Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1996) BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* **10**: 2859-2869
- Wasserman SA (1993) A conserved signal transduction pathway regulating the activity of the rel-like proteins dorsal and NF-kappa B. *Mol Biol Cell* **4**: 767-771
- Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* **14**: 2060-2071
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**: 727-730
- Weil M, Jacobson MD, Coles HS, Davies TJ, Gardner RL, Raff KD, Raff MC (1996) Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *The Journal of cell biology* **133**: 1053-1059
- Willis SN, Adams JM (2005) Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **17**: 617-625
- Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC (2005) Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* **19**: 1294-1305
- Wilson KP, McCaffrey PG, Hsiao K, Pazhanisamy S, Galullo V, Bemis GW, Fitzgibbon MJ, Caron PR, Murcko MA, Su MS (1997) The structural basis for the specificity of pyridinylimidazole inhibitors of p38 MAP kinase. *Chem Biol* **4**: 423-431
- Wolf BB, Green DR (1999) Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* **274**: 20049-20052
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**: 1326-1331
- Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ (1995) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* **80**: 285-291



- Yonish-Rouach E (1996) The p53 tumour suppressor gene: a mediator of a G1 growth arrest and of apoptosis. *Experientia* **52**: 1001-1007
- Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M (1991) Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* **352**: 345-347
- You H, Pellegrini M, Tsuchihara K, Yamamoto K, Hacker G, Erlacher M, Villunger A, Mak TW (2006) FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *J Exp Med* **203**: 1657-1663
- Zarembek KA, Godowski PJ (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* **168**: 554-561
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**: 619-628
- Zhang Y, Bliska JB (2003) Role of Toll-like receptor signaling in the apoptotic response of macrophages to Yersinia infection. *Infect Immun* **71**: 1513-1519
- Zheng TS, Hunot S, Kuida K, Flavell RA (1999) Caspase knockouts: matters of life and death. *Cell Death Differ* **6**: 1043-1053
- Zhou J, An H, Xu H, Liu S, Cao X (2005) Heat shock up-regulates expression of Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in human monocytes via p38 kinase signal pathway. *Immunology* **114**: 522-530
- Ziegler-Heitbrock HW, Thiel E, Futterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmuller G (1988) Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer* **41**: 456-461
- Zinkel SS, Ong CC, Ferguson DO, Iwasaki H, Akashi K, Bronson RT, Kutok JL, Alt FW, Korsmeyer SJ (2003) Proapoptotic BID is required for myeloid homeostasis and tumor suppression. *Genes Dev* **17**: 229-239
- Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB (2001) BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* **15**: 1481-1486
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X (1997) Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**: 405-413
- Zuzarte-Luis V, Hurlle JM (2002) Programmed cell death in the developing limb. *Int J Dev Biol* **46**: 871-876

FIN